

Les biocarburants en France et en Europe

Damien Hudebine



– Production d'éthanol 2G au labo –

Rappel sur l'éthanol 2G

Les biocarburants de 2^{ème} génération

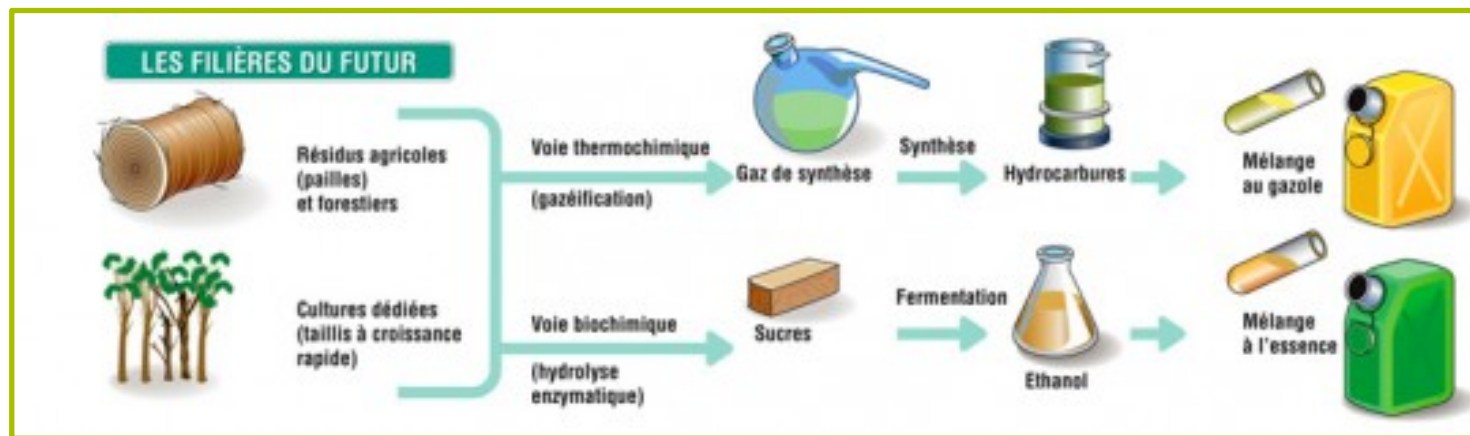
Généralités

- Les biocarburants de 2^{ème} génération sont produits à partir de ressources lignocellulosiques :

- Résidus agricoles (pailles, drèches)
- Résidus forestiers
- Cultures dédiées



- Les biocarburants de 2^{ème} génération se distinguent par leur procédé de fabrication et leur utilisation



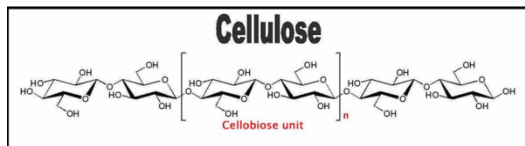
Les biocarburants de 2^{ème} génération

La biomasse lignocellulosique

- La biomasse lignocellulosique est constituée majoritairement de :

Cellulose (~40%)

- Polysaccharides linéaires de glucose
- **Eléments :**
 - Cellobiose = dimère de glucose
- DP moyen : 100-14000

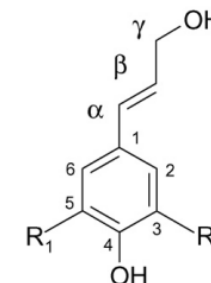


Hémicellulose (~30%)

- Polysaccharides linéaires/ramifiés de sucres C₅ et C₆
- **Eléments :**
 - C₅: xylose, arabinose, mannose
 - C₆: glucose, galactose
- DP moyen : 100-300

Lignines (~25%)

- Polymères ramifiés de monolignols (dérivés du phénol)
- **Eléments :**
 - alcool paracoumarylique
 - alcool coniférylique
 - alcool synapylique



