

Université de Sherbrooke
Faculté de génie
Département de génie chimique et génie biotechnologique

Optimisation de production de bioéthanol à partir d'hydrolysats de matière lignocellulosiques, de l'échelle laboratoire à la plateforme pilote

Mémoire de maîtrise
Spécialité : Génie chimique

Pierre-Olivier CORCOS

Jury :
Jean-Michel Lavoie (directeur)
Esteban Chornet (comité d'encadrement)
Denis Groleau (rapporteur)

Résumé

La Chaire de Recherche Industrielle en Éthanol Cellulosique de l'Université de Sherbrooke (CRIEC) et ses partenaires industriels ont établi une collaboration dans le but de développer un procédé de production de bioéthanol à partir d'hydrolysats de matière lignocellulosique. Le présent projet de recherche porte précisément sur l'optimisation de la fermentation alcoolique d'hydrolysats celluloses et hémicellulosiques provenant de biomasse mixte, de l'échelle laboratoire à la plateforme pilote.

Ce projet s'inscrit dans la vague mondiale de recherche en biocarburants de 2^e génération. En effet, à l'heure où la baisse de la dépendance au pétrole est devenue un réel enjeu pour tous, le bioéthanol s'est taillé une place de choix comme carburant alternatif. Le bioéthanol de 2^e génération est produit à partir de matières lignocellulosique, provenant de résidus ou de cultures n'entrant pas en compétition pas avec les ressources de l'agriculture vivrière. Renversant ainsi le paradigme du bioéthanol-grain de 1^{ère} génération. Les défis de la production d'éthanol lignocellulosique sont que les microorganismes fermentaires traditionnels ne peuvent pas fermenter les pentoses tels que le xylose (2^e sucre en importance dans la matière lignocellulosique) et que les procédés d'hydrolyses chimiques utilisés pour la saccharification de la lignocellulose engendrent des inhibiteurs pouvant diminuer les rendements de ces biocatalyseurs. Vu les larges débouchés économiques, sans oublier les gains environnementaux et sociaux, la communauté scientifique travaille, depuis les années 90, à produire entre autres de nouveaux biocatalyseurs pouvant efficacement faire la conversion lignocellulose-à-éthanol. Tout l'arsenal du génie génétique a été exploité afin de créer une nouvelle souche recombinante pouvant satisfaire aux exigences d'un procédé industriel. À ce jour, il existe plusieurs groupes de recherche ayant développé leur souche de levure ou bactérie génétiquement modifiée, potentiellement capable de répondre à ces exigences.

Ce rapport présente les résultats, conclusions et recommandations du projet de recherche. En utilisant une souche de levure génétiquement modifiée pour la co-fermentation du xylose et du glucose, et des hydrolysats lignocellulosiques fournis par les partenaires industriels du CRIEC, il a été possible d'investiguer les performances et les paramètres de fermentation afin de pouvoir démontrer la preuve de concept d'un procédé de production d'éthanol lignocellulosique. Ce projet de recherche se divise donc en 2 phases : 1) une optimisation des performances de fermentation du biocatalyseur à l'échelle laboratoire, dans des conditions environnementales simulant le futur procédé industriel, 2) une collaboration avec les partenaires industriels afin de fournir une analyse d'ingénierie préliminaire d'un procédé de fermentation des hydrolysats lignocellulosiques d'une capacité de 200 kL par cuvée. Les tests en laboratoire ont démontré une réduction appréciable des performances de fermentation de la souche recombinante étudiée, par rapport aux procédés de fermentation de 1^{ère} génération. L'analyse de rentabilité du procédé à capacité de 200 kL montre que le procédé n'est pas rentable, affichant un rendement approximatif de -7% sur une durée de 20 ans.

Mots clés :

*production éthanol
hydrolysats lignocellulosiques
fermentation hémicelluloses
échelle industrielle
ingénierie génétique
éthanol cellulosique*

Table des matières

Liste des figures	viii
Liste des tableaux.....	x
Lexique	xii
Liste des acronymes.....	xiii
1. Introduction	1
1.1. Plan du rapport	2
2. État de l'art.....	3
2.1. Structure de la matière lignocellulosique	3
2.2. Les hémicelluloses	5
2.3. Fermentation d'hydrolysats hémicellulosiques par voie microbienne.....	8
2.4. Capacité microbienne naturelle de conversion de la MLC	9
2.4.1. <i>E. coli</i>	9
2.4.2. <i>Z. mobilis</i>	9
2.4.3. <i>P. stipitis</i>	9
2.4.4. <i>S. cerevisiae</i>	10
2.4.5. Autres candidats	10
2.5. Métabolismes des hémicelluloses et de ses monomères.....	10
2.5.1. Transport cellulaire	10
2.5.2. Les voies métaboliques saccharolytiques	11
2.5.3. Le métabolisme du xylose.....	14
2.5.4. Le métabolisme de l'arabinose	15
2.6. Ingénierie métabolique et évolutive appliquée aux microorganismes afin d'optimiser la fermentation des hydrolysats de MLC.....	16
2.6.1. <i>E. coli</i>	17
2.6.2. <i>Z. mobilis</i>	18
2.6.3. <i>S. cerevisiae</i> : la voie redox et la voie d'isomérisation.....	20
2.7. Les inhibiteurs ubiquitaires des hydrolysats lignocellulosiques	21
2.7.1. Origine et nature des inhibiteurs	21
2.7.2. Effets inhibiteurs des acides organiques faibles	24

2.7.3.	Effets inhibiteurs des furanes	24
2.7.4.	Effet des phénoliques	25
2.7.5.	Effets synergétiques.....	26
3.	Survol des principales conclusions tirées des expérimentations à l'échelle laboratoire	26
3.1.	Impact du ratio et de la concentration initiale en sucres	26
3.2.	Sensibilité accrue du catabolisme du xylose aux inhibiteurs de fermentation	29
3.3.	L'inoculum, le stress et les performances.....	32
3.3.1.	Évolution du protocole de propagation.....	32
3.3.2.	Effet du stress subit durant l'étape de propagation sur les performances de fermentation.	35
3.3.3.	Conclusion.....	38
3.4.	Cinétiques de croissance de LOGM1	39
3.4.1.	Protocole.....	39
3.4.2.	Résultats.....	40
3.4.3.	Conclusions	44
3.5.	Conclusion générale des expérimentations à l'échelle laboratoire.....	44
4.	Ingénierie préliminaire du procédé LCH	45
4.1.	Vue d'ensemble du procédé LCH : choix des étapes de transformation.....	45
4.1.1.	Production des hydrolysats lignocellulosiques : S&H vs Centralisé.....	46
4.1.2.	Source de sucres pour la propagation : propagation dans les LCH ou dans le mout de maïs	47
4.1.3.	Propagation dans un propogateur dédié ou directement dans le fermenteur	48
4.1.4.	Filtration du mout de maïs.....	48
4.1.5.	Fermentation type cuvée ou cuvée alimentée	49
4.1.6.	Mélange de la bière du procédé LCH à la bière du procédé MG	50
4.1.7.	Unité de centrifugation.....	50
4.1.8.	Recyclage des eaux usées	50
4.1.9.	Traitement des eaux usées	51
4.2.	Sélection des 6 configurations du procédé LCH à l'étude	52
4.3.	Résumé du procédé	53
4.3.1.	Transport et stockage de la MLC	53
4.3.2.	Production et stockage des LCH.....	53

4.3.3.	Transport des LCH	54
4.3.4.	Mélange des intrants à la propagation	54
4.3.5.	Propagation.....	54
4.3.6.	Mélange des intrants à la fermentation	54
4.3.7.	Conditionnement des intrants à la fermentation	55
4.3.8.	Fermentation	55
4.3.9.	Distillation (purification de l'éthanol).....	55
4.3.10.	Filtration membranaire (purification de l'éthanol).....	56
4.3.11.	Nettoyage en place (CIP).....	56
4.3.12.	Stockage des eaux usées.....	57
4.3.13.	Traitement des eaux usées	57
4.4.	Tableaux des hypothèses et bases de calculs	58
4.4.1.	Tableau des hypothèses de design et des bases de calculs.....	58
4.4.2.	Cinétiques de propagation.....	62
4.4.3.	Cinétiques de fermentation	63
4.4.4.	Tableau des écoulements	64
4.4.5.	Tableau de correspondance des flux (entre les D-E et la simulation ChemCAD)	65
4.5.	Séquence complète d'un cycle de fermentation (cédule cuvée)	67
4.6.	Diagrammes	72
4.6.1.	Diagramme entrée-sortie.....	72
4.6.2.	Diagramme des écoulements	72
4.7.	Simulation ChemCAD	79
4.7.1.	Vue d'ensemble	80
4.7.2.	Production et transport des LCH.....	80
4.7.3.	Propagation.....	81
4.7.4.	Fermentation	82
4.7.5.	Purification de l'éthanol.....	84
4.7.6.	Remplissage des cuves tampon et recyclage des eaux usées.....	85
4.7.7.	Traitement des eaux usées	86
4.8.	Dimensionnement des équipements.....	87
4.8.1.	Propagateur	87
4.8.2.	Cuve de mélange (Blend Tank)	88

4.8.3.	Fermenteur	88
4.8.4.	Épurateur de gaz (Scrubber)	88
4.8.5.	Échangeur de chaleur (HE_01).....	89
4.8.6.	Injecteur de vapeur (Inject_01)	89
4.8.7.	Cuves tampons.....	89
4.8.8.	Pompes.....	91
4.8.9.	Soufflantes	96
4.8.10.	Distillation	98
4.8.11.	Filtration membranaire.....	98
4.8.12.	Traitement des eaux usées	99
4.9.	Tableau de dimensionnement des équipements	100
5.	Analyse économique.....	103
5.1.1.	Tableau des bases de calculs concernant le TCI	103
5.1.2.	Coûts des équipements.....	105
5.2.	Tableau des bases de calculs concernant le TPC et les revenus	108
5.3.	Analyse économique de base des 6 configurations.....	108
5.4.	Analyse de sensibilité.....	112
5.5.	Analyse de mise à l'échelle 100x du procédé LCH	116
5.6.	Limites du modèle.....	121
6.	Conclusion et recommandations du projet de recherche	122
7.	Bibliographie	123
8.	Annexe A : Tableau synthèses des biocatalyseurs.....	138
9.	Annexe B : Protocoles d'analyses et aide à la compréhension des figures pour les résultats expérimentaux.....	142
9.1.	Méthode d'analyse des données brutes.....	142
9.1.1.	Gravimétrie	142
9.1.2.	HPLC	142
9.1.3.	Concentration cellulaire.....	142
9.2.	Explication des tableaux et figures standardisés.....	142
9.2.1.	Explication des tableaux détaillant les protocoles expérimentaux	143
9.2.2.	Explication des figures de suivi de fermentation.....	144
9.2.3.	Explication du tableau des performances.....	144

10.	Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20.....	147
10.1.	Regroupement#1 : Essais portant sur la composition du milieu de fermentation.....	147
10.1.1.	Série d'essais #1 : Effet du ratio glucose/xylose sur les performances de fermentation .	147
10.1.2.	Série d'essais #2 : Effet du Thin Stillage sur les performances de fermentation.....	151
10.1.3.	Série d'essais #3 : Effet de la concentration initiale en sucres sur les performances de fermentation	155
10.1.4.	Série d'essais #6 : Effet de la taille de l'inoculum sur les performances de fermentation.....	158
10.1.5.	Série d'essais #7 : Effet de la concentration en urée sur les performances de fermentation	162
10.1.6.	Série d'essais #8 : Effet de la source de carbone (glucose vs xylose) lors de la propagation sur les performances de fermentation	166
10.1.7.	Série d'essais #9 : Effet du Thin Stillage sur les performances de fermentation d'hydrolysats celluloseux	169
10.1.8.	Série d'essais #10 : Effet d'ajout de LIQ aux hydrolysats hémicelluloseux sur les performances de fermentation	173
10.1.9.	Série d'essais #20 : Détermination des cinétiques de propagation.....	175
10.2.	Regroupement#2 – Influence des paramètres de fermentation sur les performances	175
10.2.1.	Série d'essais #15 : Comparaison du mode de fermentation : cuvée-alimenté vs cuvée	175
10.3.	Regroupement#3 – Impact des inhibiteurs sur les performances de fermentation	178
10.3.1.	Série d'essais #4 et #5 : Effet de l'acide acétique sur les performances de fermentation.....	178
10.3.2.	Série d'essais #11 : Effet d' NH_4SO_4 excessif sur les performances de fermentation	184
10.3.3.	Série d'essais #16 : Effet de la taille de l'inoculum sur l'inhibition de l'acide acétique et du furfural lors de fermentations	187
10.3.4.	Série d'essais #19 : Effet synergique de l'acide acétique et du 5-HMF sur les performances de fermentations	192
10.4.	Regroupement#4 – Impact des méthodes de détoxifications des hydrolysats sur les performances de fermentation	198
10.4.1.	Série d'essais #12 : Méthodes de détoxification des hydrolysats (investigation préliminaire).....	198
10.4.2.	Série d'essais #13 : Méthodes de détoxification des hydrolysats (investigation préliminaire; suite).....	203
10.4.3.	Série d'essais #14 : Méthodes de détoxification des hydrolysats (investigation principale) .	206

10.4.4.	Série d'essais #17 : Aération du milieu de fermentation comme méthode atténuant l'effet des inhibiteurs ubiquitaires	208
10.4.5.	Série d'essais #18 : Le contrôle du pH comme méthode atténuant l'effet des inhibiteurs ubiquitaires	210
11.	Annexe D : Tableau des écoulements.....	213
12.	Annexe E : Schéma des cédules Cuvée pour les 6 configurations à l'étude	223
13.	Annexe F : Consommation électrique du procédé LCH	229
14.	Annexe G : Détail des coûts opérationnels et des revenus du procédé LCH.....	230
15.	Annexe H : Détails des analyses économiques pour les 6 configurations du procédé LCH.....	235
15.1.	Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #1.....	235
15.2.	Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #2.....	238
15.3.	Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #3.....	241
15.4.	Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #7.....	244
15.5.	Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #8.....	247
15.6.	Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #9.....	250
16.	Annexe I : Dossiers de simulation du procédé LCH.....	253

Liste des figures

Figure 2.1: Avenues possibles de production de divers sous-produits dérivés de la matière lignocellulosique (adapté de [Kuhad et Singh, 2007] p.11)	4
Figure 2.2: Les composantes principales de la lignocellulose [Rubin, 2008].....	4
Figure 2.3: Les différentes classes d'hémicelluloses, tel que présenté par Ebringerova et al., 2005.....	6
Figure 2.4: Voies fermentatives des saccharides dérivés des hydrolysats lignocellulosiques des 4 biocatalyseurs d'intérêt : <i>E. coli</i> , <i>Z. mobilis</i> , <i>P. stipitis</i> et <i>S. cerevisiae</i> [F. M. Girio et al., 2010].	13
Figure 2.5 : Présentation schématique des voies hétéro-fermentaires présentes chez <i>E. coli</i> et <i>Z. mobilis</i> [Ingram et al., 1999].....	17
Figure 2.6 : Chemin du catabolisme du xylose proposé chez les recombinants de <i>Z. mobilis</i> pour la fermentation des pentoses.....	19
Figure 2.7 : Composition approximative de la lignocellulose et ses dérivés.	21
Figure 3.1 : Productivité éthylique en fonction du ratio des sucres (série d'essais #1).	27
Figure 3.2: Données de suivi de fermentation pour le milieu testé ID# E20-1.....	40
Figure 3.3: Données de suivi de fermentation pour le milieu testé ID# E20-2.....	40
Figure 3.4: Données de suivi de fermentation pour le milieu testé ID# E20-3.....	40
Figure 3.5: Corrélation entre les unités de concentration cellulaire « g-cells/ml » et « x10 ⁸ cells/ml.....	41
Figure 4.1: Diagramme de transformation rudimentaire du procédé LCH.....	45
Figure 4.2: Diagramme hiérarchique montrant la pluralité des configurations envisageables pour le procédé LCH.....	46
Figure 4.3: Diagramme hiérarchique détaillant les 6 configurations du procédé LCH à l'étude.....	52
Figure 4.4: Exemple de cédule cuvée. Ici, la cédule d'un cycle cuvée complet pour la configuration #1 est présentée.....	68
Figure 4.5: Diagramme entrée-sortie du procédé LCH.....	72
Figure 4.6 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #1 (S&H / Recyclage des eaux / Sans traitement)	73
Figure 4.7 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #2 (S&H / Recyclage des eaux / Avec traitement).	74
Figure 4.8 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #3 (S&H / Sans recyclage / Avec traitement).....	75
Figure 4.9 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #7 (Centralisé / Recyclage des eaux / Sans traitement).	76
Figure 4.10 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #8 (Centralisé / Recyclage des eaux / Avec traitement).....	77
Figure 4.11 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #9 (Centralisé / Sans recyclage / Avec traitement).	78
Figure 4.12: Vue d'ensemble du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.....	80
Figure 4.13: Vue de l'étape de propagation du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.	81
Figure 4.14: Vue de l'étape de fermentation du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.....	82

Figure 4.15: Vue de l'étape de la purification de l'éthanol du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.	84
Figure 4.16: Vue de l'étape de stockage des eaux usées du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.	85
Figure 4.17 : Vue de l'étape de traitement des eaux usées du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.	86
Figure 5.1: Flux de trésorerie de la configuration #1 pour la totalité de vie du projet (22 ans).	109
Figure 5.2: Flux de trésorerie de la configuration #2 pour la totalité de vie du projet (22 ans).	109
Figure 5.3: Flux de trésorerie de la configuration #3 pour la totalité de vie du projet (22 ans).	110
Figure 5.4: Flux de trésorerie de la configuration #7 pour la totalité de vie du projet (22 ans).	110
Figure 5.5: Flux de trésorerie de la configuration #8 pour la totalité de vie du projet (22 ans).	111
Figure 5.6: Flux de trésorerie de la configuration #9 pour la totalité de vie du projet (22 ans).	112
Figure 9.1: Exemple de figure détaillant le suivi des substances importantes durant la fermentation... ..	144
Figure 12.1: Cédule cuvée pour la configuration #1.	223
Figure 12.2: Cédule cuvée pour la configuration #2.	224
Figure 12.3: Cédule cuvée pour la configuration #3.	225
Figure 12.4: Cédule cuvée pour la configuration #7.	226
Figure 12.5: Cédule cuvée pour la configuration #8.	227
Figure 12.6: Cédule cuvée pour la configuration #9.	228

Liste des tableaux

Tableau 2.1: Aperçu de plusieurs types de polymères d’hémicelluloses, ainsi que leurs chaînes latérales les plus communes.....	7
Tableau 2.2: Composition des monomères d’hémicellulose provenant de divers végétaux.....	8
Tableau 2.3 : Substances inhibitrices retrouvées dans les LCH*	23
Tableau 3.1 : Analyse de l’impact du ratio et de la concentration initiale en sucres sur les performances de fermentation*	28
Tableau 3.2 : Diminution sur les performances de fermentation des milieux contenant de l’HAc*.....	30
Tableau 3.3 : Diminution sur les performances de fermentations des milieux contenant du HMF*.....	31
Tableau 3.4 : Détails des protocoles de propagation de levures utilisés durant les diverses séries d'essais*	33
Tableau 3.5: Effet de la vitalité de l’inoculum sur les performances de fermentation (protocole #F vs #E)*	35
Tableau 3.6: Effet de la vitalité de l’inoculum sur les performances de fermentation (protocole #E vs #D)*	36
Tableau 3.7: Effet de la vitalité de l’inoculum sur les performances de fermentation (protocole #D vs #C)*	36
Tableau 3.8: Effet de la vitalité de l’inoculum sur les performances de fermentation (protocole #C vs #B)*	37
Tableau 3.9: Effet de la vitalité de l’inoculum sur les performances de fermentation (protocole #B vs #A)*	37
Tableau 3.10: Protocole des tests effectués dans le cadre de la série d'essais #20.....	39
Tableau 3.11: Résultats comparatifs de la concentration cellulaire des 3 milieux testés dans la série d'essais #20.....	41
Tableau 3.12: Tableau et figure du modèle de croissance cellulaire développé pour le milieu de fermentation E20-1.....	42
Tableau 3.13: Tableau et figure du modèle de croissance cellulaire développé pour le milieu de fermentation E20-2.....	42
Tableau 3.14: Tableau et figure du modèle de croissance cellulaire développé pour le milieu de fermentation E20-3.....	42
Tableau 3.15: Modélisation de la corrélation entre le taux de croissance de LOGM1 et la concentration initiale en levure dans le milieu de fermentation.....	43
Tableau 3.16: Coefficients des réactions métaboliques durant la propagation, obtenus par expérimentation et exprimés sur une base massique.....	43
Tableau 4.1: Hypothèses de design et bases de calculs, incluant les explications de leur choix	58
Tableau 4.2: Détermination des cinétiques métaboliques de propagation.	63
Tableau 4.3: Détermination des cinétiques de fermentation.	64
Tableau 4.4: Correspondance entre les #ID des flux des diagrammes d’écoulement et des flux de la simulation ChemCAD du procédé LCH.....	65

Tableau 4.5: Composition et débit maximum de la production de gaz lors de la fermentation Gén1.5. ...	88
Tableau 4.6 : Tableau de dimensionnement des équipements. Les spécifications de chacun des équipements designer à la section 4.8 y sont résumées.	100
Tableau 5.1: Répartition des coûts d'investissement en capital requis afin de construire et démarrer le procédé LCH.	103
Tableau 5.2: Coûts d'achat des équipements du procédé LCH.	105
Tableau 5.3: Détails des coûts composant le TPC pour la configuration #2 (exprimés en % du TPC total et en % des revenus).	113
Tableau 5.4: Détails des coûts composant le TPC pour la configuration #8 (exprimés en % du TPC total et en % des revenus).	114
Tableau 5.5: Analyse des coûts opérationnels et des revenus du procédé MG, rapportés en \$/m ³ de volume de fermentation.	115
Tableau 5.6: Analyse des coûts opérationnels et revenus du procédé LCH, rapportés en \$/m ³ de volume de fermentation.	116
Tableau 5.7: Détails du calcul du TCI du procédé LCH mise à l'échelle 100x.	118
Tableau 5.8: Détails des revenus du procédé LCH mis à l'échelle 100x.	119
Tableau 5.9: Détails d calcul d TPC du procédé LCH 100x.	120
Tableau 8.1 : Synthèse des souches de biocatalyseurs les plus efficaces retrouvées dans la littérature, pour la fermentation des hydrolysats lignocellulosiques.	138
Tableau 9.1: Exemple du premier tableau détaillant le protocole expérimental. Tableau détaillant les paramètres communs des différents milieux de fermentation testés durant la série d'essais analysée.	143
Tableau 9.2: Exemple du deuxième tableau détaillant le protocole expérimental. Tableau détaillant les paramètres propres à chacun des milieux de fermentation testés durant la série d'essais analysée.	143
Tableau 9.3: Exemple d'un tableau standardisé compilant des performances de fermentation d'une série d'essais.	144
Tableau 11.1: Tableau des écoulements de la simulation ChemCAD du le procédé LCH	213
Tableau 13.1: Détails de la consommation électrique des équipements du procédé LCH utilisée dans l'analyse économique.	229
Tableau 14.1 : Bases de calcul et hypothèses quant aux différents coûts opérationnels du procédé LCH.	230
Tableau 14.2: Détails des revenus générés par le procédé LCH.	234

Lexique

Biocatalyseur :	Aux fins de ce rapport, est un microorganisme utilisé dans un procédé biologique afin de convertir un substrat en un produit désiré.
Bioéthanol :	Éthanol produit par un procédé biologique, à l'opposé d'un procédé de synthèse chimique.
Gène sauvage :	Gène retrouvé naturellement dans le génome de l'individu.
Gène hétérologue :	Gène d'origine exogène à l'espèce de l'organisme en question.
Moût de maïs hydrolysé :	Réfère au substrat du procédé de fermentation maïs-grain d'Éthanol Greenfield, soit un mout de maïs, mais ayant subi une hydrolyse complète de son contenu en amidon.
Procédé Génération 1.5 (Gén1.5) :	Le procédé dit de génération 1.5 est constitué de la fermentation d'une source de sucre provenant de l'agriculture vivrière, mais autre que le maïs. Ce procédé est prévu être testé à l'usine d'ETG Varennes, en utilisant les mêmes équipements que le procédé LCH.
Productivité éthylique glucolytique :	Taux de production d'éthanol durant la phase de la fermentation où seulement le glucose est consommé par les microorganismes.
Productivité éthylique xylolytique :	Taux de production d'éthanol durant la phase de la fermentation où seulement le xylose est consommé par les microorganismes.
Productivité éthylique :	Ratio de la quantité d'éthanol sur le temps de production.
Ratio glucose:xylose ou xylose:glucose :	Est le ratio de concentration des sucres en solution, rapporté sur 100 g/L. Par exemple, un ratio glucose :xylose de 30 :70 signifie que 30% des sucres en solution sont du glucose.
Rendement éthylique :	Est le rendement de la réaction métabolique sucre-à-éthanol, rapporté sur le maximum théoriquement possible. Le maximum théorique possible pour le glucose et xylose est de 0.5114 g-éthanol / g-sucres consommés. Par exemple, si durant une fermentation, le rendement réel est de 0.43 g-éthanol / g-sucres consommés, alors le rendement éthylique est de 84%.
Souche recombinante :	Souche microbienne provenant du génie génétique.
Taux de bourgeonnement cellulaire :	Est le ratio de la quantité de cellules en bourgeonnement sur la quantité de cellules vivantes.
Vitalité cellulaire :	Est le ratio de la quantité de cellules vivantes (cellules simples + cellules en bourgeonnement) sur la quantité totale de cellules (cellules simples + cellules en bourgeonnement + cellules mortes).

Liste des acronymes

5-HMF	Hydroxyméthylfurfural
AcG	Groupement acétyle
ADH	Alcool déshydrogénase (enzyme de la glycolyse)
ADH	Alcool déshydrogénase (enzyme)
AGX	(Arabino)glucoroxnoylanes
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase (enzyme de la glycolyse)
arabinogalactanes	L-arabino-D-galactanes
AX	Arabinoxylanes
Biométhanisation Varennes	Réfère au futur procédé de biométhanisation des déchets de la ville de Varennes au présent site de l'usine d'Éthanol Greenfield Varennes
C-1 à C-5	Désigne la numérotation des carbones à partir du carbone anomérique chez les saccharides
CAPEX	Dépenses d'Investissement (Capital Expenditure)
CHX	Hétéroxyanes Complexes
CIP	Nettoyage en place (Clean In Place)
CLP	Chaîne linéaire principale
COD	Demande chimique en oxygène
CRIC	Chaire de Recherche Industrielle en Éthanol Cellulosique de l'Université de Sherbrooke
DDGS	Drêches de distillerie sèche (Dried Distiller's grain)
D-E	Diagramme d'écoulement
ED	Voie glycolytique d'Entner-Doudoroff
EMP	Voie de la glycolyse d'Embden-Meyerhof-Parnas
ETG	Distillerie maïs-grain d'Éthanol Greenfield à Varennes
Eth	Éthanol
F-Beer	Bière de fermentation (contenu du fermenteur suite à la complétion de l'étape de fermentation)
F-Broth	Bouillon de fermentation: Composé de la propagation complétée (P-Beer) et du P-Worth
FDA	Food and Drug Administration (Gouvernement des États-Unis)
F-Worth	Milieu de fermentation (sans la propagation)
GaM	Galactomannanes
GAX	(Glucorono)arabinoxylanes
GGM	Galactoglucomannanes
Glu	Glucose
GM	Glucomannanes
GRAS	Organisme généralement considéré comme sécuritaire (generally regarded as safe), appellation de la FDA
GX	Glucoroxylanes

HAc	Acide acétique
HC	Hydrolysats cellulosiques
HH	Hydrolysats hémicellulosiques
HLC	Hydrolysats lignocellulosiques
HMF	5-(hydroxyméthyl)furfural
LCH	Hydrolysats lignocellulosiques (Lignocellulosic Hydrolysates)
LIQ	Moût de maïs hydrolysé
LOGM1	Levure génétiquement modifiée utilisée durant les tests à l'échelle laboratoire de ce projet de recherche
mannanes	D-mannoglycans
MeGlcA	acide 4-O-méthyle- α -D-glucuronique (ou 4-O-méthyle- α -D-glucuronate), avec possibilité d'être sous sa forme pyranoside (MeGlcAp)
MG	Maïs-grain
MLC	Matière lignocellulosique
MLC (ou LCM)	Matière lignocellulosique, biomasse cellulose
MS	Milieu de fermentation synthétique
OGM	Organisme génétiquement modifié
OPEX	Dépenses d'opération (Opération Expenditure)
P-Beer	Bière de propagation (contenu du propagateur suite à la complétion de l'étape de propagation)
PDC	Pyruvate décarboxylase (enzyme)
PDH	Pyruvate déshydrogénase (enzyme de la glycolyse)
PFL	Pyruvate-formate-lysase (enzyme)
PM	Poids moléculaire
PPP	Voie métabolique des pentoses phosphates
Procédé LCH (ou LCH process)	Réfère au procédé de fermentation des hydrolysats lignocellulosiques à l'échelle industrielle (200 kL) tel que défini dans ce projet de recherche
Procédé MG	Réfère au procédé de fermentation maïs-grain présentement opéré à l'usine d'Éthanol Greenfield Varennes
PW	Eaux de procédé (Process Waters), réfère aux eaux usées du procédé LCH ayant été traitées par le procédé de Biométhanisation Varennes
P-Worth	Milieu de propagation
RKI	Ribose-5-phosphate isomérase (ou phosphopentose isomérase)
ROI	Retour sur l'investissement
RPE	Ribulose-5-phosphate épimérase
T.O.	Oxydateur Thermique présent dans le procédé MG à ETG.
TAL	Transaldolase
TCA	Cycle des Acides Tricarboxyliques (Cycle de Krebs)
TKT	Transcétolase
UA	Acide uronique
UDES	Université de Sherbrooke

UDS	Solides dissous inconnus (Unknown Dissolved Solids). Réfère aux solides dissous présents dans le milieu de fermentation du procédé LCH, mais ne pouvant pas être précisément définis
USS	Solides en suspensions inconnus (Unknown Suspended Solids). Réfère aux solides non solubles présents dans le milieu de fermentation du procédé LCH, mais ne pouvant pas être précisément définis
VOCx	Composés organiques volatils
WCIP	Eaux usées provenant du système de nettoyage en place du procédé LCH (Waste Clean In Place)
WW	Eaux usées du procédé LCH
XDH	Xylitol déshydrogénase
XI	Xylose isomérase
XK	Xylulokinase
XR	Xylose réductase
Xyl	Xylose
xylanes	D-xyloglycanes
xyloglucanes	D-xylo-D-glucanes
YEN	Nutriments essentiels aux levures (Yeast Essentiel Nutrients). Réfère aux nutriments essentiels à la fermentation des LCH, qui doivent être ajoutés au milieu de fermentation
YUD	ratio Extrait de levure:Urée:Dextrose (Yeast Extract:Urea:Dextrose)
α-D-GalA	Acide α -D-galacturonique (α -D-galacturonate)
α-D-GlcA	Acide α -D-glucuronique (ou α -D-glucuronate)
α-L-Ara	α -L-arabinose, s'il arbore sa forme furanoside α -L-Araf, s'il arbore sa forme pyranoside α -L-Arap
α-L-Fuc	α -L-fructose, s'il arbore sa forme furanoside α -L-Fucf, s'il arbore sa forme pyranoside α -L-Fucp
α-L-Rha	α -L-rhamnose, s'il arbore sa forme furanoside α -L-Rhaf, s'il arbore sa forme pyranoside α -L-Rhap
β(1-4), α(1-2) et α(1-3)	Désigne le lien glycosidique existant entre deux saccharides. α et β désignant le stéréo-isomère et les chiffres désignant les carbones impliqués dans la liaison
β-D-Gal	β -D-galactose, s'il arbore sa forme furanoside β -D-Galf, s'il arbore sa forme pyranoside β -D-Galp
β-D-Glc	β -D-glucose, s'il arbore sa forme furanoside β -D-Glcf, s'il arbore sa forme pyranoside β -D-Glcp
β-D-Man	β -D-mannose, s'il arbore sa forme furanoside β -D-Manf, s'il arbore sa forme pyranoside β -D-Manp
β-D-Xyl	β -D-xylose, s'il arbore sa forme furanoside β -D-Xylf, s'il arbore sa forme pyranoside β -D-Xylp
β-glucanes	β -D-glucanes à liaison mixte

1. Introduction

Ce projet vise l'optimisation de la production de bioéthanol à partir d'hydrolysats de matière lignocellulosiques (MLC), de l'échelle laboratoire à la plateforme pilote, s'inscrivant ainsi dans la vague mondiale de recherche en biocarburants de 2^e génération. En effet, à l'heure où la baisse de la dépendance au pétrole est devenue un réel enjeu pour tous, le bioéthanol s'est taillé une place de choix comme carburant alternatif. Le bioéthanol de 2^e génération est produit à partir de MLC renouvelable, provenant de résidus forestier et agricole, ou encore de cultures non vivrières. Cette approche n'impose donc pas de pression sur l'agriculture vivrière, par contraste au bioéthanol de 1^{ère} génération provenant du maïs, du blé ou d'autres cultures destinées à l'alimentation humaine.

Les défis de la production d'éthanol lignocellulosique sont nombreux :

- 1) l'extraction et la saccharification des sucres composant la matrice lignocellulosique par procédé d'hydrolyse thermochimique ou enzymatique;
- 2) la minimisation de la formation d'inhibiteurs de fermentation lors du procédé d'hydrolyse;
- 3) l'ingénierie d'un microorganisme (biocatalyseur) capable de fermenter efficacement les pentoses (représentant ~40% des sucres totaux contenus dans la MLC) et les hexoses en éthanol sous des conditions industrielles;
- 4) la revalorisation des rejets du procédé industriel de production.

La portée globale à long terme des technologies de biocarburants est réellement de remplacer les carburants fossiles. En parallèle, l'opportunité d'affaire à court terme qu'offre le bioéthanol est tangible. Le marché visé est celui de l'éthanol comme additif à l'essence. En effet, la conscientisation mondiale sur les problèmes de changements climatiques et des autres conséquences de la pollution liée à l'exploitation des énergies fossiles ont permis l'essor des énergies vertes durant les dernières années. C'est dans cette optique que le Gouvernement du Canada a mis sur pied son Plan d'Action sur les Changements Climatiques 2006-2012 [MDDEP, 2006] où il s'engage à émettre un projet de loi requérant une moyenne de 5% de biocarburant dans l'essence vendue partout au Canada. Dans la même foulée, le Gouvernement du Québec s'est engagé à réduire d'ici 2020 ses émissions de gaz à effet de serre de 20% en dessous du niveau de 1990 [MDDEP, 2011]. En prenant en compte que la production d'éthanol à partir de MLC est carbone neutre, et peut, en plus, potentiellement créer un surplus d'électricité à l'usine de production; on s'aperçoit du potentiel que cette technologie offre pour aider à atteindre les objectifs ambitieux des deux gouvernements. Afin de mettre en contexte l'opportunité d'affaires que représente le bioéthanol, il faut analyser le marché qu'ouvrent ces nouvelles régulations. Un rapport gouvernemental de 2009 [Statistique Canada, 2009] peint le portrait énergétique du Canada et chiffre les ventes annuelles à la pompe à 43 MML au Canada. Le Québec quant à lui vend plus de 9.8 MML de litres d'essence à la pompe annuellement. Ainsi, en évaluant une moyenne de 10% de bioéthanol, cela génère un immense marché de près de 1 MML par années au Québec seulement.

C'est dans cette optique que l'Université de Sherbrooke (UDES), Éthanol Greenfield Inc. Varennes (ETG), Enerkem Inc., CRB Innovation Inc. (CRB) et le Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (MRNF) ont établi une collaboration dans le but de développer des procédés industriels de

production de bioéthanol, notamment à partir d'hydrolysats thermochimiques de MLC. En effet, dans une conférence de presse [CNW TELBEC Inc., 2012] dévoilant le projet dans son envergure complète, ETG a annoncé la construction d'une usine de production d'éthanol lignocellulosique d'une capacité de 40 millions de litres par années combinée à une usine de traitement thermochimique des déchets organiques solides municipaux à Varennes. Cet investissement représente un partenariat public-privé de plus de 90 M\$ (ETG, Enerkem et le MNR). En plus, un projet d'usine de biométhanisation des déchets putrescibles de la municipalité de Varennes (Biométhanisation Varennes) est en cours d'évaluation grâce à un partenariat liant ETG et le gouvernement municipal. Tout cela marque bien la volonté ferme des entreprises et du gouvernement québécois d'aller de l'avant avec ce projet.

C'est dans cette foulée que s'inscrit ce projet de recherche de recherche dirigé par la Chaire de Recherche Industrielle en Éthanol Cellulosique de l'université de Sherbrooke (CRIEC). Effectivement, au cœur du procédé se trouve, entre autres, la fermentation des hydrolysats lignocellulosiques (LCH), il est donc primordial d'optimiser cette étape. Ce projet se concentre sur la fermentation éthylique d'hydrolysats cellulose et hémicellulosiques provenant de MLC, de l'échelle laboratoire à la plateforme pilote. Le défi provient principalement du fait que les microorganismes fermentatifs traditionnels ne peuvent pas fermenter les pentoses, tel que le xylose (2^e sucre en importance dans la MLC après le glucose) et que les procédés d'hydrolyses chimiques utilisés par CRB pour la saccharification de la lignocellulose engendrent des inhibiteurs pouvant diminuer le rendement des microorganismes. Les objectifs de ce projet de recherche sont d'investiguer les performances du microorganisme fermentaire novateur sélectionné pour ce type de matière première (une souche de levure ici nommée LOGM1), d'en optimiser les performances de fermentation et de fournir une analyse technico-économique du futur procédé à l'échelle industrielle.

Ce projet apporte une contribution originale dans le domaine des distilleries de bioéthanol en investiguant les performances d'un nouveau microorganisme génétiquement modifié (LOGM1) et optimisé pour la fermentation de LCH. Suite aux multiples séries d'expérimentations présentées ici, il est possible de prédire quel est l'impact de la variation de composition des LCH, en l'occurrence ceux fournis par CRB, sur les performances de fermentation. Finalement, les données recueillies durant les tests, dans la littérature et auprès des fournisseurs ont permis d'élaborer une analyse d'ingénierie préliminaire. Cette analyse propose des estimations de faisabilité et de rentabilité d'un procédé à l'échelle industrielle personnalisées aux besoins d'ETG et de CRB.

1.1. Plan du rapport

Ce rapport a pour but de détailler les résultats, conclusions et recommandations obtenus au cours du projet de recherche de fermentation d'hydrolysats lignocellulosiques. Ce projet est composé de 2 phases principales : une phase d'expérimentation à l'échelle laboratoire et une phase de design d'ingénierie préliminaire d'un procédé de fermentation de LCH à l'échelle industrielle.

Ce rapport débute par un état de l'art visant spécifiquement le domaine de la fermentation des LCH. Cette revue de littérature propose une mise à jour dans le domaine de la composition moléculaire de la lignocellulose, ainsi que dans le domaine des microorganismes fermentaires (sauvages et génétiquement modifiés) utilisés comme biocatalyseurs de la réaction de conversion sucres-à-éthanol. Elle visera

également une compréhension de l'origine des inhibiteurs ubiquitaires aux LCH; ainsi que leur impact sur les performances de fermentation.

L'état de l'art sera suivi des principaux résultats des tests effectués en laboratoire. Plusieurs séries de tests ont été menées durant ce projet de recherche afin de quantifier les performances de fermentation des LCH par le microorganisme LOGM1. Ce dernier est une levure génétiquement modifiée en voie de commercialisation et qui présente un excellent espoir quant à son utilisation comme microorganisme principal dans le futur procédé industriel de fermentation des LCH d'ETG. Conséquemment, ces tests à l'échelle laboratoire permettent d'estimer les paramètres optimaux et les performances de bases de LOGM1; estimations qui pourront ensuite servir de base à une éventuelle mise à l'échelle industrielle tout en fournissant une bonne analyse de la rentabilité du procédé.

Finalement, ce rapport présente l'analyse technico-économique du procédé de fermentation des LCH à l'échelle industrielle; en fonction des spécifications de ETG et CRB. Ces derniers prévoient établir un partenariat se traduisant en la construction d'un procédé de fermentation des LCH de plusieurs centaines de milliers de litres par années avec comme pierre angulaire, un fermenteur d'une capacité de 200 kL. Une estimation de faisabilité technique et économique sera fournie à ETG et CRB via un rapport d'ingénierie préliminaire sommaire. Incluant la rationnelle établissant les étapes de transformation nécessaires au procédé, le dimensionnement des équipements et une analyse de rentabilité.

La conclusion de ce rapport, présentée à la toute fin de ce document, fera une synthèse des principales découvertes et recommandations émanant de ce projet de recherche.

2. État de l'art

2.1. Structure de la matière lignocellulosique

La lignocellulose est le matériau composant la paroi cellulaire des plantes. Cette biomasse est une ressource renouvelable extrêmement abondante et aux potentiels d'exploitation divers (Figure 2.1).