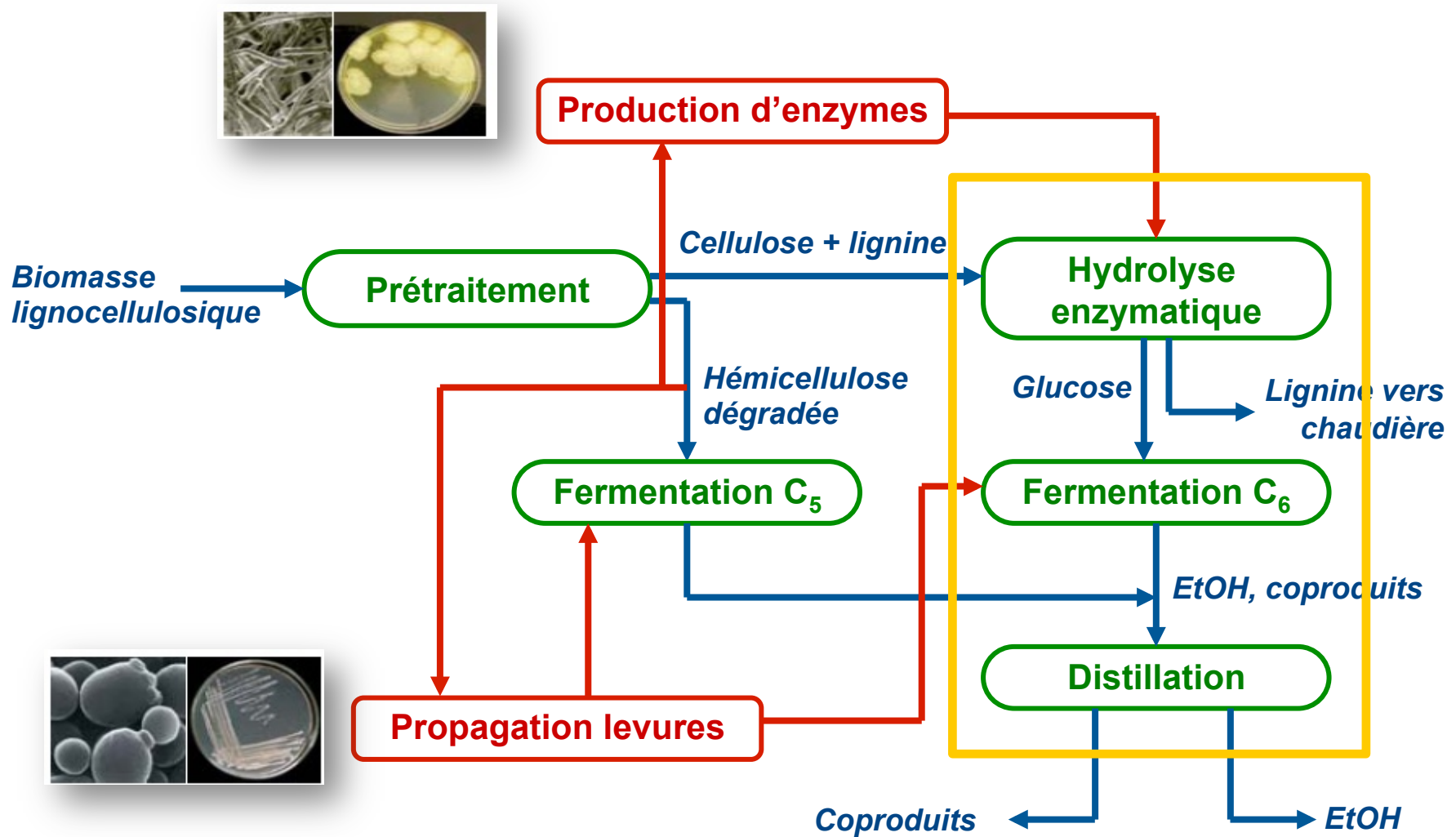
alcool p-coumarylique :
R₁=R₂=H

alcool coniférylique :
R₁= OCH₃ ; R₂=H

alcool synapylique :
R₁=R₂=OCH₃

Les biocarburants de 2^{ème} génération

L'éthanol 2G (1/2)



Les biocarburants de 2^{ème} génération

L'éthanol 2G (2/2)

- 2 schémas possibles pour la transformation de la cellulose en éthanol :
 - Mode SHF (*Separate Hydrolysis and Fermentation*)
 - Réalisation de l'étape d'hydrolyse dans les conditions idéales d'hydrolyse (réaction à 45-55°C)
 - Séparation ou non du jus sucré et des insolubles
 - Fermentation du jus sucré dans les conditions idéales de fermentation (30-37°C)
 - Avantage : Les 2 réactions se font à leur température optimale
 - Inconvénient : Durant l'hydrolyse, la production de glucose inhibe les enzymes (inhibition par les produits = phénomène d'auto-régulation)

- Mode SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)
 - L'étape d'hydrolyse et de fermentation est faite en même temps. Auquel cas, la température de réaction doit être adaptée aux levures (i.e. 30-37°C), sinon elles meurent
 - Avantage : Plus d'inhibition par le glucose qui est consommé au fur et à mesure de sa production
 - Inconvénient : Les enzymes travaillent à basse température

– Production d'éthanol 2G au labo –

Outils et produits nécessaires

- Nécessité d'utiliser un « fermenteur » mais il est assez facile d'en réaliser un...
 - Réaction : un réacteur propre avec système d'évent, agité et régulé en température (30-55°C)
 - Ex. réacteur : un flacon pénicilline en verre préalablement étuvé fermé par un septum et une goulotte aluminium
 - Ex. évent : une aiguille + un filtre 45 µm
 - Ex. contrôle T : une agitation orbitale dans four contrôlé en température
 - Suivi de la réaction : une balance de précision
- **Remarques :**
 - N'importe quel récipient en verre qui peut être hermétiquement fermé avec un système pour évacuer le CO₂ produit lors de la fermentation peut faire l'affaire.
 - Une agitation magnétique avec plaque chauffante à 35°C doit pouvoir suffire.
 - La précision de la balance doit être suffisante pour pouvoir suivre la perte de masse suite à l'évacuation du CO₂

- Outils utilisé pour la démonstration



- Il ne faut que quelques produits en dehors du substrat cellulosique :
 - Solution tampon acétate pH 5.0
 - Produit usuel de laboratoire
 - *Ex : 31048 Fluka*
 - Chloramphénicol
 - Antibactérien. Attention danger. Fiche MSDS. Produit labo. Permet d'éviter une prolifération bactérienne durant la fermentation (protection)
 - *Ex : C0378 Sigma*
 - Levure de boulanger lyophilisée
 - Produit commercial
 - Extrait de levures
 - Produit commercial et de labo. Va servir de solution nutritive aux levures.
 - *Ex : Bacto Yeast Extract de Becton, Dickinson and Company. Référence : 212750*
 - Cocktail enzymatique
 - Point le plus délicat pour s'approvisionner. Produit de labo. Voir fournisseurs tels que Novozymes (Ctec2, Ctec3), Genencor (GC220, Accelerase).