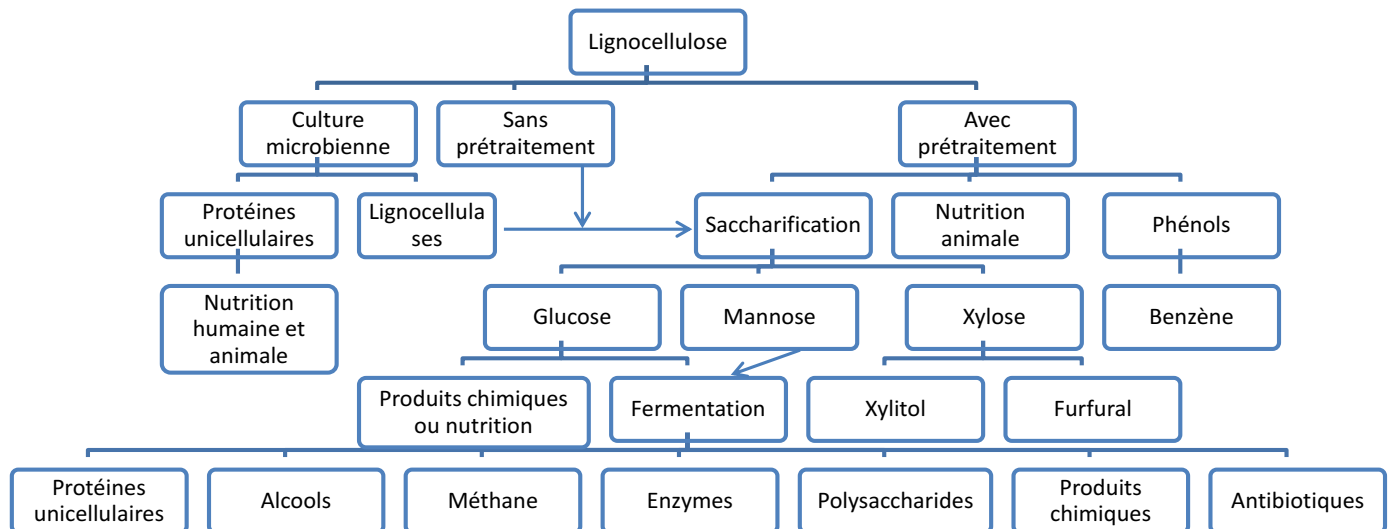


Figure 2.1: Avenues possibles de production de divers sous-produits dérivés de la matière lignocellulosique (adapté de [Kuhad et Singh, 2007] p.11)

Les composantes principales de la lignocellulose sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Figure 2.2) présentes en proportions relatives variant dépendamment de l'origine, des conditions de croissance et de la période de prélèvement de la biomasse. La cellulose, le constituant structural principal de la lignocellulose, est composée d'une longue chaîne linéaire de molécules de glucose liées par des liens glycosidique $\beta(1-4)$. Les hémicelluloses, secondes en importance, ne sont pas chimiquement bien définies, mais se présentent plutôt comme une famille de polysaccharides linéaires composés de différents pentoses ou hexoses arborant une grande diversité de courtes chaînes latérales. La lignine quant à elle, est un polymère tridimensionnel d'unités de phénylpropanoïde et peut être considérée comme la colle cellulaire assurant la force structurale de la plante, en plus de la protéger contre les pathogènes et les insectes [Rubin, 2008; Larouche, 1993].

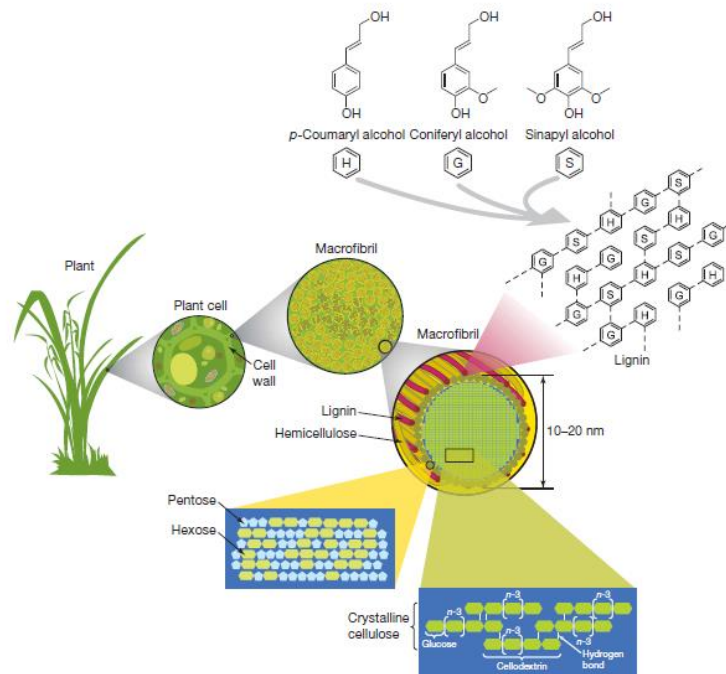


Figure 2.2: Les composantes principales de la lignocellulose [Rubin, 2008].

La Figure 2.2 présente la structure de la lignocellulose où la cellulose, le polymère le plus abondant de la lignocellulose, est un polymère linéaire d'unités de glucose liées par liens glycosidiques $\beta(1-4)$. Les ponts hydrogène entre les chaînes linéaires contribuent à la résistance de la cellulose cristalline. L'hémicellulose, le second polymère en importance, est composée d'une chaîne primaire de glucides à 5 ou 6 carbones et possède une variété de possibilités de courtes chaînes latérales. La lignine, le 3^e polymère en importance, est composée principalement d'unités phénylpropanoïdes issues de 3 alcools différents, soit l'alcool para-coumaryle (H), l'alcool trans-coniférylique (G) et l'alcool trans-sinapylique (S). La lignine est synthétisée par polymérisation de ces 3 molécules et leur ratio varie entre les différentes plantes, les différents tissus et même les différentes couches de la paroi cellulaire. La cellulose, l'hémicellulose et la lignine forment

une structure de microfibrilles, s'organisant en macrofibrilles et conférant ainsi à la plante ses propriétés structurales [Rubin, 2008; Larouche, 1993].

2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont une classe hétérogène d'hétéro-polymères à courtes chaînes latérales représentant 15-50% de la biomasse sèche des plantes et constitués majoritairement de pentoses (β -D-xylose, α -L-arabinose), d'hexoses (β -D-mannose, β -D-glucose, β -D-galactose) et/ou d'acides uroniques (acides α -D-glucuronique et α -D-galacturonique, souvent méthylés). De plus, certains autres sucres tels que l' α -L-rhamnose et l' α -L-fructose peuvent être présents en petite quantité, et les groupements hydroxyles des sucres peuvent être partiellement substitués par des groupements acétyles [F. M. Girio et al., 2010; Ebringerova et al., 2005].

Les hémicelluloses sont retrouvées dans tous les types de plantes, même dans les cultures vivrières graminées où ils représentent jusqu'à 30% de la biomasse totale [Godin et al., 2010; Scheller et Ulvskov, 2010; Lequart et al., 1999; Kadam et al., 2000; Jin et Chen, 2006]. Noter qu'il existe aussi des homopolymères de xylose (homoxylanes) retrouvés seulement chez certaines algues [F. M. Girio et al., 2010; Ebringerova et al., 2005].

Basé sur l'état présent des connaissances, les hémicelluloses peuvent être divisées en 5 classes générales définissant les différentes formes d'hétéro-polysaccharides retrouvées dans la paroi cellulaire : les xylanes, les mannanes, les xyloglucanes, les β -glucanes et les arabinogalactanes. Ces classes, ainsi que leurs sous-divisions, tel que rapporté par Ebringerova et al. (2005) sont présentées dans la Figure 2.3. Il est important de noter que les deux types d'hémicelluloses les plus significatifs dans le cadre de la production d'éthanol par procédé fermentatif sont les xylanes et les glucomannanes [F. M. Girio et al., 2010] (voir section sur l'origine biologique dans le Tableau 2.1).

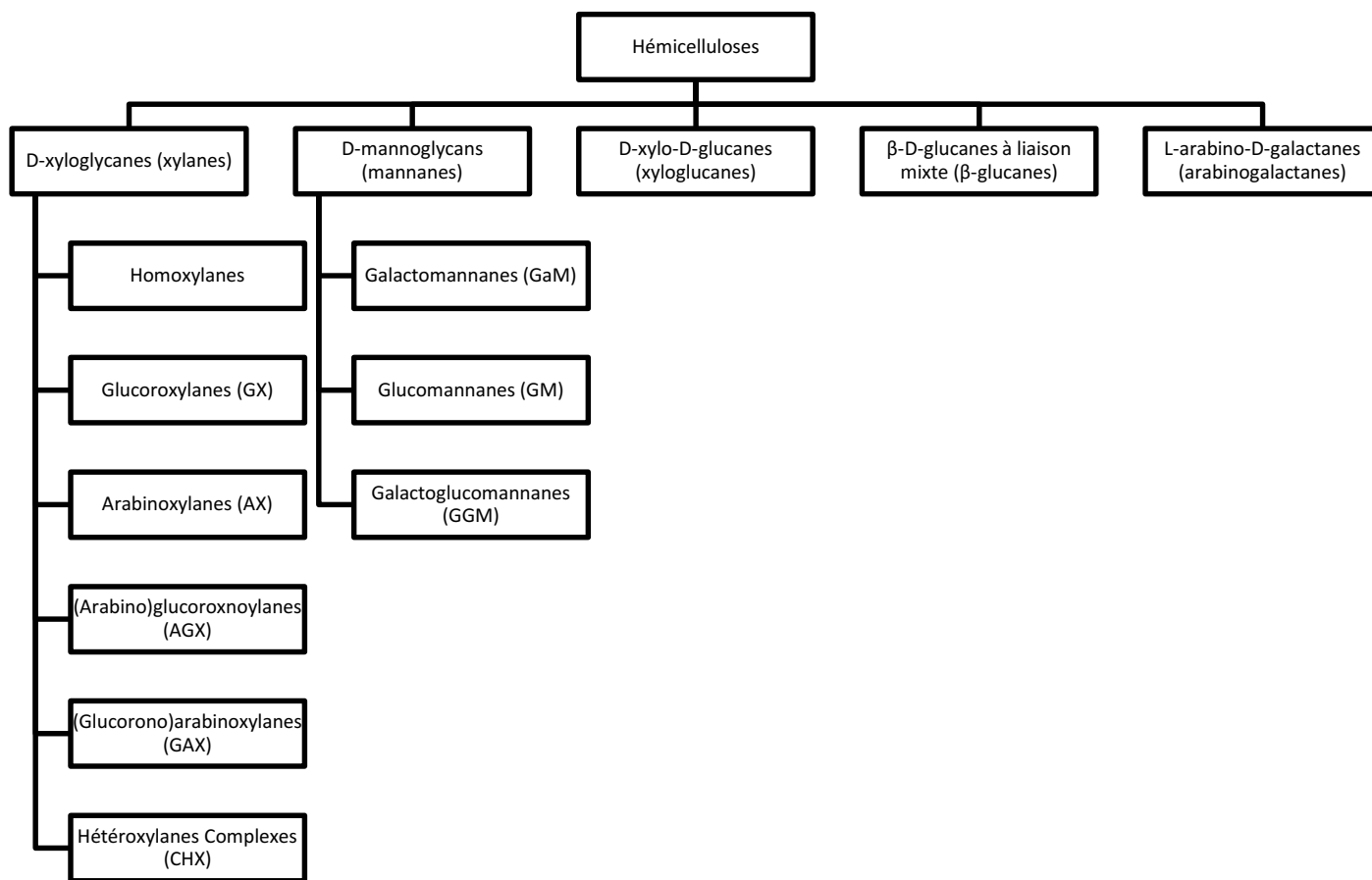


Figure 2.3: Les différentes classes d'hémicelluloses, tel que présenté par Ebringerova et al. (2005).

Le Tableau 2.1 répertorie la structure générale schématisée de plusieurs types de polysaccharides composant les hémicelluloses, arborant quelques-unes de leurs chaînes latérales plus communes. Lors du procédé d'hydrolyse de la MC, les hémicelluloses sont scindées en monomères. Plusieurs méthodes d'hydrolyse de la MLC existent; principalement subdivisé en procédés thermiques, chimiques et enzymatiques, ainsi qu'une multitude de combinaisons de ces dernières. Une fois hydrolysée, il est possible d'en quantifier la composition : Le Tableau 2.2 rapporte la proportion relative des monomères des hémicelluloses de différentes espèces végétales.

Tableau 2.1: Aperçu de plusieurs types de polymères d'hémicelluloses, ainsi que leurs chaînes latérales les plus communes

Type de polysaccharide	Origine biologique	Proportion (% masse sèche)	Unités			Représentation schématique
			Chaîne linéaire principale	Chaînes latérales	Liaison	
Arabinogalactanes	Bois mou	1-35	β -D-Galp	β -D-Galp α -L-Araf β -L-Arap	β (1-6) α (1-3) β (1-3)	
Xyloglucanes	Bois franc, herbacées	2-25	β -D-Glcp β -D-Xylp	β -D-Xylp β -D-Galp α -L-Araf α -L-Fucp Acétyle	β (1-4) α (1-3) β (1-2) α (1-2) α (1-2)	
(Galacto)glucomannanes	Bois tendres	10-25	β -D-Manp β -D-Glcp	β -D-Galp Acétyle	α (1-6)	
Glucomannanes	Bois tendres et durs	2-5	β -D-Manp β -D-Glcp			
Glucuronoxylanes	Bois durs	15-30	β -D-Xylp	MeGlcA Acétyle	α (1-2)	
(Arabino)glucuronoxylanes	Herbacées, céréales et bois tendres	5-10	β -D-Xylp	MeGlcA β -L-Araf	α (1-2) α (1-3)	
Arabinoxylanes	Céréales	0.15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf- Féruloye	α (1-2) α (1-3)	
(Glucurono)arabinoxylanes	Herbacées et céréales	15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf MeGlcA Acétyle	α (1-2) α (1-3)	
Homoxylanes	Algues		β -D-Xylp			

β -D-Galp; β -D-Glcp; β -D-Manp; β -D-Xylp; β -L-Araf; β -L-Arap; α -L-Fucp; 4-O-Me- α -D-GlcpA; ∇ Acétyle; \blacklozenge Féruloye [F. M. Girio et al., 2010].

Tableau 2.2: Composition des monomères d'hémicellulose provenant de divers végétaux

Raw material	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	UA	AcG	References ^d
<i>Softwoods</i>								
Douglas fir	6.0	3.0	–	3.7	–	–	–	(1)
Pine	5.3–10.6	2.0–4.2	5.6–13.3	1.9–3.8	–	2.5–6.0	1.2–1.9	(2, 3)
Spruce	5.3–10.2	1.0–1.2	9.4–15.0	1.9–4.3	0.3	1.8–5.8	1.2–2.4	(2, 4–7)
<i>Hardwoods</i>								
Aspen	18–27.3	0.7–4.0	0.9–2.4	0.6–1.5	0.5	4.8–5.9	4.3	(1, 2, 4, 8)
Birch	18.5–24.9	0.3–0.5	1.8–3.2	0.7–1.3	0.6	3.6–6.3	3.7–3.9	(2, 4)
Black locust	16.7–18.4	0.4–0.5	1.1–2.2	0.8	–	4.7	2.7–3.8	(2, 9)
Eucalypt	14–19.1	0.6–1	1–2.0	1–1.9	0.3–1	2	3–3.6	(10–13)
Maple	18.1–19.4	0.8–1	1.3–3.3	1.0	–	4.9	3.6–3.9	(2, 9)
Oak	21.7	1.0	2.3	1.9	–	3	3.5	(14)
Poplar	17.7–21.2	0.9–1.4	3.3–3.5	1.1	–	2.3–3.7	0.5–3.9	(2, 15)
Sweet gum	19.9	0.5	0.4	0.3	–	2.6	2.3	(16)
Sycamore	18.5	0.7	1.0	–	–	–	3.6	(9)
Willow	11.7–17.0	2.1	1.8–3.3	1.6–2.3	–	–	–	(4, 17)
<i>Agricultural and agro-industrial materials</i>								
Almond shells	34.3	2.5	1.9	0.6	–	–	–	(18)
Barley straw	15	4.0	–	–	–	–	–	(19)
Brewery's spent grain	15	8	0	1	0	2	0.8	(12)
Cardoon	26.0	2.5	3.7	1.4	0.9	–	–	(20)
Corn cobs	28–35.3	3.2–5.0	–	1–1.2	1	3	1.9–3.8	(9, 13, 21, 22)
Corn fibre	21.6	11.4	–	4.4	–	–	–	(23)
Corn stalks	25.7	4.1	<3.0	<2.5	–	–	–	(24)
Corn stover	14.8–25.2	2–3.6	0.3–0.4	0.8–2.2	–	–	1.7–1.9	(9, 25, 26)
Olive stones	2.0–3.7	1.1–1.2	0.2–0.3	0.5–0.7	0.3–0.5	–	1.2–2.2	(27)
Rice husks	17.7	1.9	–	–	–	–	1.62	(28)
Rice straw	14.8–23	2.7–4.5	1.8	0.4	–	–	–	(23, 26)
Sugar cane bagasse	20.5–25.6	2.3–6.3	0.5–0.6	1.6	–	–	–	(29–31)
Wheat bran	16	9	0	1	0	2	0.4	(13)
Wheat straw	19.2–21.0	2.4–3.8	0–0.8	1.7–2.4	–	–	–	(8, 26)

a : Unités non glycosidiques. b : exprimé en g/100g de matière sèche. c : Les pourcentages des différents saccharides ont parfois été calculés à partir du polymère correspondant. Xyl – xylose; Ara – arabinose; Man – mannose; Gal – galactose; Rha – rhamnose; UA – acides uronique; AcG – groupement acétyle. Pour références, voir source correspondante : [F. M. Girio et al., 2010]

2.3. Fermentation d'hydrolysats hémicellulosiques par voie microbienne

À ce jour, aucun microorganisme ne possède naturellement toutes les caractéristiques pour la production de bioéthanol par fermentation directe d'hydrolysats lignocellulosiques.

- 1) Production et sécrétion d'enzymes lignocellulolytiques, soient les cellulases, les hémicellulases et les enzymes modifiant la lignine (communément appelées ligninases);
- 2) Assimilation rapide de tous les types de monosaccharides résultant de l'hydrolyse;
- 3) Fermentation éthylique efficace des hexoses et des pentoses résultants.

Les attributs recherchés sont dispersés à travers une multitude d'espèces, faisant du génie génétique un cheval de bataille de la recherche pour l'ingénierie d'un OGM pouvant accomplir la conversion efficace de la lignocellulose ou d'une fraction de cette dernière en bioéthanol (soit un biocatalyseur). La recherche mondiale pour un tel microorganisme s'est intensifiée depuis les années 90 [Zhang et al., 1995]. La possibilité de pouvoir consolider ces 3 étapes charnières en un seul bioréacteur est appelée Bioprocédé Consolidé (CBP; Consolidated Bioprocessing), ou encore, conversion microbienne directe (DMC; direct microbial conversion) [Cardona et Sanchez, 2007; Lynd et al., 2005]. La stratégie est de créer en un premier temps un organisme capable de fermentation éthylique efficace à partir des pentoses et des hexoses sous leur forme monosaccharidique, tel qu'on les retrouve dans les hydrolysats obtenus par

procédés thermochimiques ou enzymatiques [Balat, 2011]. Ce jalon de la recherche semble avoir été franchi par quelques équipes de recherches (voir Annexe A : Tableau synthèses des biocatalyseurs).

2.4. Capacité microbienne naturelle de conversion de la MLC

Plusieurs microorganismes ont été rapportés capables de fermentation alcoolique à partir d'hydrolysats de MLC, incluant des bactéries, des levures et des mycètes filamenteux. Les plus prometteurs pour la production industrielle sont *E. coli* (bactérie), *Z. mobilis* (bactérie), *S. cerevisiae* (levure) et *P. stipitis* (levure).

2.4.1. *E. coli*

E. coli présente plusieurs avantages comme biocatalyseur pour l'éthanol [F. M. Girio et al., 2010] incluant :

- l'habilité de fermenter une grande variété de sucres (incluant le D-xylose et le L-arabinose);
- l'important historique d'ingénierie génétique effectuée sur cette espèce;
- la facilité d'utilisation en milieu industriel.

Cependant, cette espèce présente aussi plusieurs désavantages :

- le pH optimal entre 6-7 augmentant le risque de contamination;
- la faible tolérance aux inhibiteurs présents dans les hydrolysats hémicellulosiques;
- la faible tolérance à l'éthanol;
- la synthèse de métabolites secondaires mixtes (acide acétique, éthanol, acide lactique et autres), réduisant le rendement en éthanol.

2.4.2. *Z. mobilis*

Z. mobilis est une bactérie utilisant la voie glycolytique d'Entner-Doudoroff (ED), ne générant qu'une seule molécule d'ATP par glucose, contrairement à la voie plus commune d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). De plus, sa voie des pentoses phosphates (PPP), ainsi que son cycle des acides tricarboxyliques (TCA) sont incomplets (c.-à-d. certaines de leurs enzymes ne sont pas synthétisées par cette bactérie) [Zhang et al., 1995; K. Y. Lee et al., 2010]. Ces caractéristiques métaboliques ont pour effet que *Z. mobilis* produit moins de masse cellulaire, conséquemment il montre un rendement spécifique d'éthanol plus grand en comparaison à *S. cerevisiae*. Cependant, l'éthanol inhibe fortement la fermentation à des concentrations de seulement 2% v/v, et le pH optimal est aussi restreint que celui d'*E. coli*. Finalement, *Z. mobilis* ne peut pas métaboliser le xylose ni l'arabinose [F. M. Girio et al., 2010].