– Production d'éthanol 2G au labo –

Le protocole expérimental

Le protocole expérimental

Préparation du mélange

- Réaliser un mélange qui contient :
 - 10-100 g/kg de substrat cellulosique (attention à essayer de garder de l'eau libre dans le mélange initial)
 - 5-200 mg d'enzymes/g de cellulose
 - 0.5-3 g/kg de levures
 - 5 g/kg d'extrait de levure
 - 0.05 g/kg de chloramphénicol (50 ppm pds)
- Compléter avec de la solution tampon acétate pH 5.0 à 50 mM
- Vous pouvez étudier l'impact de différents paramètres sur la cinétique :
 - La nature du substrat
 - La dose d'enzymes
 - La température
 - La teneur en MS du mélange
 - ~~La dose de levures~~ (non car la fermentation n'est pas l'étape limitante)

Le protocole expérimental

Réalisation de la démonstration (1/6)

- Préparation du mélange tampon acétate pH5.0 à 500 mM
 - Placer un récipient en verre à l'étuve à 105°C pour le stériliser
 - Introduire dans le récipient 5.40 g d'acide acétique et 15.68 g d'acétate de potassium
 - Compléter à 500 g avec de l'eau stérilisée puis mélanger
 - Vérifier le pH de la solution obtenue. Le pH doit être égal à 5.00 ± 0.05
 - Utiliser directement la solution tampon pour préparer la solution nutritive concentrée

- Préparation de la solution nutritive concentrée 10X
 - Placer un récipient en verre avec bouchon (flacon Schott par exemple) à l'étuve à 105°C pour le stériliser
 - Introduire dans le récipient 25.00 g d'extrait de levure et 0.25 g de chloramphénicol
 - Compléter à 500 g avec la solution tampon acétate de potassium/acide acétique 500 mM et pH 5 puis mélanger
 - Conserver la solution dans le récipient fermé à 4°C au plus pendant 1 mois

Le protocole expérimental

Réalisation de la démonstration (2/6)

- On veut un mélange de 15g à 5% pds de substrat, 30 mg/g_{substrat} d'enzymes et 1.5 g/kg de levure
 - Cocktail enzymatique CTec2 à 238g/L d'enzymes

- Préparation du mélange réactionnel (étape 1)
 - Mettre dans le réacteur exactement 0.75 g de substrat
 - Ajouter exactement 1.5 g de solution nutritive concentrée 10X
 - Compléter avec de l'eau stérilisée à environ 12 g
 - Fermer le réacteur, mélanger et laisser reposer au frais une nuit

- Préparation de la crème de levures (à n'utiliser qu'une fois)
 - Placer un récipient en verre à l'étuve à 105°C pour le stériliser.
 - Introduire 0.60 g de levure sèche.
 - Compléter à 20 g avec de l'eau stérilisée puis mélanger.
 - Conserver la solution dans le récipient fermé à 4°C sur une période de dépassant pas l'heure.

Le protocole expérimental

Réalisation de la démonstration (3/4)

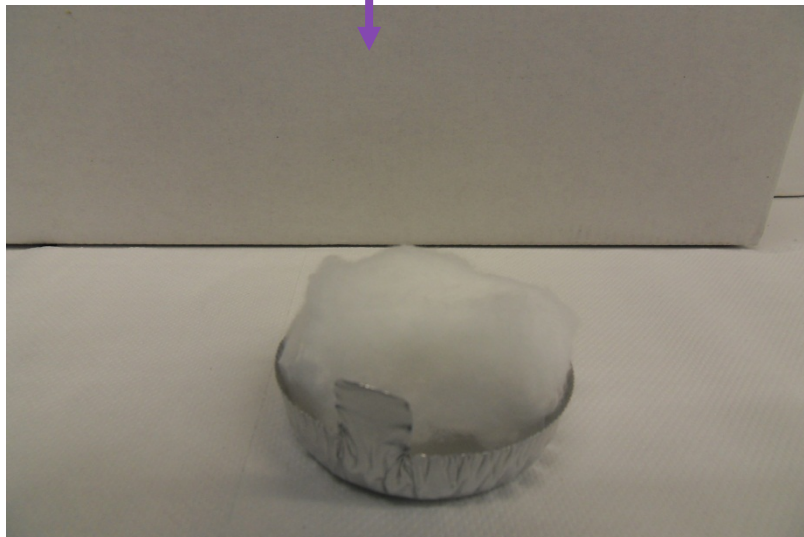
- Préparation du mélange réactionnel (étape 2)
 - Reprendre le réacteur le lendemain et ajouter exactement 0.115 g de cocktail CTec2
 - Ajouter exactement 0.750 g de crème de levures
 - Compléter à 15 g avec de l'eau stérilisée
 - Fermer le réacteur, bien mélanger, mettre le système d'évent en place
 - Si besoin, mettre le système d'agitation interne
 - Peser l'ensemble le plus précisément possible car cela servira de point de départ à la réaction
 - Placer le système en agitation et en température (35°C)

- Faire un suivi de la masse du système au moins toutes les 24h durant 144h

Le protocole expérimental

Réalisation de la démonstration (4/4)

- 3 substrats ont été testées :
 - Mouchoir papier
 - Feuille A4
 - Coton de pharmacie