2.4.3. *P. stipitis*

P. stipitis est capable de métaboliser les principaux saccharides des hémicelluloses et de les fermenter efficacement en éthanol. Cependant, *P. stipitis*, ainsi que d'autres levures fermentant les pentoses (ex : *Candida sheatae* et *Pachysolen tannophilus*), ne fermentent efficacement le xylose qu'en condition micro-aérophile, rendant le contrôle à l'échelle industrielle plus coûteux. De plus, ces levures sont moins tolérantes au pH acide, à l'éthanol et aux inhibiteurs des hydrolysats que *S. cerevisiae* [Ligthelm et al., 1988; Jeffries et al., 2007]. *P. stipitis* a aussi été rapportée produire des enzymes hémicellulolytiques [Jeffries et al., 2007; Oezcan et al., 1991].

2.4.4. *S. cerevisiae*

S. cerevisiae est la levure la plus communément utilisée dans l'industrie traditionnelle de la fermentation, incluant l'industrie de l'éthanol comme biocarburant de 1^{ère} génération. *S. cerevisiae* est un microorganisme reconnu comme sécuritaire, ayant la désignation de « GRAS » de la FDA. En plus, cette levure fermente efficacement le D-glucose, le D-mannose, le D-galactose, le sucrose et le maltose et peut atteindre jusqu'à 20% v/v d'éthanol. *S. cerevisiae* présente une bonne tolérance aux inhibiteurs présents dans les hydrolysats et aux hautes pressions osmotiques. Le principal problème que présente *S. cerevisiae* pour la fermentation des hémicelluloses est son incapacité à fermenter les pentoses, en l'occurrence le D-xylose et L-arabinose [F. M. Girio et al., 2010].

2.4.5. Autres candidats

Il existe plusieurs autres microorganismes affichant certaines caractéristiques d'intérêt. Plusieurs mycètes filamenteux sont les plus efficaces à dégrader les hémicelluloses et sont d'ailleurs la source de production des cocktails d'enzymes lignocellulolytiques. Bien que certains mycètes filamenteux puissent convertir les oligo- et monosaccharides dérivés de l'hydrolyse en éthanol, leur production d'éthanol est très lente et leur tolérance à l'éthanol est faible [Singh et al., 1992]. En contrepartie, certaines levures, tel que *Candida (Pichia) guilliermondii* et *D. hansenii*, sont capable de fermentation alcoolique efficace à partir de glucose, mais ne génèrent que du xylitol à partir du xylose. La plupart des bactéries, quant à elles, ont une large gamme de substrats, mais l'éthanol est rarement le principal produit de leur métabolisme. Finalement, bien que certaines bactéries (*Klebsia*, *Bacillus*, *Clostridium* et *Thermotoga*) soient capables de produire certaines cellulases et hémicellulases, elles présentent toutes les mêmes désavantages qu'*E. coli* [F. M. Girio et al., 2010].

2.5. Métabolismes des hémicelluloses et de ses monomères

Afin de métaboliser les sucres provenant de la MLC, les microorganismes mettent en branle une large gamme d'enzymes hydrolytiques, de transporteurs et de voies cataboliques des substrats. Noter que cette revue n'abordera pas le volet de l'hydrolyse enzymatique puisque le but ici est de peindre un bilan des avancées dans la matière de la fermentation des hydrolysats d'hémicelluloses et non des techniques d'hydrolyse en tant que telle.

2.5.1. Transport cellulaire

Suivant l'hydrolyse des hémicelluloses, les mono-, di- et oligosaccharides résultants doivent être transportés dans la cellule. Il existe plusieurs transports transmembranaires pour les sucres, qui dépendent non seulement du microorganisme, mais aussi de l'état de l'environnement (taux de croissance, type et concentration des substrats, O₂, température, pH). Il a souvent été démontré que plus d'un transporteur pour le même sucre agissent en même temps. Deux classes de transports sont classiquement décrites pour l'assimilation de sucres : la diffusion facilitée requérant seulement un gradient de concentration, et le transport actif qui requiert de l'énergie telle qu'un potentiel transmembranaire (proton symport) ou de l'ATP (ATP-binding cassette, ou transporteur ABC), ou encore du phosphoénolpyruvate (PEP) (systèmes PEP-transférase, ou transporteurs PTS) [F. M. Girio et al., 2010].

Dans certaines bactéries, les oligomères dérivés des hémicelluloses, spécialement les xylo-oligosaccharides (XOS), ont été rapportés être importés par un type de Sodium-XOS symporteur [Qian et

al., 2003], ou un PTS-XOS symporteur [Ohara et al., 2006], ou encore un XOS ABC-transporteur [Tsuji et al., 2004]. De plus, il est suggéré que les arabino-oligosaccharides sont importés par un ABC-transporteur chez *B. subtilis* [Sa-Nogueira et al., 1997]. De même que pour le transport des oligomères, les bactéries emploient généralement des transporteurs actifs pour l'importation de monosaccharides. Le glucose, le mannose et le galactose utilisent principalement des transporteurs PTS. Chez *E. coli*, le xylose est importé par deux systèmes spécifiques: un transporteur ABC-xylose de haute affinité et un proton-symporteur de faible affinité [Lam et al., 1980; Sumiya et al., 1995]. Il en va de même pour le L-arabinose : un transporteur de haute affinité ABC-arabinose et un de faible affinité proton-symporteur [Kolodrubetz et Schleif, 1981; Novotny et Englesberg, 1966]. On remarque que l'utilisation d'un transport purement actif rend l'utilisation des pentoses sous-optimale chez ces microorganismes.

Z. mobilis, quant à lui, arbore un transporteur à diffusion facilitée à haute capacité pour le glucose, le mannose, le xylose et le galactose, avec une préférence décroissante pour chacun de ces sucres chronologiquement [P. Weisser et al., 1996; P. Weisser et al., 1995; DiMarco et Romano, 1985].

Chez *Aureobasidium pullulans*, un mycète similaire aux levures, les disaccharides dérivés des hémicelluloses, c'est-à-dire le xylobiose et mannobiose sont rapportés être importés par des perméases énergie-dépendantes faisant partie intégrante des voies cataboliques xylanolytiques et manno-lytiques [Lubomir et Peter, 1998]. De plus, une perméase pour les XOS a été rapportée chez *Cryptococcus albidus* [Kratky et Biely, 1980].

S. cerevisiae a été étudiée de façon intensive par rapport au transport du D-glucose. On remarque le fait que tous les transporteurs d'hexoses sont des facilitateurs [Reifenberger et al., 1997]. Chez d'autres levures, des transporteurs à diffusion facilitée à faible-affinité/haute-capacité sont présents en parallèle avec des systèmes de transport actif à haute-affinité/faible-capacité (symporteur sucre-proton) [Nobre et al., 1999; Spencer-Martins, 1994; Gardonyi et al., 2003; Stambuk et al., 2003]. En ce qui concerne le transport des monomères dérivés des hémicelluloses, *P. stipitis* [Does et Bisson, 1989; Kilian et Van Uden, 1988; Weierstall et al., 1999] et *Candida shehatae* [Lucas et Van Uden, 1986] sont les plus étudiés. En général, le glucose, le mannose et le xylose partagent le même transporteur non spécifique et les systèmes de transport actif sont réprimés soit par le D-glucose ou encore par une haute concentration des substrats. *P. stipitis* paraît avoir au moins 2 proton-symports [Kilian et Van Uden, 1988] et produit aussi des facilitateurs acceptants le D-glucose et le D-xylose [Weierstall et al., 1999].

Bien que non métabolisé chez les souches de *S. cerevisiae* sauvages, le D-xylose et le L-arabinose sont importés grâce à des transporteurs d'hexoses non spécifiques. Le xylose est importé principalement par des transporteurs de haute ou intermédiaire affinités Hxt4p, Hxt5p, Hxt6p et Gal2p [Hamacher et al., 2002; Sedlak et Ho, 2001], bien que leur affinité pour le xylose soit environ 100x moindre que pour le glucose [Koetter et Ciriacy, 1993; Kotyk, 1967; W. Lee et al., 2002] et que Gal2p ne transporte quasiment pas de xylose ni d'arabinose [Cirillo, 1968].

2.5.2. Les voies métaboliques saccharolytiques

Chez *S. cerevisiae* et *E. coli*, les hexoses dérivés des hémicelluloses entrent dans la voie glycolytique EMP par une phosphorylation indépendante ou dépendante de leur transport transmembranaire. Il s'en suit

une isomérisation dans le cas du D-mannose, par la mannose-6P-isomérase (PMI) et la voie métabolique de Lenoir dans le cas du D-galactose [F. M. Girio et al., 2010].

La suite du catabolisme des hexoses emprunte les voies standards de la fermentation alcoolique chez les différentes espèces microbiennes. La Figure 2.4 montre un exemple des voies métaboliques des hexoses et des pentoses en comparant celles d'*E. coli*, de *Z. mobilis*, de *S. cerevisiae* et de *P. stipitis*. La voie saccharolytique des hexoses est principalement celle d'EMP, et seulement *Z. mobilis* utilise la voie d'ED. L'entrée des pentoses dans les vies glycolytiques se fait toujours par le xylulose-5-phosphate. Cependant, pour y arriver, *E. coli* utilise des réactions d'isomérisation, alors que *P. stipitis* requiert des réactions redox utilisant des cofacteurs (NAD(P)(H)). Finalement, seule *E. coli* n'utilise pas la voie homo-fermentaire de la PDC/ADH, mais plutôt une voie hétéro-fermentaire utilisant la PFL et l'intermédiaire de l'acétyl-CoA [F. M. Girio et al., 2010].

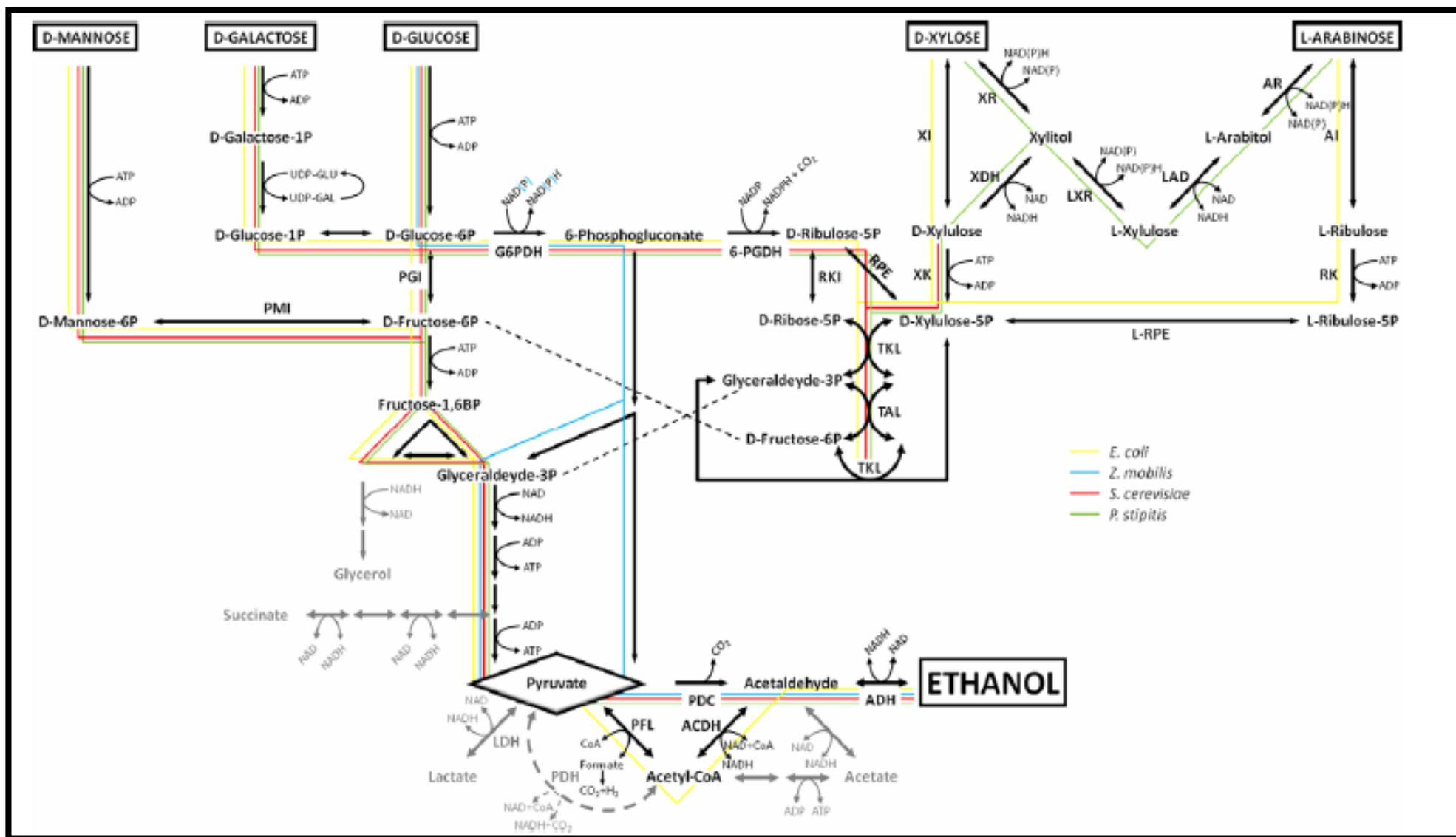


Figure 2.4: Voies fermentatives des saccharides dérivés des hydrolysats lignocellulosiques des 4 biocatalyseurs d'intérêt : *E. coli*, *Z. mobilis*, *P. stipitis* et *S. cerevisiae* [F. M. Girio et al., 2010].

En ce qui concerne les métabolismes des pentoses dérivés des hémicelluloses (majoritairement le xylose et l'arabinose), ils sont similaires d'espèce en espèce et partagent des intermédiaires communs. De façon générale, le xylose et l'arabinose sont métabolisés par la PPP. En effet, pour arriver à la PPP, ces deux saccharides doivent être convertis en xylulose-5-phosphate (xylulose-5P), soit un intermédiaire de cette voie. Pour y arriver, la voie habituellement attribuée aux bactéries emprunte une isomérisation suivie d'une phosphorylation (pour l'arabinose, à cela s'ajoute une épimérisation). Alors que la voie couramment associée aux mycètes suit deux réactions redox, requérant l'utilisation des cofacteurs NAD(P)(H), avant la phosphorylation [F. M. Girio et al., 2010].

2.5.3. Le métabolisme du xylose

Tel que mentionné, afin de cataboliser les pentoses, la plupart des bactéries utilisent la voie de la xylose isomérase (XI). La XI d'origine bactérienne possède un optimum entre 50-90°C et un pH entre 7-9 [Chen, 1980]. La présence de XI a été rapportée aussi chez certains eucaryotes, soit certaines levures et mycètes filamenteux [Tomoeda et Horitsu, 1964; Vongsuvanlert et Tani, 1988; Banerjee et al., 1994; Harhangi et al., 2003; Madhavan et al., 2009]. La XI eucaryote indique un optimum à des températures variant de 30-40°C et agit potentiellement de concert avec la voie de la XR/XDH [Banerjee et al., 1994].

Dans le cas des mycètes, la voie métabolique des pentoses qui leur est généralement associée est celle de la xylose réductase et de la xylitol déshydrogénase (XR/XDH). En contraste avec la XI, cette voie convertit le xylose en xylulose en utilisant 2 réactions redox distinctes, la réduction du xylose en xylitol (par l'action de la XR), puis l'oxydation du xylitol en xylulose par l'action de la XDH [Chiang et Knight, 1959; Rizzi et al., 1988].

La voie de la XI versus la voie de la XR/XDH

Tel que présenté précédemment, le catabolisme du D-xylose et du L-arabinose partage des intermédiaires métaboliques communs lors de leur entrée dans la cellule, avant d'être tous deux métabolisés dans la PPP. Leur arrivée dans la PPP par l'intermédiaire du D-xylulose peut se faire par 2 voies métaboliques différentes, l'une généralement associée aux bactéries (XI), et l'autre aux mycètes (XR/XDH). D'un point de vue d'ingénierie métabolique, il est crucial de comparer les deux voies afin d'estimer quelle stratégie possède le plus de potentiel pour la construction d'un microorganisme capable de fermenter les hydrolysats de MLC.

La première enzyme dans le catabolisme du xylose chez les levures et les mycètes filamenteux est la XR convertissant le xylose en xylitol. Par la suite, le xylitol est oxydé en D-xylulose par la XDH [Chiang et Knight, 1959; Rizzi et al., 1988]. On retrouve ces 2 enzymes chez plusieurs levures [Rizzi et al., 1988; F. M. Girio et al., 1994; Yablochkova et al., 2003] et même chez *S. cerevisiae*, ayant un gène codant pour une aldo-céto réductase avec une activité de XR [Kuhn et al., 1995] et un autre codant pour une XDH [Richard et al., 1999]. Néanmoins, il est généralement reconnu que *S. cerevisiae* est pratiquement incapable de métaboliser le xylose en éthanol (bien qu'elle soit capable de métaboliser le D-xylulose). Cependant, certaines souches sauvages isolées de *S. cerevisiae* ont été capables de croître sur un milieu ne contenant que du xylose comme source de carbone, mais de façon très lente [Attfield et Bell, 2006].

Tel que mentionné précédemment, les levures fermentant le plus efficacement le xylose (*P. stipitis*, *C. shehatae* et *Pachysolen tannophilus*) présentent des rendements très faibles, de l'ordre de <20% des rendements de *S. cerevisiae* sur le glucose [Ligthelm et al., 1988; Du Preez et al., 1989]. Il a été démontré qu'une aération faible et bien contrôlée est cruciale pour une production maximale d'éthanol chez *P. stipitis* et *C. shehatae*, sans quoi il résulte une accumulation de xylitol [Delgenes et al., 1986; Skoog et Hahn-Haegerdal, 1990]. De plus, l'accumulation de xylitol tend à augmenter avec la concentration de xylose, ce qui pointerait vers un étranglement métabolique au niveau de la XDH [du Preez, 1994].

Or, ces phénomènes peuvent être expliqués par le débalancement redox que provoque l'utilisation de la voie XR/XDH en condition anaérobie. En effet, la XR et la XDH ont été caractérisées de façon intensive par rapport à leur spécificité pour leurs cofacteurs. Chez certaines levures (*D. hansenii* et *C. utilis*), la XR et la XDH sont strictement NADPH et NAD⁺ dépendantes, respectivement [F. M. Girio et al., 1994; Bruinenberg et al., 1983]. Chez d'autres (*P. stipitis*, *C. shehatae* and *P. tannophilus*), la XR possède une bispécificité pour le NADPH et NADH, bien que le NADPH soit toujours le cofacteur préférentiel [Rizzi et al., 1988; Bruinenberg et al., 1984; Verduyn et al., 1985]. Or, l'utilisation de cofacteurs différents mène à une accumulation de NADP⁺ et NADH créant un débalancement redox intracellulaire. Qui plus est, l'absence de transhydrogénase chez les levures prévient l'interconversion des cofacteurs, ce qui aurait pu amoindrir le déséquilibre redox.

Il est à noter que le NADP⁺ peut être recyclé en NADPH à travers la phase oxydative de la PPP : en utilisant un fructose-6-phosphate (F6P), provenant du début de la glycolyse ou de la fin de la PPP, qui subit ensuite une isomérisation en glucose-6-phosphate (G6P) dans la voie de la glycolyse EMP. Finalement, le G6P est réduit dans la PPP, générant du NADPH. Quant au NADH, il est principalement réoxydé dans la chaîne respiratoire. Conséquemment, sous conditions anaérobie ou micro-aérobie, le NAD⁺ n'est pas efficacement régénéré et cela conduit à un déséquilibre redox. Les levures possédant une XR-NADPH dépendante stricte produisent donc du xylitol comme produit majeur de la fermentation des pentoses sous des conditions anaérobies [F. M. Girio et al., 1994; Silva et al., 1996]. Dans le cas des levures produisant une XR bispécifique, elles peuvent oxyder le surplus de NADH en NAD⁺, ce qui permet une fermentation plus complète du xylose sous des conditions micro-aérobies [Bruinenberg et al., 1983]. Il est aussi possible que d'autres voies métaboliques soient recrutées afin de palier à ce déséquilibre tel qu'observé chez *P. stipitis* avec l'induction de la voie de contournement de la glutamate décarboxylase ré-oxydant le NADH grâce à une glutamate déshydrogénase spécifique au NADH [Jeffries, 2008].

2.5.4. Le métabolisme de l'arabinose

Tel que démontré dans la Figure 2.4, les enzymes impliquées dans le début de la voie métabolique du L-arabinose chez les bactéries sont la L-arabinose isomérase (AI), la L-ribulokinase (RK) et la L-ribulose-5P-4-épimérase (L-RPE). Leurs gènes sont organisés en opéron, soit *araA*, *araB* et *araD*. Il existe aussi une voie alternative chez certaines bactéries qui est reliée de façon évolutive à la voie métabolique d'Entner-Doudoroff [Novick et Tyler, 1982; Watanabe et al., 2006].

En ce qui concerne les mycètes, la voie métabolique du L-arabinose débute par la L-arabinose réductase (AR), qui convertit le L-arabinose en L-arabitol. Cette enzyme est habituellement une aldose réductase non spécifique, ayant entre autres comme substrat le xylose et l'arabinose. Le L-arabitol est ensuite oxydé

en L-xylulose par la L-arabitol-4-déshydrogénase (LAD), puis le L-xylulose est converti en xylitol par la L-xylulose réductase (LXR). Finalement, le xylitol suit la voie catabolique du xylose décrite précédemment. La dépendance de ces enzymes à leurs cofacteurs est similaire à celle retrouvée pour la voie utilisant les XR/XDH. Les réductases AR et LXR utilisent le NADPH comme cofacteur, alors que les déshydrogénases (LAD et XDH) utilisent le NAD⁺. S'en suit un déséquilibre redox lorsqu'en milieu micro-aérobie et une accumulation de NADH ne pouvant pas être réoxydé, causant une accumulation de L-arabitol.

Par contre, chez *P. stipitis*, la AR a une bispécificité pour le NADH [Verduyn et al., 1985] et la LXR décrite chez *Ambrosio zymamonospora* et *C. arabinofementans* sont NADH dépendante [Fonseca et al., 2007; Verho et al., 2004]. Cette capacité d'interchangeabilité des cofacteurs semble être un pré requis pour une levure afin qu'elle puisse fermenter le L-arabinose et cela explique pourquoi il en existe un si petit nombre en comparaison à celles pouvant fermenter le xylose [F. M. Girio et al., 2010].

2.6. Ingénierie métabolique et évolutive appliquée aux microorganismes afin d'optimiser la fermentation des hydrolysats de MLC

Les déficiences métaboliques des espèces microbiennes sauvages possédant le plus de potentiel pour la fermentation des hydrolysats lignocellulosiques ont été exposées précédemment. À ce jour, aucun microorganisme ne possède naturellement toutes les caractéristiques souhaitées d'un candidat pour la production d'éthanol lignocellulosique par procédé DMC. Les attributs recherchés sont dispersés à travers une multitude d'espèces, ainsi, le génie génétique est devenu le cheval de bataille de la recherche pour l'ingénierie d'un organisme génétiquement modifié pouvant accomplir la conversion efficace de la lignocellulose en bioéthanol (soit un biocatalyseur). La recherche mondiale pour un tel microorganisme semble s'effectuer en deux temps : depuis les années 90 [Zhang et al., 1995], le focus est de créer en premier temps un organisme capable de fermentation éthylique efficace à partir des pentoses et des hexoses sous leur forme mono-saccharidique. Or, ce jalon de la recherche semble avoir été franchi par quelques équipes de recherches (voir Annexe A : Tableau synthèses des biocatalyseurs). En un deuxième temps, la science tentera d'exprimer les gènes de production et sécrétion des enzymes saccharolytiques de la lignocellulose, tel que les cellulases, les hémicellulases et les enzymes modifiant la lignine (LME; lignin-modifying enzymes) [Balat, 2011; Gnansounou et Dauriat, 2010]. Cette section se concentre sur l'état de la recherche dans le domaine de la création d'organismes modifiés génétiquement et optimisés pour la fermentation des pentoses, en l'occurrence le xylose et, de façon moins importante, l'arabinose.

Afin de construire un tel microorganisme, la recherche emploie principalement 3 voies du génie génétique :

1. L'insertion et l'expression de gènes hétérologues servant au métabolisme des pentoses chez une souche microbienne ne pouvant naturellement pas ou inadéquatement fermenter les pentoses;
2. L'ingénierie métabolique servant à augmenter ou réprimer l'expression de gènes sauvages interférant avec le métabolisme de la fermentation;
3. L'ingénierie évolutive se servant de diverses pressions sélectives dans les milieux de culture afin d'obtenir des mutants aux propriétés améliorées.

La diversité des méthodologies spécifiques utilisées par les différents groupes de recherche est grande et les détails dépassent la portée de cette revue, ainsi, seulement les méthodes générales et les microorganismes ayant donné les meilleurs résultats à ce jour sont présentés ici. L'Annexe A : Tableau synthèses des biocatalyseurs résume ces résultats. Noter que [Kuhad et Singh, 2007] offrent une revue exhaustive à ce sujet.

2.6.1. *E. coli*

Chez *E. coli*, comme toutes autres bactéries entériques, les hexoses et les pentoses sont majoritairement métabolisés en un intermédiaire commun, le pyruvate, qui est subséquemment converti en une variété de sous-produits de la fermentation (voir Figure 2.5). Chez *E. coli*, la voie de la glycolyse est celle d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Cette voie catalyse la conversion des hexoses en pyruvate générant 2 molécules d'ATP. Suite à la formation du pyruvate, *E. coli* possède les voies hétéro-fermentaires initiée par la pyruvate-formate-lysase (PFL) produisant une quantité équimolaire d'acétate, d'éthanol et de formate. *Z. mobilis* utilise la voie glycolytique d'Entner-Doudoroff (ED). Cette voie génère 1 molécule d'ATP par molécule d'hexose converti en pyruvate. De plus, *Z. mobilis* arbore la voie homo-fermentative de la PDC/ADH ce qui le rend hautement efficace pour la production d'éthanol [Ingram et al., 1999].

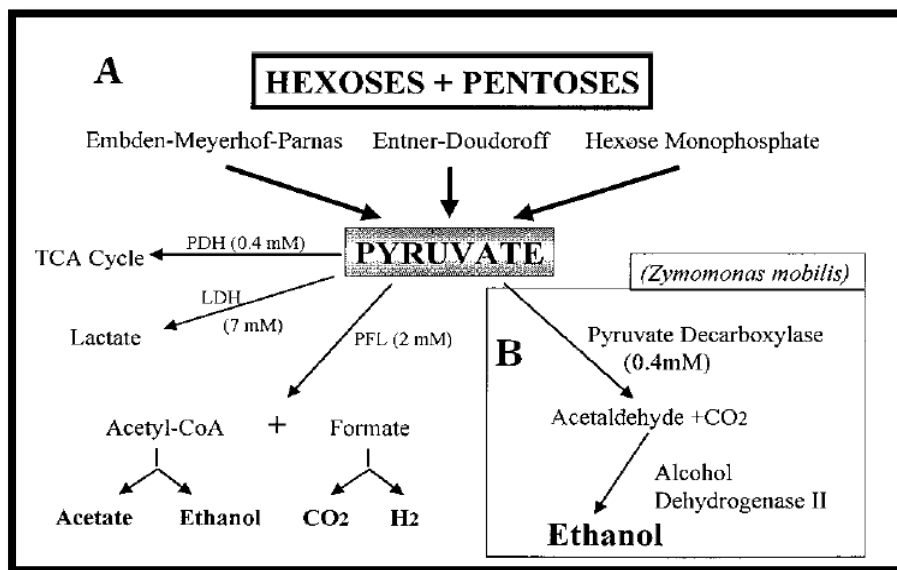


Figure 2.5 : Présentation schématique des voies hétéro-fermentaire présentes chez *E. coli* et *Z. mobilis* [Ingram et al., 1999].

Bien qu'il existe plusieurs voies métaboliques de production d'éthanol, seulement celle à 2 étapes de la pyruvate décarboxylase (PDC)/alcool déshydrogénase (ADH), originalement découverte chez les levures, est capable de produire de l'éthanol à très haute efficacité (>90% du maximum théorique) [Ingram et al., 1999]. Les autres voies alternatives de production d'éthanol, entre autres celles retrouvées naturellement chez *E. coli*, produisent une quasi-équimolarité d'éthanol, d'acide acétique et de formate afin de maintenir l'équilibre redox de la cellule.

La voie fermentative PDC/ADH est retrouvée communément chez les levures, ainsi que chez une seule espèce bactérienne : *Z. mobilis* [Buchholz et al., 1987]. Cette voie consiste en deux réactions

enzymatiques: la décarboxylation du pyruvate en acétaldéhyde par la PDC, suivie de la réduction de l'acétaldéhyde en éthanol par l'ADH. Tout comme *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* est limitée dans la variété des substrats qu'il peut assimiler, mais utilisant la voie PDC/ADH, son rendement de production d'éthanol est très élevé. Cela est dû à l'action de l'enzyme PDC, qui catalyse la conversion irréversible du pyruvate en acétaldéhyde [Ingram et al., 1999].

Les efforts ont donc été concentrés à insérer les gènes de *Z. mobilis* codant pour la PDC et pour la ADHII de façon fonctionnelle chez *E. coli*. Cela a été réussi et des souches éthanologéniques d'*E. coli* ont été créées [Alterthum et Ingram, 1989; Ingram et Conway, 1988; Ingram et al., 1989; Neale et al., 1988; Ohta et al., 1990]. Suite à cette réussite, d'autres techniques d'ingénierie métabolique ont été utilisées afin d'augmenter les performances de ces souches éthanologéniques, telles que le knockout du gène *pfl* d'*E. coli* [Ohta et al., 1991]. Les meilleures souches rencontrées dans la littérature à ce jour sont présentées à l'Annexe A.

2.6.2. *Z. mobilis*

Tel que mentionné précédemment, *Z. mobilis* est un candidat de choix comme biocatalyseur pour la production d'éthanol-carburant à partir d'hydrolysats lignocellulosiques vu ses attributs [Zhang et al., 1995]:

- capacité naturelle de fermentation alcoolique (utilisant la voie PDC/ADH) de haute sélectivité et haute productivité
- haute tolérance à l'éthanol et aux inhibiteurs présents dans les hydrolysats
- habilités à fermenter les sucres à faible pH
- organisme généralement considéré comme sécuritaire (GRAS)

Par contre, les souches natives de *Z. mobilis* ne peuvent pas métaboliser les pentoses dû à un manque au niveau des voies saccharolytiques nécessaires. Conséquemment, l'approche d'ingénierie génétique est de créer un recombinant ayant un bagage exogénote lui permettant d'assimiler et fermenter principalement le xylose et l'arabinose. Le chemin catabolique du xylose à insérer chez *Z. mobilis* est schématisé à la Figure 2.6.

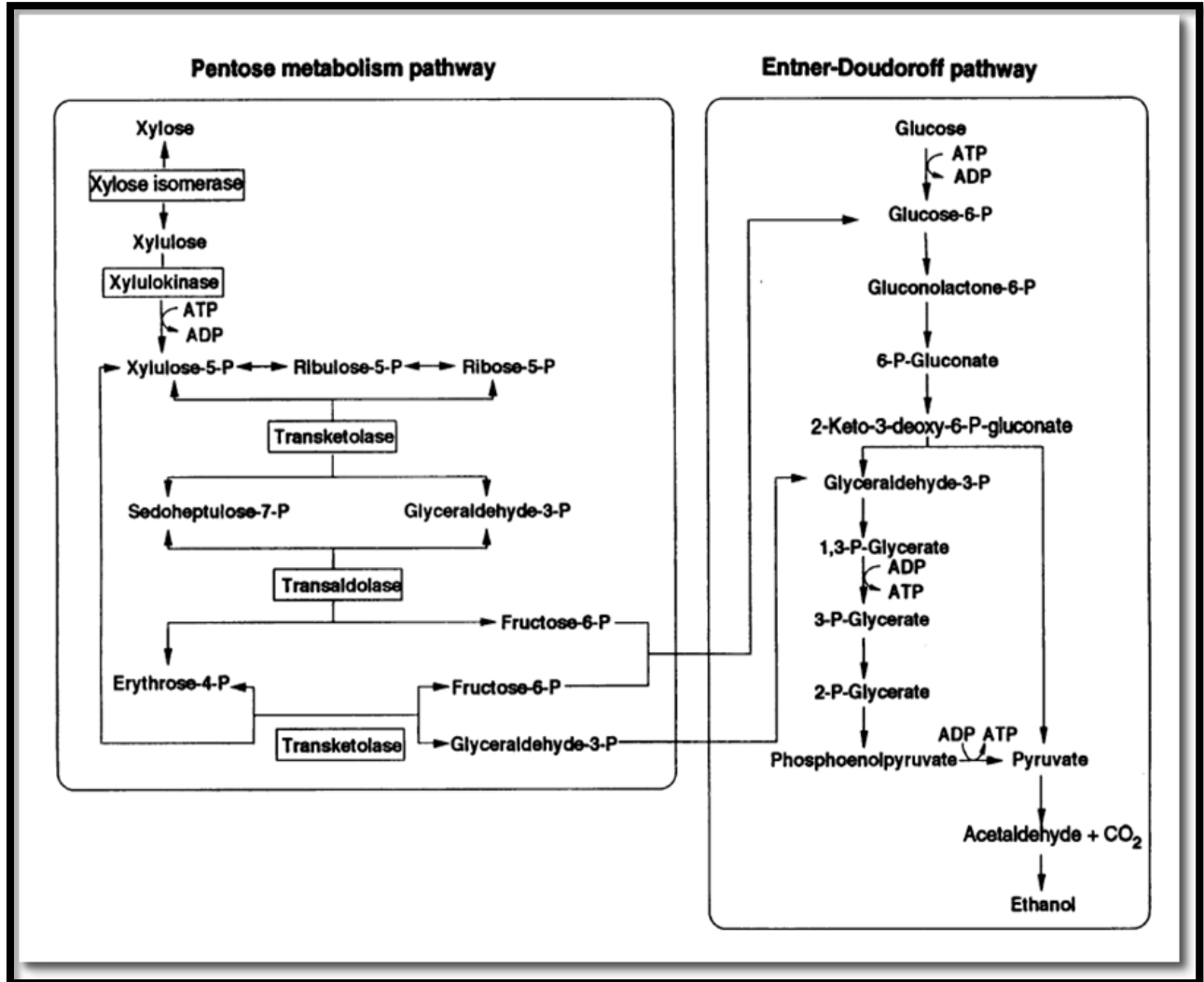


Figure 2.6 : Chemin du catabolisme du xylose proposé chez les recombinants de *Z. mobilis* pour la fermentation des pentoses.

Dans l'encadré de gauche, le chemin métabolique hétérogène à insérer chez *Z. mobilis*, soit les 4 enzymes encadrées : la XI, la XK, et les 2 enzymes de la partie non-oxydative de la PPP absentes chez *Z. mobilis* (la TKT et la TAL). Dans l'encadré de droite, la voie glycolytique d'ED [Zhang et al., 1995].

La xylose isomérase (XI) (gène *xylA*) et la xylulokinase (XK; gène *xylB*), généralement provenant de *Xanthomonas campestris* et *Klebsiella pneumoniae*, sont les premières enzymes nécessaires [Zhang et al., 1995]. Cependant, les souches recombinantes ne contenant que ces gènes ne peuvent toujours pas croître que sur le xylose, faute d'une voie des pentoses phosphates (PPP) fonctionnelle [C. Q. Liu et al., 1988; Feldmann et al., 1992]. L'ajout des gènes hétérologues codant pour la transaldolase (TAL) et la transcétolase (TKT) de la PPP est nécessaire pour convertir le xylose en un intermédiaire de la voie glycolytique d'ED et ainsi compléter une voie xylolytique efficace. Les meilleures souches rencontrées dans la littérature à ce jour sont présentées à l'Annexe A.

2.6.3. *S. cerevisiae* : la voie redox et la voie d'isomérisation

Deux stratégies d'ingénierie génétique ont permis d'obtenir des recombinants de *S. cerevisiae* capables de fermenter les pentoses, principalement le xylose et, à un moindre degré, l'arabinose. Ces deux stratégies diffèrent par la voie empruntée pour convertir le xylose en xylulose : soit le chemin de la xylose isomérase (XI) ou celui de la xylose réductase (XR)/ xylitol déshydrogénase (XDH). Ces deux voies, ainsi qu'une comparaison entre les chemins cataboliques des sucres chez *S. cerevisiae*, *E. coli* et *Z. mobilis*, sont schématisées à Figure 2.4. Ces deux approches sont les plus intéressantes, car *S. cerevisiae* est naturellement capable de fermenter le xylulose en éthanol puisqu'elle possède une XK, bien qu'elle ne soit que faiblement exprimée chez les souches sauvages [Deng et Ho, 1990].

L'expression chez *S. cerevisiae* des gènes hétérologues codant pour la XR et la XDH de *P. stipitis* a été intensivement étudiée [Koetter et Ciriacy, 1993; Eliasson et al., 2000; Tantirungkij et al., 1993; Walfridsson et al., 1997]. Le problème principal de cette stratégie d'ingénierie est le déséquilibre redox découlant de l'utilisation préférentielle des cofacteurs NADPH et NAD⁺ par la XR et la XDH, respectivement. Plusieurs solutions reposant sur l'ingénierie métabolique ont été apportées pour palier à ce problème, avec différents degrés de succès [Walfridsson et al., 1997; Eliasson et al., 2001; Jeppsson et al., 2003; Jeppsson et al., 2002; Verho et al., 2003; Jeppsson et al., 2006; Traff-Bjerre et al., 2004; Traff et al., 2001].

Suivant ces résultats mitigés, il est suggéré que certaines réactions métaboliques, non liées à l'utilisation de cofacteurs, mais plutôt influençant le flux métabolique des dérivés du xylose dans le métabolisme central, affectent aussi l'efficacité de l'utilisation du xylose chez les recombinants. Dans cette optique, une stratégie de surexpression de la XK sauvage [Eliasson et al., 2001], en plus de la surexpression des 4 enzymes de la PPP non-oxydative (TKT, TAL, ribulose-5-phosphate épimérase (RPE) et ribose-5-phosphate isomérase (RKI)), a été testée. Cependant, ces modifications génétiques n'ont apporté qu'une amélioration de la fermentation du xylulose, alors que la fermentation et la croissance sur le xylose ne se sont pas améliorées [Johansson et Hahn-Hagerdal, 2002]. Cela indique que les réactions en amont forment le goulot métabolique. Cela a été confirmé par Karhumaa et al. (2005), lorsqu'un plasmide multicopies contenant la XR et XDH, inséré dans un recombinant surexprimant la XK et les enzymes de la PPP, a permis d'améliorer grandement la croissance sur le xylose comme seule source de carbone.

La seconde stratégie d'ingénierie génétique employée afin de créer une souche de *S. cerevisiae* pour la fermentation du xylose efficace en anaérobiose est de miser sur la XI catalysant la conversion directe xylose-xylulose. Plusieurs groupes ont essayé d'insérer un gène codant pour la XI provenant de bactéries et d'archéobactéries dans *S. cerevisiae*, mais sans succès; aucun ne parvenant à le faire exprimer de façon appréciable [Gardonyi et Hahn-Hagerdal, 2003; Kuyper et al., 2004]. Ultérieurement, l'identification d'une XI fongique (encodée par le gène *xyIA* du mycète anaérobie *Piromyces sp.*) a permis l'expression fonctionnelle de la XI chez *S. cerevisiae* [Harhangi et al., 2003; Kuyper et al., 2003; Op den Camp et al., 2003]. Suite à cette réussite, d'autres stratégies ont permis d'augmenter l'efficacité de ce type de recombinant, entre autres la surexpression des enzymes de la PPP, l'application d'ingénierie évolutive, l'insertion de gènes réducteurs d'inhibiteurs de type aldéhydes (tel que le furfural et le 5-HMF), permettant la détoxification in situ, et l'expression de transporteurs hétérologues du xylose [Z. L. Liu et al., 2008; Lewis Liu et al., 2009; Ma et al., 2012]. Les meilleures souches rencontrées dans la littérature à ce jour sont présentées à l'Annexe A.

2.7. Les inhibiteurs ubiquitaires des hydrolisats lignocellulosiques

2.7.1. Origine et nature des inhibiteurs

La fermentation rapide des sucres lignocellulosiques est limitée par la gamme de substances toxiques générées lors du procédé d'hydrolyse. Il existe 3 grands groupes de substances inhibitrices : les acides organiques faibles, les dérivés de furanes et les composés phénoliques (Figure 2.7).

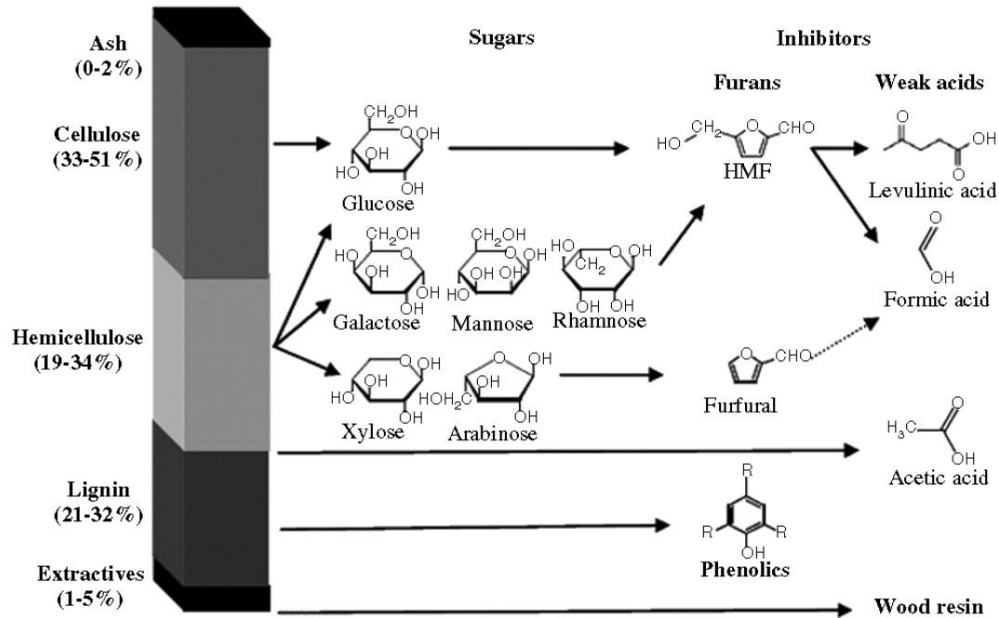


Figure 2.7 : Composition approximative de la lignocellulose et ses dérivés.