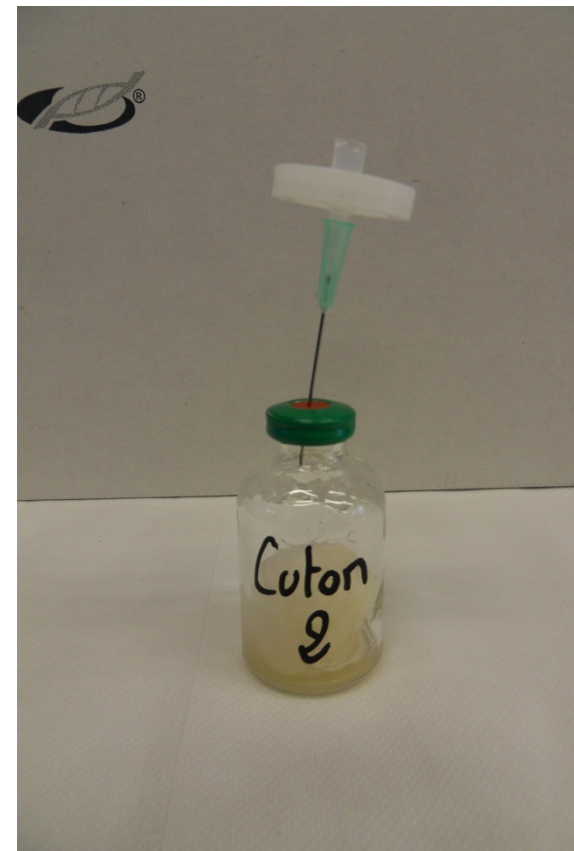
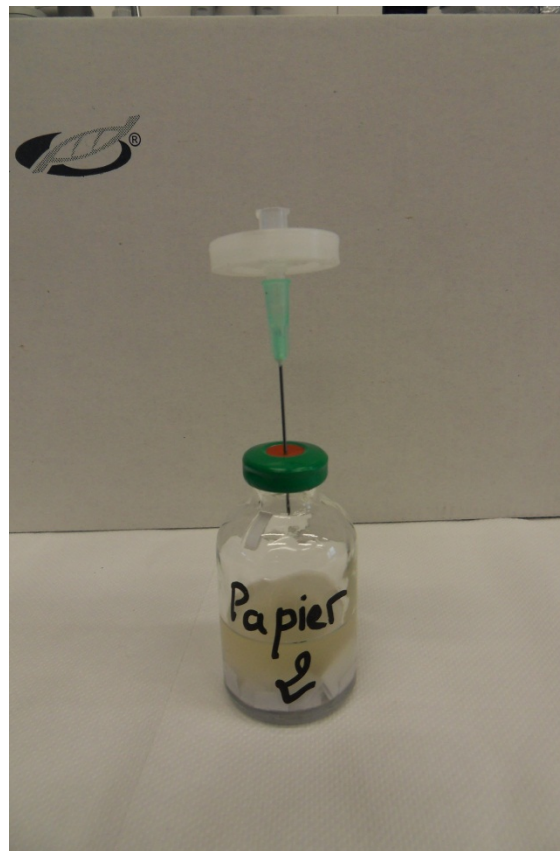
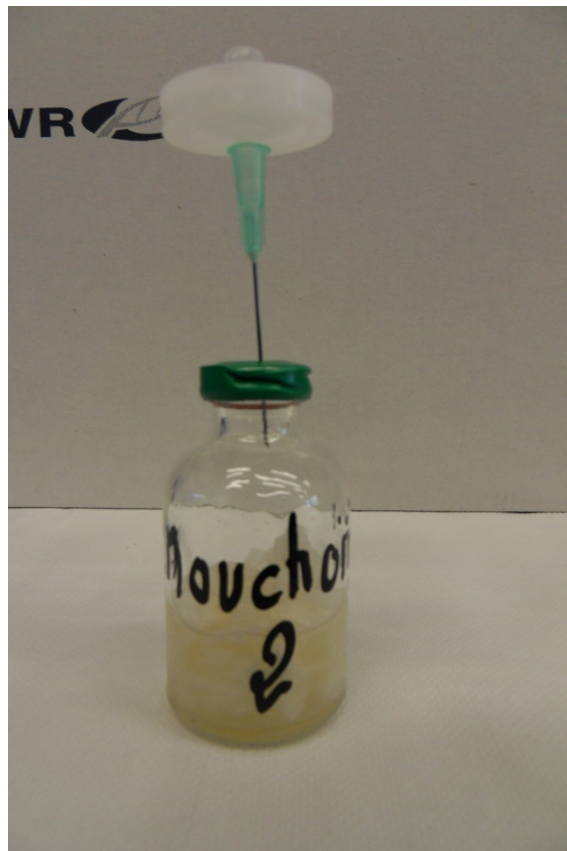
Le protocole expérimental

Réalisation de la démonstration (5/6)