On retrouve la composition sur une base sèche et l'origine des inhibiteurs classiquement retrouvés dans les LCH issus de procédés d'hydrolyse thermo-chimique [Almeida et al., 2007].





















La dégradation de la cellulose par réaction d'hydrolyse thermochimique libère des molécules de glucose qui, dans un environnement de températures et pressions élevées, subiront une réaction de déshydratation produisant du 5-(hydroxyméthyl)furfural (HMF) [Ulbricht et al., 1984]. De façon similaire, l'hydrolyse des hémicelluloses relâchera un mélange principalement composé de xylose, d'arabinose, de mannose, de galactose, de rhamnose et d'acide acétique (HAc). À hautes pressions et températures, les hexoses réagiront comme le glucose pour former du HMF. Alors que les pentoses, suivant une déshydratation, produiront du furfural [Hayes et al., 2006].

Si les pressions et les températures élevées dans un milieu humide sont maintenues, l'hydratation du HMF amène à un intermédiaire tricarbonyle instable se décomposant en acide lévulinique et en acide formique [Hayes et al., 2006]. Il a aussi été proposé qu'en milieu acide et à haute température, le furfural pourrait se décomposer en furane et en acide formique par réaction de fission hydrolytique de son groupe aldéhyde [Dunlop, 1948]. Noter qu'en milieu basique (ex : lors d'un traitement à la chaux), l'oxydation de l'acide lévulinique peut produire de l'acide succinique [Hayes et al., 2006].

Une large gamme de substances phénoliques est générée dû à la dégradation de la lignine durant l'étape d'hydrolyse acide et/ou basique de la lignocellulose. Lors de la biosynthèse de la lignine, les trois blocs de construction sont l'alcool *p*-coumaryle, l'alcool *trans*-coniféryle et l'alcool *trans*-sinapyle [Larouche, 1993].

Par contre, suite à l'hydrolyse chimique de la lignocellulose, une panoplie de substances aromatiques peuvent être produites (les plus communes étant identifiées à la Figure 2.7). 3 types de noyaux aromatiques (phénylpropanoïdes) de base sont identifiés, sur lesquels une pluralité de fonctionnalités peut venir se greffer. Ces phénylpropanoïdes sont le *p*-hydroxyphényle (H; aucun groupement méthoxyle), le guaiacyle (G; 1 méthoxyle) et le syringyle (S; 2 méthoxyles) [Larouche, 1993]. Le type de substance aromatique que l'on retrouve dans les hydrolysats est dépendant de la sévérité du pré-traitement et du ratio H/G/S de la lignine contenue dans la biomasse initiale. En effet, la formation de phénols aldéhydes a été montré être favorisée en conditions oxydatives et acides [H. B. Klinke et al., 2002]. Au contraire, en milieu alcalin, des fonctionnalités d'acide cinnamique, d'acide 4-hydroxybenzoïque et d'acide vanillique sont formées [H. B. Klinke et al., 2004].

Tableau 2.3 : Substances inhibitrices retrouvées dans les LCH*

Group of compounds		Concentrations (g/L)				
		Spruce ^{a,b}	Willow ^c	Wheat ^d	Sugar cane ^e	Corn stover ^f
Furan derivatives						
	5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (5-HMF)	5.9 ^a 2.0 ^b	n.q.	n.i.	0.6	0.06
	2-Furaldehyde	1.0 0.5	n.q.	n.i.	1.9	11
	2-Furoic acid	n.i.	n.q.	0.007		
Aliphatic acids						
	Acetic acid	2.4	n.q.	1.6	4.4	1.6
	Formic acid	3.1 1.6	n.q.	1.4	1.4	
	Levulinic acid	0.9 2.6	n.q.	n.i.		
		1.1				
Phenolic compounds						
	R ₁ = R ₂ = H 4-hydroxybenzaldehyde	n.i.	0.010	0.021		
	R ₁ = H, R ₂ = OCH ₃ Vanillin	0.12	0.430	0.032		
	R ₁ = R ₂ = OCH ₃ Syringaldehyde	0.107		0.024		
	R ₁ = R ₂ = H 4-hydroxyacetophenone	n.i.	n.i.	0.004		
	R ₁ = H, R ₂ = OCH ₃ Acetovanillone	n.i.	n.i.	0.008		
	R ₁ = R ₂ = OCH ₃ Acetosyringone	n.i.	n.i.	0.039		
	R ₁ = R ₂ = H 4-hydroxybenzoic acid	0.005 0.039	n.q.	0.010		
	R ₁ = H, R ₂ = OCH ₃ Vanillic acid	0.034 0.017	n.q.	0.067		
	R ₁ = R ₂ = OCH ₃ Syringic acid	n.i.	n.q.	0.022		
	R ₁ = R ₂ = H Phenol	n.i.	0.035			
	R ₁ = H R ₂ = OH Catechol	0.009 0.002	0.440			
	R ₁ = OH R ₂ = H Hydroquinone	0.017	n.i.			
	R ₁ = R ₂ = CH R ₃ = CHO Coniferyl aldehyde	0.035 0.054	n.i.			
	R ₁ = CO R ₂ = CH ₃ R ₃ = -- Acetoguaiacone	0.007	n.i.			
	R ₁ = CO or COH ₂ or CH ₂ R ₂ = COH ₂ or CO R ₃ = CH ₃ or COH ₂ Hibbert's ketones	0.146	n.i.			
	R ₁ = COOH Cinnamic acid	n.i. 0.001	n.i.			
Total phenolics		3.7 3.1	2.5	0.7	4.5	

Biomass source and pretreatment employed:
^a upper values; two-step dilute acid spruce (*Picea abies*)⁶⁶
^b lower values; one-step dilute acid spruce¹⁴
^c dilute acid willow (*Salix caprea*)⁶⁵
^d wet oxidation wheat straw (*Triticum aestivum* L.)¹⁵
^e steam pretreatment sugar cane bagasse⁷¹
^f steam pretreatment corn stover⁷²
 n.q. not quantified; n.i. not identified.

*Les données pour les LCH d'épinette, de saule, de paille de blé, d'épi de maïs et de bagasse de canne à sucre sont répertoriées dans ce tableau [Almeida et al., 2007].

2.7.2. Effets inhibiteurs des acides organiques faibles

L'acide acétique, l'acide formique et l'acide lévulinique sont trois acides organiques avec des pKa de 4.75 (25 °C), 3.75 (20 °C) et 4.66 (25 °C), respectivement [Weast, 1975-1976]. Conséquemment, les hydrolysats possèdent un pouvoir tampon jusqu'à un pH d'environ 5.5 et la quantité d'acide sous leur forme dissociée varie grandement pour de faibles variations de pH dans cette zone.

Les acides faibles sont connus comme d'excellents inhibiteurs de croissance cellulaire et sont d'ailleurs employés dans l'industrie alimentaire comme préservatifs [Brown et Booth, 1991]. Il est proposé que leur mécanisme d'action est basé sur la diffusion de la forme non dissociée liposoluble au travers de la membrane plasmique. Une fois dans le cytosol ayant un pH près de la neutralité, l'acide se dissocie et diminue ainsi le pH intracellulaire [Weast, 1975-1976; Axe et Bailey, 1995; Verduyn et al., 1990; Verduyn et al., 1992; Warth, 1988; Pampulha et Loureiro-Dias, 1989]. Il a d'ailleurs été démontré que la croissance cellulaire de *S. cerevisiae* dans un milieu d'hydrolysats d'épinette était activée par une légère augmentation du pH (passant de 4.6 à 5) [E. Palmqvist et al., 1998].

Il a été démontré que le taux de répllication de *S. cerevisiae* diminue proportionnellement à la diminution du pH cytosolique [Verduyn et al., 1990]. Cela est dû au fait que le maintien du gradient H⁺ transmembranaire est essentiel au bon fonctionnement de la cellule. Un milieu plus acide augmente la diffusion passive des protons à l'intérieur de la cellule et demande ainsi plus d'ATP afin de les pomper à l'extérieur pour maintenir le gradient H⁺ et un pH interne neutre. Il a été démontré que le pH externe optimal de *S. cerevisiae* oscillait entre 5 et 5.5 [Verduyn et al., 1990]. Conséquemment, une augmentation du pH, bien que diminuant la concentration d'acide faible non dissociée en solution, ne serait pas optimale pour *S. cerevisiae*. Il a été démontré qu'une faible concentration en acide organique pouvait avoir un effet bénéfique sur le rendement éthylique de la fermentation (<100 mmol/L) [Larsson et al., 1999]. Par contre, peu importe la concentration en acide organique, la prolifération cellulaire semble affectée (voir section 3.2), ce qui a un impact négatif sur la productivité éthylique de la fermentation.

Il a été démontré que l'effet individuel de l'acide acétique, de l'acide formique et de l'acide lévulinique est une fonction linéaire de leur concentration en solution. Jusqu'à 100 mmol/L, leur présence augmente le rendement éthylique, puis de 100 à 495 mmol/L, le rendement diminue de façon linéaire. Il est proposé qu'à de faibles concentrations en acide, la production d'ATP est stimulée [Larsson et al., 2000]. En mode anaérobique, cela se traduit par une augmentation de la production d'éthanol et une diminution de la prolifération cellulaire. Par contre, passé un seuil critique, la demande en ATP serait si haute que les cellules ne pourraient plus éviter l'acidification du cytosol [Almeida et al., 2007]. De plus, il apparaît que l'acide formique est plus inhibiteur que l'acide lévulinique, qui à son tour est plus inhibiteur que l'acide acétique. Il est aussi intéressant de pointer qu'un mélange de ces acides dans le milieu de fermentation est moins inhibiteur que s'il s'y trouve individuellement, à concentration molaire égale. Cela démontre qu'il n'y a pas de synergie inhibitrice entre ces trois acides.

2.7.3. Effets inhibiteurs des furanes

La présence de furfural dans le milieu de fermentation diminue le taux de croissance spécifique [Azhar et al., 1981; Delgenes et al., 1996], le rendement spécifique de production d'ATP [E. Palmqvist et al., 1999]

et la productivité éthylique spécifique [E. Palmqvist et al., 1999; M. J. Taherzadeh et al., 1999]. Néanmoins, la croissance cellulaire est plus sensible à la présence de furfural que le rendement éthylique.

S. cerevisiae métabolise le furfural en alcool furfurylique [E. Palmqvist et al., 1999; M. J. Taherzadeh et al., 1999; Diaz de Villegas et al., 1992; Villa et al., 1992]. La croissance de *P. stipitis* est rapportée être inhibée par l'alcool furfurylique [Weigert et al., 1988], alors que *S. cerevisiae* n'est que très peu affectée par cette substance [E. Palmqvist et al., 1999]. Il est envisagé que l'ADH (enzyme NADH-dépendante de la glycolyse) des levures est responsable pour la réduction du furfural [M. J. Taherzadeh et al., 1999; Diaz de Villegas et al., 1992; Weigert et al., 1988]. Puisqu'en présence de furfural, une diminution du rendement de glycérol a été observée, il est aussi supposé que la réduction du furfural régénère le NADH excessif formé lors de la biosynthèse, rôle généralement attribué au glycérol [Oura, 1977].

Le HMF est reconnu comme ayant des effets comparables au furfural, mais à un moindre degré. En effet, à concentration équimolaire, le HMF a été démontré être moins inhibiteur que le furfural, et ce même si sa conversion en alcool 5-hydroxyméthyle furfurylique chez *S. cerevisiae* est plus lente [Almeida et al., 2007; M. J. Taherzadeh et al., 1999; E. Palmqvist et Hahn-Hagerdal, 2000]. Plusieurs mécanismes existent afin d'expliquer l'effet inhibiteur des furanes. Des tests in vitro ont démontré une inhibition directe de l'ADH, la PDH et ALDH par le HMF et le furfural [Almeida et al., 2007]. Des analyses de flux métaboliques ont montré que le furfural affecte directement les flux métaboliques de la glycolyse et du TCA [E. Palmqvist et al., 1998; Horvath et al., 2003]. De façon générale, il est possible d'affirmer que l'effet néfaste des furanes est expliqué par une redirection de l'énergie générée par les voies cataboliques de la levure vers la réparation des dommages causés par les furanes. Cela conduit à une disponibilité intracellulaire réduite d'ATP et de NADH dû à l'inhibition des enzymes clés et à la consommation des cofacteurs dans le processus intracellulaire de détoxification.

2.7.4. Effet des phénoliques

Les effets des monomères phénoliques sur une série de microorganismes ont été compilés par H. B. Klinke et al. (2004). Il en ressort que les phénols inhibent la croissance et la productivité éthylique de *S. cerevisiae*, mais pas le rendement. Les phénols sont principalement retrouvés dans les hydrolysats hémicellulosiques, quoiqu'en petite quantité. Néanmoins, il a été démontré que les monomères phénoliques avaient un impact non négligeable sur la fermentabilité des hémicelluloses [Larsson et al., 1999]. Le potentiel inhibiteur des hydrolysats hémicellulosiques provient donc d'une combinaison de l'action des acides organiques, des furanes et des phénols. Pour les phénols appartenant au même groupe fonctionnel (aldéhyde, cétone ou acide), le niveau d'inhibition dépend de l'hydrophobicité de la molécule, dictée par la quantité de groupements méthoxyles. De plus, les molécules phénoliques à petit poids moléculaire (PM) se sont avérées être plus toxiques que celles à haut PM [Clark et Mackie, 1984; Sierra-Alvarez et Lettinga, 1991]. Il est envisagé que les phénols causent une perte d'intégrité de la membrane lors de leur passage, affectant ainsi l'habileté de cette dernière à servir de barrière sélective et de matrice protéique [Heipieper et al., 1994]. Le mécanisme d'action exact ne fait pas consensus, particulièrement vu la panoplie de composés phénoliques pouvant être retrouvés dans les hydrolysats, la difficulté à les identifier adéquatement et l'interaction unique de chaque souche microbienne face à ces composés complexes.

2.7.5. Effets synergétiques

Les études s'intéressant aux possibles synergies entre les inhibiteurs abordés ci-haut sont rares. L'effet synergétique du HMF et du furfural a été démontré [M. J. Taherzadeh et al., 2000]. Effectivement, le taux de conversion du HMF et du furfural était significativement moindre dans le cas où ils apparaissaient ensemble dans la fermentation que dans le cas où ils apparaissaient individuellement, à concentration massique égale. De plus, il a été démontré que la croissance cellulaire ne débutait pas avant la conversion complète du HMF et du furfural en leurs alcools respectifs. Il a aussi soulevé que le furfural agissait de façon synergétique avec les phénols chez *E. coli* [Zaldivar et al., 1999; Zaldivar et al., 2000]. Le furfural aussi est rapporté comme agissant de concert avec l'acide acétique chez *E. coli* et *S. cerevisiae* [Zaldivar et al., 1999; E. Palmqvist, Grage et al., 1999].

Finalement, pour plus de détails sur le sujet présenté dans cette section, Almeida et al. (2007), H. B. Klinker et al. (2004), et E. Palmqvist et Hahn-Hagerdal (2000) offrent ensemble une revue complète du sujet.

3. Survol des principales conclusions tirées des expérimentations à l'échelle laboratoire

Cette section fait part des grandes conclusions que l'on peut tirer des multiples séries d'expériences détaillées à l'Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20. Noter que ceci n'est qu'un aperçu des conclusions rapportées par les multiples tests effectués, et qu'une analyse complète est trouvée à l'Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20. Les 3 phénomènes traités dans cette section sont :

1. L'impact du ratio et de la concentration initiale en sucres dans le milieu de fermentation sur les performances de LOMG1;
2. La sensibilité du catabolisme exogène du xylose chez LOMG1 face à la présence d'inhibiteurs ubiquitaires aux hydrolysats;
3. L'impact des stress environnementaux sur les performances de LOMG1 et les répercussions sur l'étape de la propagation des levures.

Noter qu'il est nécessaire de se familiariser avec les acronymes et le format des tableaux présentés. Pour ce faire, se référer au Lexique et à l'Annexe B : Protocoles d'analyses et aide à la compréhension des figures pour les résultats expérimentaux.

3.1. Impact du ratio et de la concentration initiale en sucres

Les chemins métaboliques du glucose et du xylose sont bien différents et il incombe de comprendre leurs interactions, car LOMG1 est un OGM (*S. cerevisiae* recombinant) dans lequel a été introduit la capacité de fermenter le xylose en éthanol (voie catabolique du xylose). Dans une optique de fermentation d'LCH, il est primordial de connaître l'impact de la concentration initiale en sucres et du ratio de ces sucres (ici glucose et xylose) sur les performances de fermentation. Ce sont ces trois données (concentration initiale en sucres, ratio des sucres et performance) qui dicteront les cinétiques de fermentation et la teneur finale en éthanol dans le fermenteur.

La série d'essais #1 montre clairement qu'il y a une différence majeure entre la productivité éthylique (g-éthanol/L-h) lorsque LOMG1 utilise le glucose comme source de carbone versus lorsqu'il utilise le xylose. En effet, lorsque les milieux de fermentations testés ne contiennent pas d'inhibiteurs, la productivité éthylique glucohydrique est environ 2 à 5 fois plus élevée que la productivité xylohydrique. Cela a un impact direct sur le temps de fermentation nécessaire afin d'atteindre une teneur en éthanol désirée.

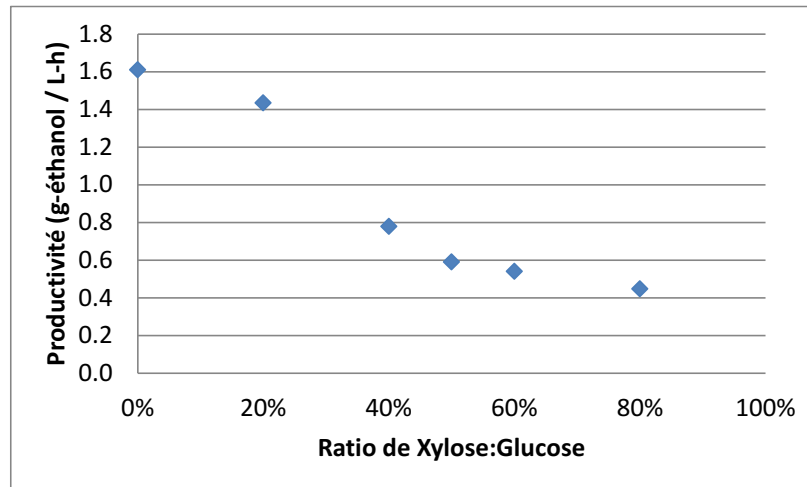


Figure 3.1 : Productivité éthylique en fonction du ratio des sucres (série d'essais #1).

La productivité éthylique moyenne durant la durée utile de la fermentation est évaluée pour chacun des milieux testés. Ces milieux contenant un ratio de xylose :glucose entre 0% et 80%.

La Figure 3.1 démontre bien ce phénomène où l'on voit l'impact du xylose sur la productivité éthylique moyenne de la fermentation. Dans ce cas, obtenir une bière avec une teneur en éthanol voulue prendra environ 4x (1.6/0.4) plus de temps dans une fermentation contenant un ratio xylose :glucose de 80% que dans une fermentation ne contenant que du glucose. Cela démontre que le xylose est métabolisé beaucoup moins rapidement que le glucose par LOMG1 et cela est supporté par la totalité des données présentées dans ce rapport, ainsi que par la littérature. Par contre, les productivités éthyliques glucohydrique et xylohydrique ne sont pas constantes et varient grandement en réponse à des variations de composition du milieu de fermentation ou à des variations environnementales. Au cours des multiples séries d'essais, il est montré que 4 paramètres affectent principalement ces productivités :

1. Le ratio glucose :xylose semble jouer un rôle crucial, non seulement dans la valeur nominale de la productivité éthylique des deux catabolismes, mais aussi dans le ratio de ces dernières;
2. La concentration initiale en sucres totaux semble affecter particulièrement la productivité éthylique xylohydrique, mais être un facteur neutre quant à celle glucohydrique;
3. La vitalité et l'activité cellulaire de l'inoculum utilisé dans les fermentations semblent affecter grandement la valeur nominale des cinétiques cataboliques (section 3.3);
4. La présence d'inhibiteurs dans le milieu de fermentation semble affecter de façon beaucoup plus sévère la productivité éthylique xylohydrique que celle glucohydrique. Pour une discussion complète de cela, se référer à la section 3.2.