Mouchoir 5 %pds
30 mg/g_{substrat} CTec2
1.5 g/kg de levures

Papier A4 5 %pds
30 mg/g_{substrat} CTec2
1.5 g/kg de levures

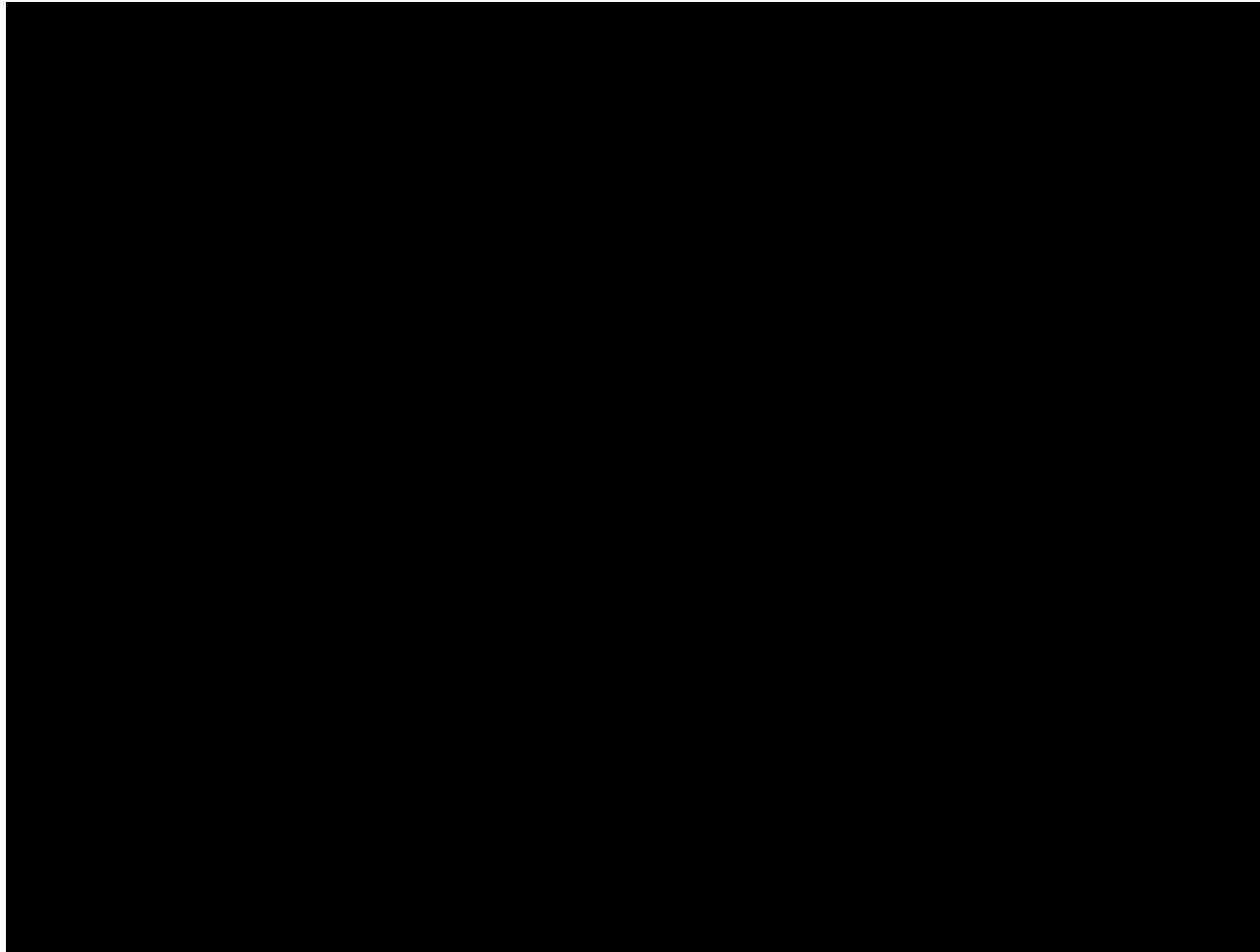
Coton 5 %pds
30 mg/g_{substrat} CTec2
1.5 g/kg de levures



Le protocole expérimental

Réalisation de la démonstration (6/6)

- Agitation à 35°C



	Masse flacon vide (g)	Masse substrat (g)	Masse sol. nut. conc. (g)	Masse cock. enz. (g)	Masse totale (g)	Masse mélange (g)	Masse tot. prêt à ferm. (g)
Mouchoir 1	36.7591	0.7521	1.4983	0.1147	51.7828	15.0237	56.6165
Mouchoir 2	37.2230	0.7495	1.5095	0.1259	52.4114	15.1884	57.3296
Papier A4 1	36.7169	0.7482	1.5063	0.1172	51.7230	15.0061	56.5562
Papier A4 2	36.8943	0.7478	1.5012	0.1212	51.8855	14.9912	56.7218
Coton 1	37.2209	0.7478	1.5586	0.1192	52.1891	14.9682	57.7314
Coton 2	37.2682	0.7566	1.5506	0.1166	52.2534	14.9852	57.0548

■ Points importants :

- Faire des doublons (voire 3) permet de limiter les erreurs expérimentales
- Il faut mettre la bonne quantité de substrat
- Il faut mettre la bonne quantité d'enzymes
- Il faut connaître parfaitement la masse une fois le système prêt à fermenter
- Vous pouvez être moins précis sur les autres masses

– Production d'éthanol 2G au labo –

Le suivi expérimental

Le protocole expérimental

Le suivi en pertes de masse (1/2)

Le suivi des masses absolues (en g)

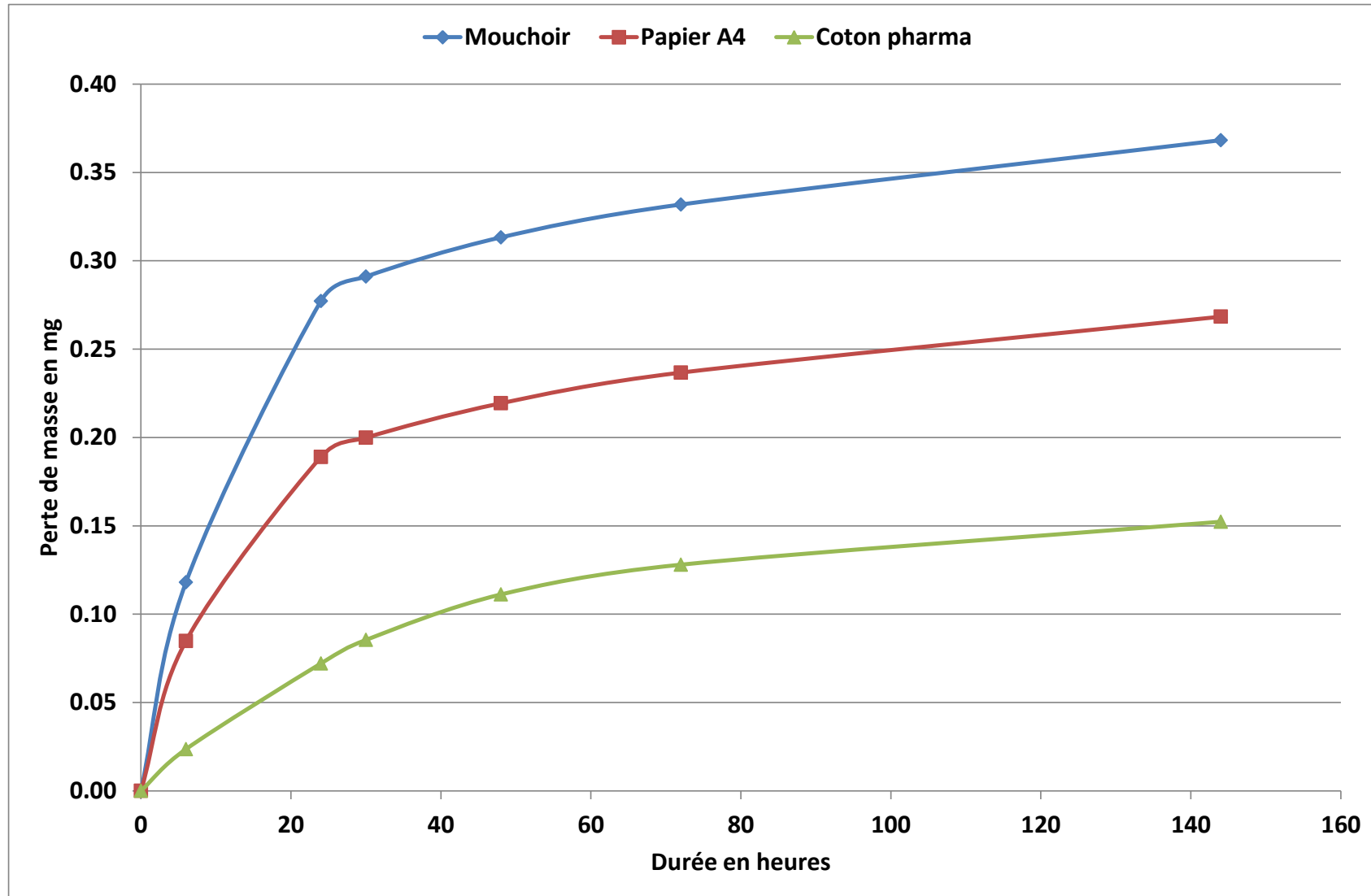
	0h	6h	24h	48h	72h	96h	144h
Mouchoir 1	56.6165	56.5039	56.3414	56.3273	56.3053	56.2867	56.2514
Mouchoir 2	57.3296	57.2062	57.0503	57.0367	57.0143	56.9957	56.9582
Papier A4 1	56.5562	56.4727	56.3683	56.3570	56.3381	56.3209	56.2894
Papier A4 2	56.7218	56.6357	56.5318	56.5212	56.5012	56.4837	56.4519
Coton 1	57.7314	57.7073	57.6581	57.6447	57.6184	57.6013	57.5761
Coton 2	57.0548	57.0317	56.9839	56.9707	56.9455	56.9289	56.9055

Le suivi des pertes de masse (en g)

	0h	6h	24h	48h	72h	96h	144h
Mouchoir 1	0.0000	0.1126	0.2751	0.2892	0.3112	0.3298	0.3651
Mouchoir 2	0.0000	0.1234	0.2793	0.2929	0.3153	0.3339	0.3714
Papier A4 1	0.0000	0.0835	0.1879	0.1992	0.2181	0.2353	0.2668
Papier A4 2	0.0000	0.0861	0.1900	0.2006	0.2206	0.2381	0.2699
Coton 1	0.0000	0.0241	0.0733	0.0867	0.1130	0.1301	0.1553
Coton 2	0.0000	0.0231	0.0709	0.0841	0.1093	0.1259	0.1493

Le protocole expérimental

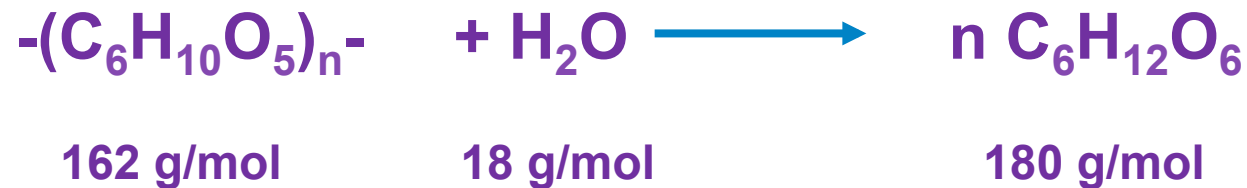
Le suivi en pertes de masse (2/2)



– Production d'éthanol 2G au labo –

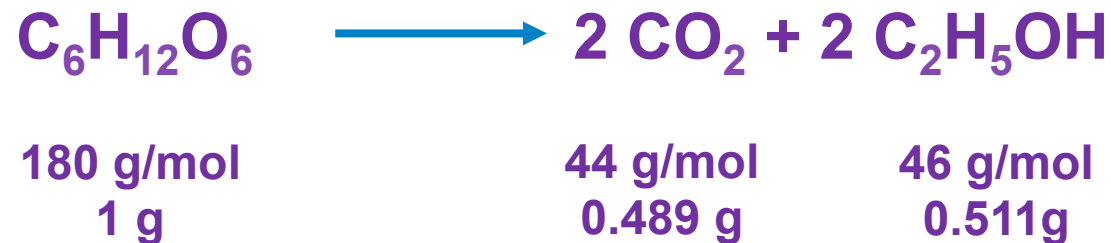
Exploitation et calculs

- De manière schématique, la réaction d'hydrolyse de la cellulose peut être décrit comme suit :