Tableau 3.1 : Analyse de l'impact du ratio et de la concentration initiale en sucres sur les performances de fermentation*

#ID	Nom	Sucres ini (g/L)	Ratio Glu:Xyl	Performances		Erreurs	
				Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E01-1	0% Xyl	90.5	100:0	NA	1.59	NA	0.05
E01-2	20% Xyl	89.0	82:18	0.28	1.58	NA	0.02
E01-3	40% Xyl	88.0	59:39	0.41	1.43	0.01	0.02
E01-4	50% Xyl	88.5	50:50	0.33	1.25	0.00	0.00
E01-5	60% Xyl	91.0	40:60	0.34	ND	0.01	ND
E01-6	80% Xyl	90.0	19:81	0.36	ND	0.02	ND
E02-1	40% Xyl - 0% Thin Stillage	90.0	60:40	0.30	0.51	0.02	0.02
E02-6	80% Xyl - 0% Thin Stillage	89.0	20:80	0.24	ND	0.01	ND
E02-5	40% Xyl - 100% Thin Stillage	93.5	60:40	0.40	0.94	0.13	0.08
E02-7	80% Xyl - 100% Thin Stillage	92.0	19:81	0.39	ND	0.07	ND
E03-7	40% Xyl - 90g/L Sucres	88.5	59:41	0.30	0.68	0.02	0.01
E03-4	80% Xyl - 80g/L Sucres	78.5	19:81	0.33	0.43	0.01	0.02
E08-3	MS - Glu Inoc - 75% Xyl	96.0	25:75	0.30	0.54	0.03	0.03
E08-1	MS - Glu Inoc - 100% Xyl	87.0	0:100	0.39	NA	0.04	NA
E10-4	HH - 50% LIQ	184.8	80:20	0.00	2.62	NA	NA
E10-3	HH - 30% LIQ	140.9	65:35	0.05	2.10	0.00	0.01
E10-2	HH - 20% LIQ	125.8	56:44	0.07	1.66	0.01	0.01
E10-1	HH - 10% LIQ	111.0	44:56	0.11	1.34	0.01	0.03
E03-6	40% Xyl - 150g/L Sucres	153.0	59:41	0.25	0.74	0.02	0.02
E03-2	80% Xyl - 150g/L Sucres	152.0	20:80	0.09	0.54	0.06	0.01
E03-5	40% Xyl - 200g/L Sucres	208.5	59:41	0.15	0.76	0.02	0.00
E03-1	80% Xyl - 200g/L Sucres	203.0	20:80	0.04	0.56	0.03	0.00
E19-1	g/L 0 HAc - 0 HMF	200.5	50:50	0.60	3.21	0.01	0.07
E18-1	sans pH cont. - 0 HAc - 0 Fuf	173.5	17:83	0.99	2.91	0.03	0.12

*Les milieux ayant une composition similaire, mis à part leur ratio en sucres et leur concentration initiale en sucres, sont regroupés, chacune de ces séries étant séparée par une mince ligne grise. Acronymes : « Sucres ini » - Concentration initiale en sucres totaux; « Ratio Glu :Xyl » - Ratio massique des deux sucres rapporté sur une base de 100; « Q_{Eth_Xyl} » - Productivité éthylique en phase xylolytique; « Q_{Eth_Glu} » - Productivité éthylique en phase glucolytique; « Erreurs » sont les erreurs absolues sur les mesures; HH – Hydrolysats Hémicellulosiques; ID# - Sont les numéro d'identification des milieux testés (voir Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20); ND – Donnée non déterminée dû à un manque d'échantillonnage ou autre raison; NA – Non applicable.

Le Tableau 3.1 liste les milieux de fermentation testés pouvant être comparés afin d'investiguer l'effet du ratio glucose :xylose et celui de la concentration initiale en sucres sur les productivités éthyliques de LOMG1 lors du catabolisme du glucose et du xylose. Les séries de milieux de fermentations comparables sont séparées par une mince ligne grise. La première tendance observable pour toutes les séries de comparaisons est qu'il y a une baisse systématique de la productivité éthylique glucolytique lorsque le ratio glucose :xylose diminue. Il est donc envisageable que le xylose ait un impact négatif sur le catabolisme du glucose. Il se peut que le xylose concurrence le glucose pour les transporteurs

transmembranaires ou au niveau des réactions métaboliques communes aux deux substrats pour former l'éthanol. Cependant, il est plus probable que la présence de xylose ralentisse la croissance cellulaire, tel que le démontrent les figures rapportant le suivi de la concentration cellulaire pour la série d'essais #10 (voir section 10.1.8). Il est connu que LOMG1 ne peut pas croître exclusivement sur le xylose, ainsi une fois le glucose consommé dans le milieu de fermentation, la croissance cellulaire ralentit fortement. Il est en effet peu probable que le xylose ralentisse directement les réactions cataboliques du glucose, puisque la littérature affirme que le glucose inhibe lui-même les réactions cataboliques du xylose en diminuant le flux métabolique de certaines enzymes, en plus de compétitionner avec lui pour les transporteurs membranaires [Subtil et Boles, 2012].

Dans le cas de la productivité éthylrique xylolytique, les choses ne sont pas si claires. Le Tableau 3.1 montre qu'une augmentation du ratio de xylose est parfois bénéfique, parfois néfaste. Il est particulier d'observer dans la série d'essais #3 et #10 que la productivité xylolytique est très sévèrement inhibée par une haute concentration en sucres totaux. Dans le cas de la série d'essais #10, il semble que cela est dû à une chute de la vitalité cellulaire (voir section 10.1.8). La série d'essais #3 montre une baisse en productivité xylolytique associée non seulement à une hausse de la concentration en sucres totaux, mais aussi à la baisse du ratio glucose :xylose (en comparant E03-6 vs E03-7 ou E03-2 vs E03-4). Ce phénomène prend une autre allure en comparant les milieux E18-1 et E19-1 alors qu'une haute concentration en sucres semble encore inhiber le catabolisme du xylose, mais ceci bien que le ratio glucose :xylose diminue. Il est important de spécifier que dans ces 2 milieux le xylose n'a pas été totalement consommé, et ce, sans que l'on n'observe une baisse de vitalité cellulaire (voir sections 10.4.5 et 10.3.4).

Ces résultats disparates semblent indiquer un déséquilibre intracellulaire faisant que le xylose ne suffirait plus à subvenir aux besoins métaboliques de base des cellules après un certain temps. En conclusion, il est généralement observé que lorsque le glucose est en haute concentration et en haut ratio glucose :xylose, cela inhibe le catabolisme du xylose. La présence de xylose au-dessus d'un ratio xylose :glucose de 80% inhibe significativement le catabolisme du glucose. Finalement, il semble y avoir une tendance entre une forte croissance cellulaire ou une haute vitalité cellulaire¹ et une bonne consommation du xylose. La section suivante tente d'expliquer les causes fondamentales de ces corrélations.

3.2.Sensibilité accrue du catabolisme du xylose aux inhibiteurs de fermentation

Comme il a été révisé dans la section 2.7, les inhibiteurs ubiquitaires aux hydrolysats lignocellulosiques posent un défi d'importance quant au rendement et à la productivité d'un procédé de fermentation. La section 10.3 rapporte les tests ayant été faits afin de tester la résilience de la souche LOMG1 face aux inhibiteurs les plus communs.

¹ Ce commentaire s'adresse principalement aux milieux de fermentation testés ayant reçu un fort inoculum et n'affichant pas nécessairement de croissance cellulaire, mais plutôt un maintien de la concentration cellulaire, ce qui est signe d'une bonne vitalité (autrement dit, une absence de mort cellulaire).

Bien qu'une baisse nominale de rendement a souvent été observée à des concentrations entre 1 et 10 g/L d'acide acétique, ces observations ne sont pas statistiquement significatives vu l'erreur sur les données. Il en découle que la présence d'acide acétique peut avoir un effet néfaste sur le rendement de la fermentation, mais cela est faible et négligeable en comparaison à son effet sur la croissance cellulaire. Effectivement, l'acide acétique agit principalement comme inhibiteur de la croissance cellulaire chez LOMG1, tel que le démontrent les données de croissance cellulaire de la série d'essais #19 (section 10.3.4). Cette inhibition de la croissance cellulaire se traduit en une sévère baisse de productivité. À cet effet, le Tableau 3.2 compile les baisses en productivité enregistrées dans les milieux contenant de l'acide acétique. Il apparaît que la productivité éthylique xylolytique est la plus sévèrement affectée.

Tableau 3.2 : Diminution sur les performances de fermentation des milieux contenant de l'HAc*

#ID	HAc (g/L)	Diminution p/r au milieu sans HAc				
		Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E19-5	1	-2%	-5%	-4%	-13%	-3%
E05-2	2.5	10%	-19%	-21%	-41%	25%
E05-5	2.5	-4%	-21%	-21%	-30%	-6%
E19-9	3	-26%	-13%	-12%	-42%	-8%
E04-2	3.5	10%	-9%	-16%	-36%	ND
E05-6	8	-72%	-54%	-59%	-73%	-58%
E04-3	9.5	-50%	-41%	-50%	-89%	ND
E05-3	9.5	-53%	-37%	-47%	-74%	-45%

*La diminution est donnée en % par rapport au milieu de référence ne contenant pas d'HAc. Acronymes : « Q_{Eth} » - Productivité éthylique moyenne sur une période donnée; « Q_{Eth_Xyl} » - Productivité éthylique en phase xylolytique; « Q_{Eth_Glu} » - Productivité éthylique en phase glucolytique

Le furfural est aussi reconnu comme étant inhibiteur de la croissance, affectant également le rendement éthylique. En effet, la série d'essais #16 rapporte de sévères baisses en rendement dans des milieux de fermentation contenant de l'acide acétique et du furfural, soit : une baisse de 14% en rendement pour les milieux contenant 1 et 2 g/L de furfural. Sachant que l'acide acétique n'a qu'un faible impact sur le rendement, ces diminutions sont attribuables au furfural. Ceci est supporté par la littérature, tel que discuté dans la section 2.7.

L'effet du HMF seul et en combinaison avec l'acide acétique a été étudié dans la série d'essais #19. Les résultats montrent que, tout comme le furfural, le HMF affecte le rendement et la productivité de la fermentation. Le Tableau 3.3 montre les performances de fermentations contenant du HMF en comparaison avec un milieu « propre ». Il apparaît encore que la productivité éthylique xylolytique soit la mesure la plus sévèrement touchée, bien que le rendement soit aussi affecté. Les résultats présentés dans la section 10.3.4 montrent aussi que le HMF est un inhibiteur plus puissant que l'acide acétique sur une base massique. 2.5 g/L d'HMF diminue le rendement de 14%, la productivité éthylique xylolytique de 83% et la croissance cellulaire de 57%, alors que 3 g/L d'acide acétique ne diminue pas le rendement de façon significative, la productivité xylolytique de 42% et la croissance cellulaire de 36%.

Tableau 3.3 : Diminution sur les performances de fermentations des milieux contenant du HMF*

#ID	Nom	Y _{max}	Q _{Eth}	Q _{Eth}	Q _{Eth}	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)
			@24h (g/L-h)	@48h (g/L-h)	@72h (g/L-h)		
E19-1	g/L 0 HAc - 0 HMF	84.8%	2.60	1.63	1.13	0.60	3.21
E19-2	g/L 0 HAc - 0.5 HMF	84.1%	2.54	1.57	1.10	0.56	2.90
E19-3	g/L 0 HAc - 2.5 HMF	76.4%	1.27	1.16	0.78	0.10	1.06
E19-4	g/L 0 HAc - 5 HMF	77.7%	0.73	0.89	0.67	0.00	0.92

*Acronymes : « Y_{max} » - Rendement maximal obtenu durant la fermentation; « Q_{Eth} » - Productivité éthylique moyenne sur une période donnée; « Q_{Eth_Xyl} » - Productivité éthylique en phase xylolytique; « Q_{Eth_Glu} » - Productivité éthylique en phase glucolytique; « Erreurs » sont les erreurs absolues sur les mesures

Plusieurs méthodes de détoxification ont été testées afin d'essayer de minimiser la présence ou l'impact des inhibiteurs sur les performances de fermentation. Une discussion complète des résultats est rapportée à la section 10.4. L'effet le plus problématique des inhibiteurs reste qu'ils diminuent sévèrement la productivité xylolytique, et ce même à faible dose. Il semble que le métabolisme du xylose chez LOMG1 soit plus sensible aux inhibiteurs que le métabolisme du glucose. Ce phénomène n'a pas été relevé dans la littérature et il reste difficile d'en concevoir la raison.

[Horvath et al., 2003] offre une explication potentielle. Ils ont analysé les flux des principaux chemins métaboliques chez *S. cerevisiae* lors de fermentations contenant du furfural et leurs résultats montrent une diminution de l'activité de la voie métabolique des pentoses phosphates (PPP) en présence de furfural. Or, le PPP est un des chemins métaboliques principaux dans la biosynthèse de biomasse et aussi la porte d'entrée du xylose dans le chemin de la glycolyse. Il est envisageable qu'en réponse à un stress (ex : furfural ou acide acétique) la levure hausse la régulation du chemin de la glycolyse afin d'augmenter le taux de production d'ATP et régule à la baisse les chemins métaboliques de réplication cellulaire jusqu'à ce que ce stress soit estompé. En anaérobie, la production d'éthanol à partir de glucose suivant la voie de la glycolyse est le chemin métabolique ayant le plus haut taux de production d'ATP. Il a d'ailleurs été démontré que la voie de la glycolyse était régulée en hausse lors de l'addition de furfural au milieu de fermentation [Horvath et al., 2003].

Dans une optique de biologie évolutive, ce phénomène serait sensé; l'organisme préconisant sa survie avant d'initier sa réplication qui est exigeante en énergie et en ressources. L'ATP excédentaire serait plutôt utilisée afin de maintenir l'homéostasie cellulaire (ex : pH du cytosol), et afin de convertir et sécréter les inhibiteurs. Il devient donc apparent qu'en régulant à la baisse le PPP, le catabolisme du xylose s'en trouve aussi diminué. De plus, une fois le glucose épuisé, la cellule ne régulera pas nécessairement le PPP à la hausse afin d'augmenter la génération d'ATP à partir du xylose, chose qui paraîtrait « logique ». Effectivement, de telles réponses métaboliques sont complexes et n'ont fort probablement pas été insérées par génie génétique chez LOMG1; les voies métaboliques indigènes étant généralement beaucoup plus finement régulées en accord aux stimuli environnementaux qu'une voie artificiellement insérée. Tous les détails du génie génétique appliqué sur LOMG1 n'étant pas connus, il est difficile de savoir exactement quels sont les véritables causes et effets des éléments ici discutés.

Seul dans des milieux de fermentation complètement exempts d'inhibiteurs a-t-on observé des productivités éthyliques xylolytiques potentiellement acceptables pour un éventuel procédé industriel (ex : E18-1, E18-2 et E19-1). Cela n'est pas encourageant pour la fermentation du xylose, car il n'existe pas encore de méthode de détoxification à faibles coûts pouvant retirer la grande majorité des inhibiteurs ubiquitaires des hydrolysats lignocellulosiques. Néanmoins, cela n'écarte pas la possibilité de ne fermenter que les hydrolysats celluloses, en utilisant des levures conventionnelles reconnues comme étant plus robustes que leurs homologues génétiquement modifiés, mais ne pouvant pas fermenter le xylose.

3.3.L'inoculum, le stress et les performances

Dans une fermentation éthylique, le but est de générer le plus d'éthanol, le plus rapidement possible. La levure utilisée afin de convertir les sucres en éthanol agit comme un catalyseur de réaction. Tout comme un catalyseur chimique, il faut lui fournir des conditions d'opérations optimales, mais en plus de cela, il faut le produire grâce à un procédé mettant en valeur le plus de sites actifs et la plus grande activité des sites possibles. Dans un procédé de fermentation avec levures, cette étape de fabrication est l'étape de propagation des levures. Or, une propagation favorisant un taux de réplication élevé, une haute vitalité et une haute activité cellulaire est primordiale à la bonne conduite de la fermentation subséquente.

L'effet le plus marqué d'une propagation inadéquate est allongement de la phase de latence au début de la fermentation. De plus, si le stress du transfert entre le propagateur et le fermenteur est trop élevé, une baisse d'activité et potentiellement une baisse de vitalité sont observées. Un trop grand stress amènera aussi la mort de cellules, phénomène doublement néfaste pour la fermentation, car à partir de ce point il faudra plus de temps pour atteindre la concentration finale en biomasse (donc baisse en productivité éthylique) et les sucres utilisés pour synthétiser cette biomasse additionnelle ne sont plus disponibles pour l'éthanol (donc baisse de rendement).

Durant le déroulement du projet de recherche, le protocole de propagation et d'inoculation des milieux de fermentation testés a évolué. Cette section tente de démontrer qu'il y a un lien direct entre la diminution du stress encouru par les levures durant l'étape de propagation et une augmentation appréciable des performances de fermentation.

3.3.1. Évolution du protocole de propagation

Différents protocoles de propagation ont été utilisés afin d'inoculer les milieux de fermentation testés lors des multiples séries d'essais présentées dans ce rapport (Annexe A : Tableau synthèses des biocatalyseurs). Un total de 6 protocoles ont été mis à contribution et ces derniers sont détaillés ci-après en ordre décroissant du niveau de stress appliqué aux levures : #F étant le plus stressant et #A le moins stressant.

Tableau 3.4 : Détails des protocoles de propagation de levures utilisés durant les diverses séries d'essais*

Indice de stress	Étape d'incubation initiale		Étape de propagation			Étape de centrifugation et transfert dans le milieu de fermentation			Série d'essais utilisant ce protocole
	YUD (g/L)	Durée (h)	YUD (g/L)	Durée (h)	Aération (Oui/Non)	T (°C)	Méthode de transfert	Durée entre centrifugation et inoculation (h)	
F	10:1:80	60	10:1:80	24	Non	4	Suspension dans l'eau	24<t>1	#2, 3, 4, 5, 7
E	10:1:60	60	10:1:60	24	Non	4	Suspension dans saline PBS	t<1	#1
D	20:1:80	60	20:1:80	24	Non	4	Transfert direct de la pâte de levure	24<t>1	#6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
C	25:1:50	24	20:1:80	10	Oui	4	Transfert direct de la pâte de levure	t<1	#15, 16
B	25:1:50	24	20:1:80	10	Oui	20	Transfert direct de la pâte de levure	t<1	#16, 17, 18
A	50:1:100	24	60:1:150	10	Oui	s/a	Transfert direct du milieu de propagation	t<0.25	#19

*Acronymes : YUD – Concentrations d'extrait de levure (Y), d'urée (U) et de glucose (D)

Le Tableau 3.4 présente un résumé des protocoles utilisés afin de propager les levures pour les différentes séries d'essais présentées dans ce rapport. L'indice de stress reflète la sévérité du stress appliqué aux levures en utilisant ce protocole et il est supposé que plus le stress est élevé, moins les performances de fermentation seront bonnes.

L'« Étape d'incubation » donne les conditions de la propagation initiale, durant laquelle les cellules sont multipliées dans un faible volume de milieu de culture liquide à partir de 1 colonie prélevée sur un plat de Pétri. « YUD » signifie « Yeast Extract : Urea : Dextrose » et donne la composition en g/L de ces trois composants du milieu de culture. Cette étape devrait être la plus courte possible afin de maximiser la vitalité cellulaire pour la prochaine étape en plus de limiter le nombre de générations. Par contre, elle ne devrait pas être si courte que la biomasse générée ne suffit pas à inoculer l'étape de propagation. De plus, lorsqu'on travaille avec un OGM, il est préférable de limiter le nombre de générations lors de la propagation dû au risque de perte du bagage génétique exogène, particulièrement dans un milieu de culture ne contenant que du glucose, où il n'y a aucune pression favorisant le maintien d'une voie catabolique du xylose. Les expériences ont montré qu'une durée de 24h est suffisante pour cette étape, donc, une durée de 60h peut être interprétée comme un stress inutile.

L'« Étape de propagation » est l'étape où la culture de l'étape d'incubation est transvidée dans un milieu de culture frais plus volumineux. L'« aération » signale que le milieu a été aéré avec de l'air ou non, la propagation s'effectuant en mode aérobique ou anaérobique. La durée de cette étape est encore plus critique que celle de l'étape d'incubation. Effectivement, si la durée de la propagation est trop longue, les levures consomment tous les sucres, amorcent leur phase de croissance stationnaire et peuvent même entrer dans leur phase de déclin. Cela signifie une baisse dramatique d'activité cellulaire et le début de la mort cellulaire. Or, une propagation optimale utilisée pour inoculer un milieu de fermentation éthylique devrait être prélevée durant la fin de la phase de croissance exponentielle. Des tests de sucres résiduels ont été réalisés durant cette étape de la propagation et il a été trouvé que dans les cas des protocoles #C

et #B, le glucose était complètement consommé après 10h (résultats non montrés). C'est pourquoi la concentration en glucose de l'étape de propagation du protocole #A a été augmenté à 180 g/L et une analyse de sucres résiduels a montré qu'après 11.3h de culture, il restait 32 g/L de glucose (résultats non montrés). Il est conclu qu'une durée de 24h est beaucoup trop longue pour cette étape, et qu'une durée de 10h est préférablement jointe à une concentration en glucose de >150 g/L afin d'éviter une carence en sucre pour les levures.