- Donc Y g de cellulose donne potentiellement $Y * 180 / 162$ g de glucose.
- Dans notre cas, si on considère que le substrat est sec (MS de 100%) et composé de cellulose pure, on a potentiellement $0.75 * 180 / 162 = 0.833$ g de glucose

- De manière schématique, la réaction de fermentation être décrit comme suit :



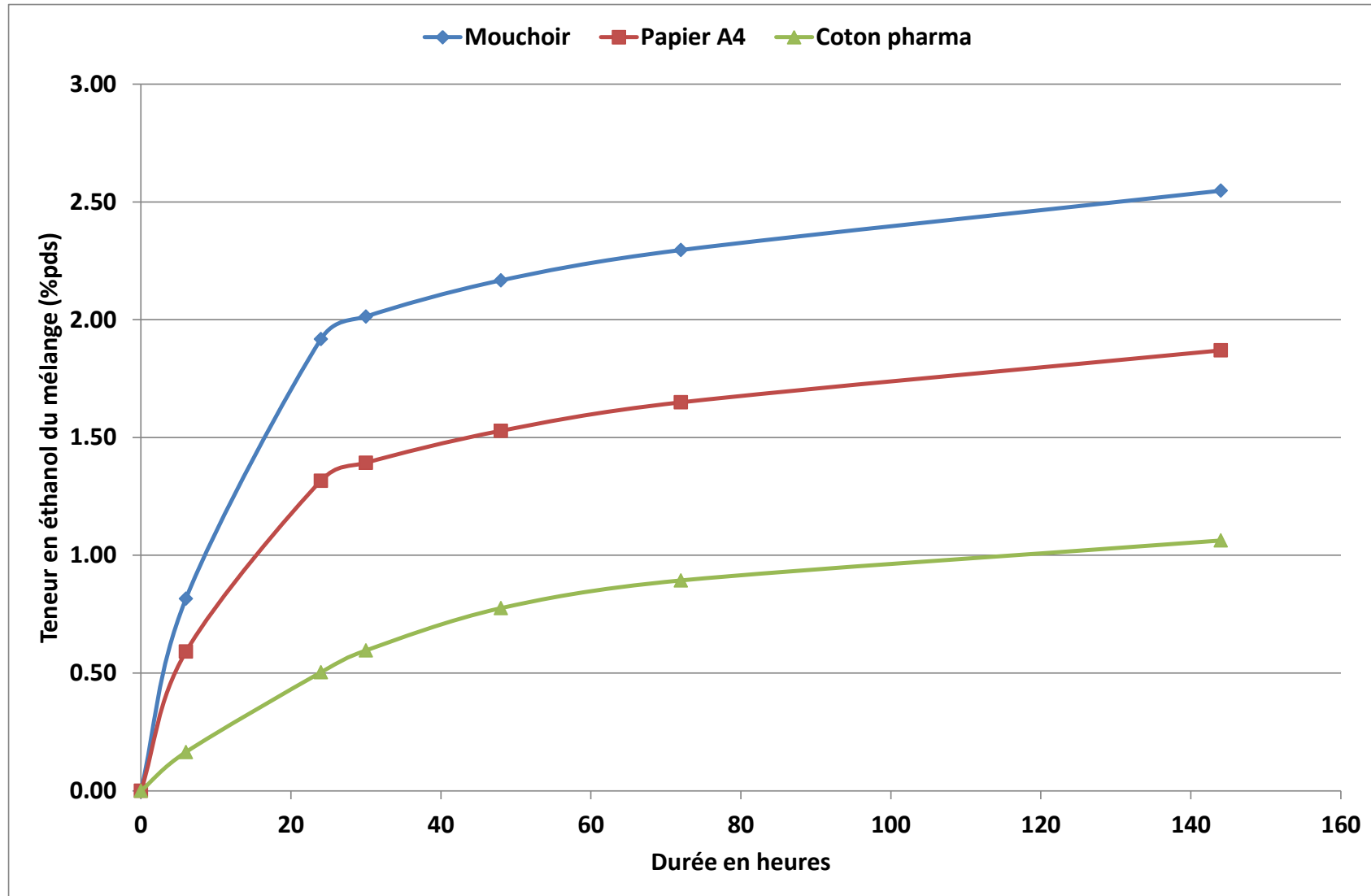
- Donc, si on considère que la perte de masse est liée à la perte en CO_2 issue de la fermentation, on a la relation :

$$m_{\text{éthanol produit}} = m_{\text{CO}_2 \text{ produit}} \frac{0.511}{0.489} = \text{perte de masse} \frac{0.511}{0.489}$$

- Donc à partir des pertes de masse et de la masse initiale en mélange, il est possible de déterminer une composition massique en éthanol

Exploitation et calculs

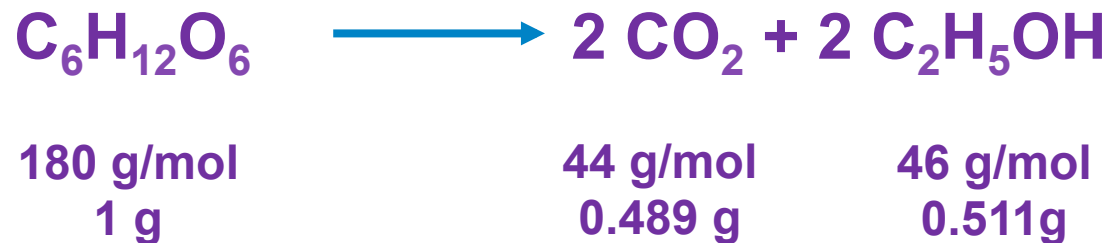
Réaction de fermentation (1/2)



Exploitation et calculs

Réaction de fermentation (2/2)

- De manière schématique, la réaction de fermentation être décrit comme suit :

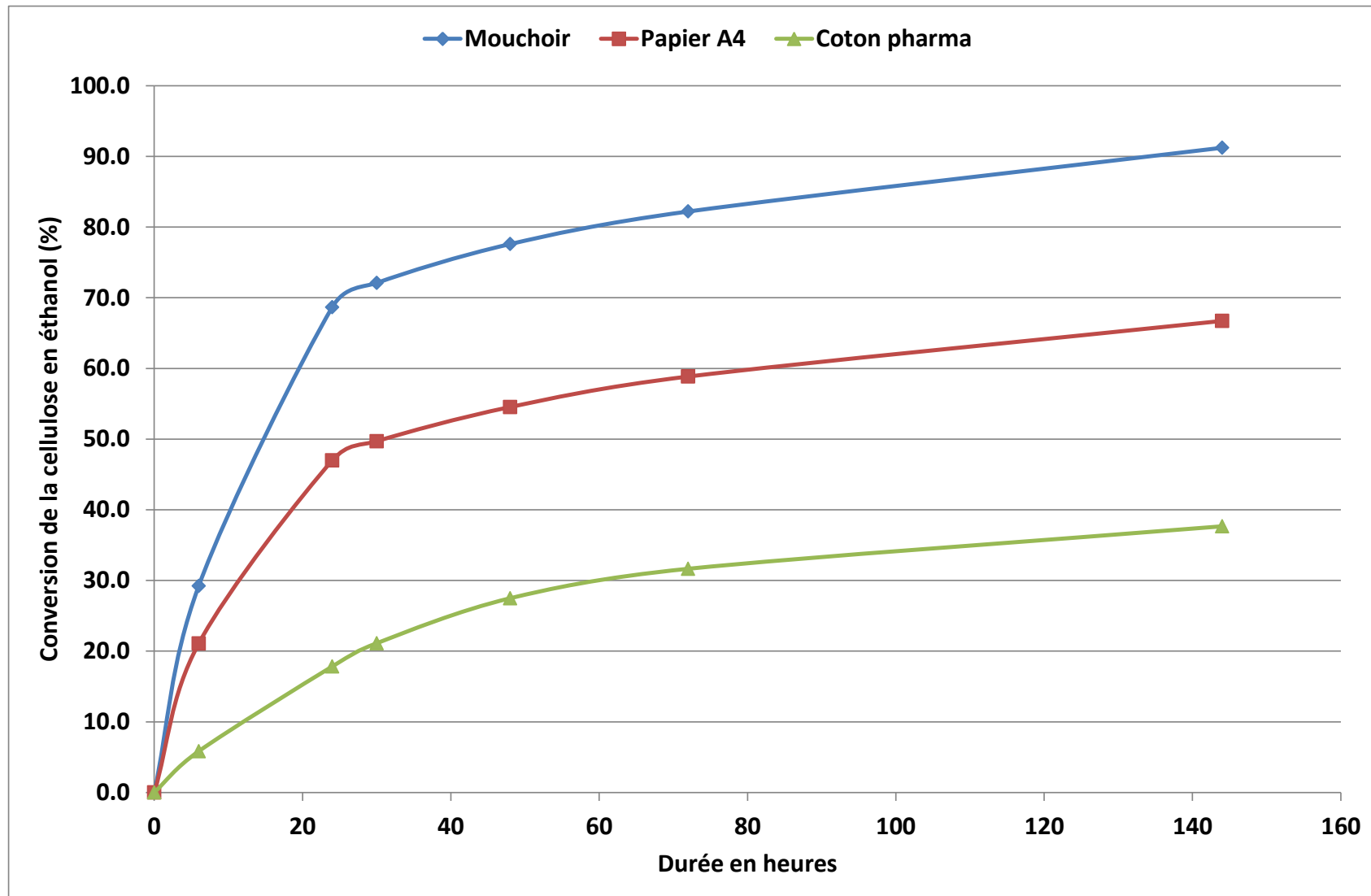


- Le rendement de la fermentation alcoolique n'est pas de 100% (formation de co-produits) → Rendement de Pasteur : 94.7 %
- Donc, les 0.75 g de substrat, supposé 0.75 g de cellulose, peut potentiellement donné 0.833 g de glucose, donc 0.403 g d'éthanol

- Conversion de la cellulose = $\frac{m. d' \text{éthanol formée (g)}}{m. d' \text{éthanol potentiellement formable (g)}} * 100$

Exploitation et calculs

Réaction de fermentation (2/2)



– Production d'éthanol 2G au labo –

Pour prolonger...

Pour prolonger...

- Il est possible de faire une pure hydrolyse (sans présence de levure). Auquel cas, ne pas mettre les levures et travailler à plus haute température (autour de 45-50°C)
 - Problème : Il faut pouvoir quantifier le glucose ...
 - Attention : A plus basse T, mettre un antibiotique (azide de potassium) sinon risque de démarrer une SSF sans le vouloir (surtout si spores de levure dans le labo)
- Il est possible d'étudier la SSF en jouant sur les conditions opératoires (température, pH, ajout de substrat petit à petit), sur la nature du substrat ou sur le choix du cocktail enzymatique.
- Il est possible de rajouter des produits de réaction (glucose, éthanol) en début de réaction pour voir les effets inhibiteurs de ces produits sur la réaction d'hydrolyse
- Rappel : En mode SSF, la cinétique de production de l'éthanol correspond à la cinétique d'hydrolyse, les levures consommant le glucose de manière infiniment rapide.



Innover les énergies

www.ifpenergiesnouvelles.fr