L'« Étape de centrifugation et transfert dans le milieu de fermentation » détaille les étapes suivant la propagation afin de préparer l'inoculum. L'inoculum est ensuite utilisé pour inoculer les milieux de fermentation. La « T (°C) » est la température de centrifugation du milieu de propagation; un « s/a » signifie qu'il n'y a pas eu de centrifugation. La « méthode de transfert » détaille s'il y a eu une re-suspension des cellules dans une solution avant leur utilisation comme inoculum. Par exemple, pour le protocole de propagation #E, le milieu de propagation fut centrifugé, le surnageant jeté, les cellules re-suspendues avec une solution saline PBS, puis cette solution fut utilisée directement pour inoculer les milieux de fermentation testés dans la série d'essais #1. La « durée entre centrifugation et inoculation » est une estimation du temps entre la fin de la préparation de l'inoculum et l'utilisation de ce dernier dans les fermentations testées. Afin de limiter le stress subit par les cellules durant cette étape, il est clair que de ne pas centrifuger les cellules est la meilleure solution. Si une centrifugation est utilisée, il est préférable de centrifuger les cellules à une température la plus proche possible de la température utilisée lors de la propagation (32 °C). Finalement, il est beaucoup plus dommageable pour les cellules de se faire re-suspendre dans une solution très différente du milieu duquel elles viennent d'être centrifugées. En ce sens, re-suspendre les cellules dans de l'eau est plus stressant que dans une solution saline PBS, qui est aussi plus stressant qu'aucune re-suspension. Ce sont ces raisons qui justifient la gradation du niveau de stress des 6 protocoles utilisés.

3.3.2. Effet du stress subit durant l'étape de propagation sur les performances de fermentation

Tableau 3.5: Effet de la vitalité de l'inoculum sur les performances de fermentation (protocole #F vs #E)*

#ID	Nom	# Protocole	Sucres ini (g/L)	Ratio Glu:Xyl	Cells ini (x10 ⁸ cell*ml ⁻¹ / g*L ⁻¹)	Y _{max}	Performances					Erreur Absolue					
							Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E01-6	80% Xyl	E	90.0	19:81	0.44 / 0.84	88.0%	0.58	0.47	0.43	0.36	ND	4.2%	0.02	0.02	0.01	0.02	ND
E02-6	80% Xyl - 0% Thin Stillage	F	89.0	20:80	0.15 /	82.3%	0.33	0.27	0.27	0.24	ND	2.3%	0.01	0.00	0.01	0.01	ND
E03-3	80% Xyl - 115g/L Sucres	F	115.5	19:81	0.12 /	91.0%	0.46	0.36	0.31	0.26	0.49	2.1%	0.01	0.01	0.00	0.01	0.03
E03-4	80% Xyl - 80g/L Sucres	F	78.5	19:81	0.12 /	92.6%	0.40	0.35	0.35	0.33	0.43	0.9%	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
E04-1	0g/L HAc - pH 5.5	F	96.0	20:80	0.12 /	88.3%	0.42	0.33	0.31	0.28	ND	1.5%	0.01	0.00	0.01	0.01	ND
E05-1	0g/L HAc - pH 6	F	91.0	20:80	0.12 /	100.8%	0.28	0.28	0.26	0.28	0.28	51.0%	0.17	0.36	0.22	0.03	0.05
E07-1	MS - 0.5g/L Urée	F	98.5	25:75	0.12 /	85.2%	0.34	0.40	0.43	0.51	0.44	6.4%	0.03	0.02	0.01	0.07	0.04
E01-3	40% Xyl	E	88.0	59:39	0.44 / 0.84	91.3%	1.15	0.78	0.56	0.41	1.43	1.3%	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02
E02-1	40% Xyl - 0% Thin Stillage	F	90.0	60:40	0.15 /	84.8%	0.50	0.57	0.48	0.30	0.51	1.3%	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02
E03-7	40% Xyl - 90g/L Sucres	F	88.5	59:41	0.12 /	92.0%	0.60	0.61	0.65	0.30	0.68	0.9%	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01

*Comparaison entre l'inoculum type #F (ayant subi le niveau de stress le plus élevé) et le type #E (ayant subi le 5^e niveau de stress le plus élevé)

Le Tableau 3.5 regroupe les milieux de fermentation testés ayant une composition assez similaire pour que leurs performances de fermentation soient comparées sur un pied d'égalité. La différence majeure entre ces milieux est le protocole de propagation utilisé afin de préparer leur inoculum. Dans ce tableau, les milieux E01-6 et E01-03 ont été inoculés grâce à des levures propagées selon le protocole #E, alors que le reste des milieux présentés l'ont été avec des levures propagées selon le protocole #F. Noter que les milieux de compositions comparables à E01-3 sont E02-1 et E03-7, le reste des milieux présentés dans le tableau sont comparés à E01-6.

Il est observé que les rendements de tous les milieux sont assez similaires. Il ne semble pas que le protocole de propagation ait un impact mesurable sur le rendement de fermentation. Par contre, pour ce qui est des mesures de productivité, il est clair que le milieu E01-6 est supérieur à tous les autres milieux. En fait, seul le milieu E07-1 semble potentiellement surpasser E01-6 avec une productivité à 72h égales et une productivité éthylique xylolytique supérieure. La productivité xylolytique de E07-1 est cependant douteuse, car elle dépasse la productivité en glycolytique, ce qui est impossible. De plus, E07-1 contenait plus de glucose dans le milieu de fermentation que E01-6. Cela tend à augmenter les productivités à 24h, 48h et 72h, car le glucose est métabolisé plus rapidement que le xylose chez LOMG1. Conséquemment, il est difficile d'affirmer que E07-1 est plus performant que E01-6. Pour ce qui est de E01-3, il apparaît que ce milieu dépasse en performances les milieux E02-1 et E03-7.

Il faut noter que les milieux E01-6 et E01-3 ont une concentration initiale en levures légèrement plus élevée que les autres milieux auxquels ils sont comparés. Ceci pourrait être avancé comme étant la cause de leurs meilleures performances. Par contre, les essais #6 et #16 ont clairement

démontré la corrélation non linéaire entre la concentration initiale en levures et la productivité éthylique (voir Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20 section 10.1.4 et 10.3.3). Les résultats de ces expériences montrent que la biomasse initiale faiblement plus élevée des milieux E01-6 et E01-3 ne pourrait pas expliquer leurs grandes différences en productivités par rapport aux autres milieux. Ces résultats pointent vers la conclusion que le gain en performance observé provient de la différence dans le protocole de propagation des levures.

Tableau 3.6: Effet de la vitalité de l'inoculum sur les performances de fermentation (protocole #E vs #D)*

#ID	Nom	# Protocole	Sucres ini (g/L)	Ratio Glu:Xyl	Cells ini (x10 ⁸ cell*ml ⁻¹ / g*L ⁻¹)	Y _{max}	Performances					Erreur Absolue					
							Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E01-6	80% Xyl	E	90.0	19:81	0.44 / 0.84	88.0%	0.58	0.47	0.43	0.36	ND	4.2%	0.02	0.02	0.01	0.02	ND
E06-1	MS - 0.04g/L Inoc	D	103.5	26:74	/ 0.04	87.0%	0.21	0.53	0.67	0.38	ND	0.9%	0.01	0.06	0.12	0.10	ND
E08-1	MS - Glu Inoc - 100% Xyl	D	87.0	0:100	/ 1.2	89.6%	0.31	0.35	0.31	0.39	NA	24.0%	0.01	0.02	0.03	0.04	NA

*Comparaison entre l'inoculum type #E (ayant subi le 5^e niveau de stress le plus élevé) et le type #D (ayant subi le 4^e niveau de stress le plus élevé)

Le Tableau 3.6 présente des milieux de composition similaire, mais ayant été inoculés avec des levures propagées selon le protocole #E ou le protocole #D. Il ressort qu'il n'y a pas de différence significative dans les rendements de fermentation. Quant aux productivités, il est apparent que le milieu E06-1 performe beaucoup mieux que le milieu E01-6, et ceci avec une biomasse initiale 21 fois moindre. Le milieu E08-1, n'ayant comme source de carbone que du xylose, doit être comparé à E01-6 sur la base de leur productivité éthylique xylolytique. Sur ce comparatif, E08-1 surpasse E01-6 en performance. Ces résultats pointent vers la conclusion que le gain observé provient de la différence dans le protocole de propagation des levures.

Tableau 3.7: Effet de la vitalité de l'inoculum sur les performances de fermentation (protocole #D vs #C)*

#ID	Nom	# Protocole	Sucres ini (g/L)	Ratio Glu:Xyl	Cells ini (x10 ⁸ cell*ml ⁻¹ / g*L ⁻¹)	Y _{max}	Performances					Erreur Absolue					
							Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E11-1	MS - 0.5g/L Urée	D	120.0	18:82	/ 2.1	83.0%	0.81	0.61	0.49	0.44	1.06	1.8%	0.02	0.01	0.00	0.00	0.01
E15-2	Batch	C	115.0	16:84	/ 2.1	90.6%	0.88	1.07	NA	1.02	1.91	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*Comparaison entre l'inoculum type #D (ayant subi le 4^e niveau de stress le plus élevé) et le type #C (ayant subi le 3^e niveau de stress le plus élevé)

Le Tableau 3.7 présente des milieux de composition similaire, mais ayant été inoculés avec des levures propagées selon le protocole #D ou le protocole #C. Il ressort qu'il n'y a pas de différence significative dans les rendements de fermentation. Quant aux productivités, il est apparent

que le milieu E15-2 performe beaucoup mieux que le milieu E11-1. Cette flagrante différence est attribuable au fait que les levures utilisées pour inoculer le milieu E15-2 ont été propagées dans un milieu aérobique, contrairement au milieu E11-1. Or, il est connu que la présence d'oxygène dans un milieu de culture augmente l'activité cellulaire en permettant aux cellules d'utiliser leur chaîne respiratoire et ainsi générer une beaucoup plus grande quantité d'ATP par molécule de glucose. Une autre différence majeure entre les protocoles est la diminution du temps de propagation de 24h à 10h. Sachant que tous les sucres dans le milieu de propagation sont consommés après 10h (résultats non montrés), les levures sont nécessairement déjà entrées dans leur phase de déclin à 24h. Ces résultats pointent vers la conclusion que le gain en performance observé provient de la différence dans le protocole de propagation des levures.

Tableau 3.8: Effet de la vitalité de l'inoculum sur les performances de fermentation (protocole #C vs #B)*

#ID	Nom	# Protocole	Sucres ini (g/L)	Ratio Glu:Xyl	Cells ini ($\times 10^8$ cell*ml ⁻¹ / g*L ⁻¹)	Performances						Erreur Absolue					
						Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E15-2	Batch	C	115.0	16:84	0.89 / 2.1	90.6%	0.88	1.07	NA	1.02	1.91	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E16-1	g/L 2.1 Inoc - 0 HAc - 0 Fuf	B	144.5	17:83	1.04 / 2.1	88.4%	2.23	1.33	NA	1.13	2.54	0.4%	0.05	0.04	NA	0.01	0.01
E18-1	sans pH cont. - 0 HAc - 0 Fuf	B	173.5	17:83	1.12 / 2.1	89.1%	1.99	1.42	NA	0.99	2.91	0.8%	0.02	0.00	NA	0.03	0.12

*Comparaison entre l'inoculum type #C (ayant subi le 3^e niveau de stress le plus élevé) et le type #B (ayant subi le 2^e niveau de stress le plus élevé)

Le Tableau 3.8 présente des milieux de composition similaire, mais ayant été inoculés avec des levures propagées selon le protocole #C ou le protocole #B. Il ressort qu'il n'y a pas de différence significative dans les rendements de fermentation. Quant aux productivités, il est apparent que le milieu E16-1 ou E18-1 performe mieux que le milieu E15-2. Les productivités à 24h et 48h ne peuvent pas être comparées entre ces milieux, car la concentration initiale en sucres est très différente. Il faut donc se tourner vers les productivités en catabolisme du xylose et du glucose. La différence entre les productivités en catabolisme du xylose ne sont pas marquées et il est difficile de savoir si un milieu est plus performant qu'un autre en ne regardant que ce paramètre. Cependant, les productivités en catabolisme du glucose sont nettement supérieures dans les deux milieux ayant reçu un inoculum propagé selon le protocole #B. Ces résultats pointent vers la conclusion que le gain en performance observé provient de la différence dans le protocole de propagation des levures.

Tableau 3.9: Effet de la vitalité de l'inoculum sur les performances de fermentation (protocole #B vs #A)*

#ID	Nom	# Protocole	Sucres ini (g/L)	Ratio Glu:Xyl	Cells ini ($\times 10^8$ cell*ml ⁻¹ / g*L ⁻¹)	Performances						Erreur Absolue					
						Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E18-1	sans pH cont. - 0 HAc - 0 Fuf	B	173.5	17:83	1.12 / 2.1	89.1%	1.99	1.42	NA	0.99	2.91	0.8%	0.02	0.00	NA	0.03	0.12
E19-1	g/L 0 HAc - 0 HMF	A	200.0	50:50	0.32 /	84.8%	2.60	1.63	1.13	0.60	3.21	0.8%	0.01	0.00	0.00	0.01	0.07

***Comparaison entre l'inoculum type #B (ayant subi le 5^e niveau de stress le plus élevé) et le type #A (ayant subi le niveau de stress le plus faible)**

Le Tableau 3.9 présente des milieux de composition similaire, mais ayant été inoculés avec des levures propagées selon le protocole #B ou le protocole #A. Il est observé que le milieu E18-1 a un rendement supérieur au milieu E19-1. Cela peut paraître contredire la proposition qu'un protocole de propagation moins stressant est bénéfique pour les performances de fermentation. Cependant, il faut souligner le fait que la concentration cellulaire dans le milieu E19-1 est passée de 0.32 à 4.47 x10⁸cells/ml, alors que dans le milieu E18-1 elle est passée de 1.12 à 3.43 x10⁸cells/ml. Il est envisageable que le fait de devoir générer une plus grande quantité de biomasse dans le milieu E18-1 ait dirigé davantage de sucres vers le métabolisme de croissance microbienne, au détriment du métabolisme éthylique. Les productivités à 24h et 48h ne peuvent pas être comparées entre ces milieux, car la concentration initiale en sucres est très différente. Les productivités métaboliques sont utilisées à des fins de comparaison. Il apparaît que la productivité éthylique glycolytique du milieu E19-1 est quelque peu supérieure à son homologue E18-1. Quant à la productivité xylolytique, le phénomène contraire est remarqué. Cela pourrait être expliqué par le fait que dans le milieu E19-1, avant d'entrer dans la phase de consommation du xylose, près de 100 g/L de glucose avaient déjà dû être métabolisés (en comparaison à 30 g/L pour E18-1). Cela signifie que la consommation du xylose commence plus tard durant la fermentation, au moment où l'on retrouve plus de coproduits dans le milieu comme l'acide acétique et l'éthanol. Or, ces deux substances sont connues pour être des inhibiteurs de fermentation, et le catabolisme du xylose chez LOMG1 est particulièrement sensible à la présence d'inhibiteurs (voir section 3.2). Il est également envisageable qu'une assez grande concentration nominale en glucose signifie que les levures atteindront leur biomasse maximale avant même d'entrer dans le catabolisme du xylose. Or, sachant que la régulation des gènes change entre la phase de croissances exponentielle et la phase stationnaire, cela pourrait impliquer une régulation à la baisse du PPP ayant pour conséquence d'influencer le métabolisme du xylose tel que discuté à la section 3.3.1.

3.3.3. Conclusion

En conclusion, il a clairement été démontré que le protocole de propagation est un élément clé à la réussite d'une co-fermentation glucose-xylose. Les protocoles #B et #A offrent des performances très similaires, mais il faut garder en vue que le transfert de l'inoculum directement du propogateur au fermenteur sans centrifugation (protocole #A) est une méthode beaucoup mieux adaptée à un procédé industriel. Finalement, les résultats présentés dans cette section supportent la thèse qu'un inoculum préparé de façon à minimiser le stress encouru par les microorganismes est primordial, surtout chez LOMG1 où la voie catabolique la plus affectée est celle du xylose. Conséquemment, il est fortement recommandé de mener plus de tests afin d'optimiser l'étape de la propagation; principalement, il est important de s'assurer que les levures sont transférées du propogateur au fermenteur vers la fin de leur phase exponentielle.

3.4. Cinétiques de croissance de LOGM1

Tel que discuté dans la section 3.3, la propagation est une étape cruciale afin d'augmenter la vitalité et la robustesse des levures avant la fermentation d'hydrolysats. Le second rôle de la propagation est d'augmenter la concentration cellulaire initiale dans la fermentation afin d'accélérer les cinétiques pour terminer la fermentation dans un temps acceptable. Il est possible d'augmenter la concentration cellulaire initiale en ajoutant une plus grande quantité de levure sèche, mais cela requière l'achat d'une plus grande quantité de levures. Sachant que l'achat de levures OGM représente potentiellement un coût opérationnel élevé dans un procédé de fermentation d'hydrolysats, il est crucial de connaître la dynamique de croissance de LOGM1 dans une étape de propagation similaire à ce qui est retrouvé à l'échelle industrielle. Principalement, le taux de croissance et la concentration maximale atteignable dans le milieu de propagation sont des données essentielles afin de déterminer les coûts d'achat des levures dans un procédé.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#20 investigate l'impact de la taille de l'inoculum sur les cinétiques de croissance cellulaire de LOGM1 dans un milieu synthétique et dans un milieu de mout de maïs. De plus, la corrélation permettant de convertir la mesure de la concentration cellulaire en unité de « cellules*10⁸ / ml » à une unité de « gramme de cellules / ml » est calculée.

3.4.1. Protocole

Tableau 3.10: Protocole des tests effectués dans le cadre de la série d'essais #20

Composition et paramètres communs des milieux de culture						
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité	
			Urée	1	g/L	
			Lactrol	0.01	g/L	
			pH ini	5.2		
			Température	33	C	
			Agitation	350	rpm	
			Aération	1	vvm	
			Fermenteur	Bioréacteurs 2L		

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E20-1	MS - 0.4 g/L Inoc	2	Milieu de fermentation (MS)	171.0	<i>g/L glucose</i>
			Extrait de Levures	60 g/L	
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.20	<i>x10⁸ cell/ml</i>
				0.4	<i>g/L</i>
E20-2	Moût - 7.1 g/L Inoc	1	Milieu de fermentation (Moût)	ND	<i>g/L glucose</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	3.30	<i>x10⁸ cell/ml</i>
				7.1	<i>g/L</i>
E20-3	Moût - 12.4 g/L Inoc	1	Milieu de fermentation (Moût)	ND	<i>g/L glucose</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	5.80	<i>x10⁸ cell/ml</i>
				12.4	<i>g/L</i>

Le Tableau 3.10 détaille le protocole utilisé tel qu'expliqué à l'Annexe B : Protocoles d'analyses et aide à la compréhension des figures pour les résultats expérimentaux. Noter que pour les milieux à base de mouts, les enzymes permettant d'hydrolyser les sucres ont été ajoutés en début de propagation, ce qui génère une relâche graduelle des sucres (contrairement au protocole de la série d'essais #10, où le mout avait été préalablement complètement hydrolysé).

Noter qu'afin de quantifier la concentration cellulaire en termes de g/L, des échantillons de milieu de culture ont été prélevés dans les milieux synthétiques seulement, puisque le mout de maïs contient beaucoup de solides en suspension. Ces échantillons ont ensuite été lavés sur un filtre 0.2 micron, puis séchés afin de calculer la masse sèche équivalente.

3.4.2. Résultats

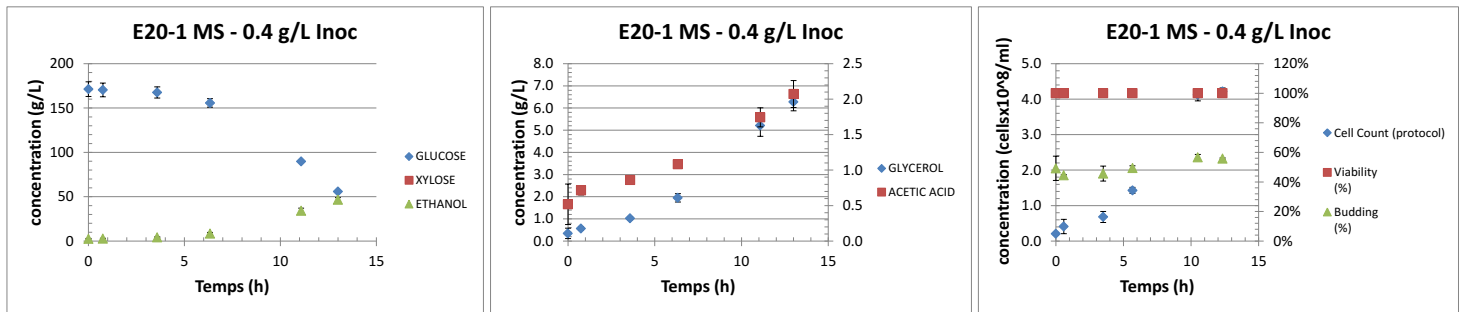


Figure 3.2: Données de suivi de fermentation pour le milieu testé ID# E20-1

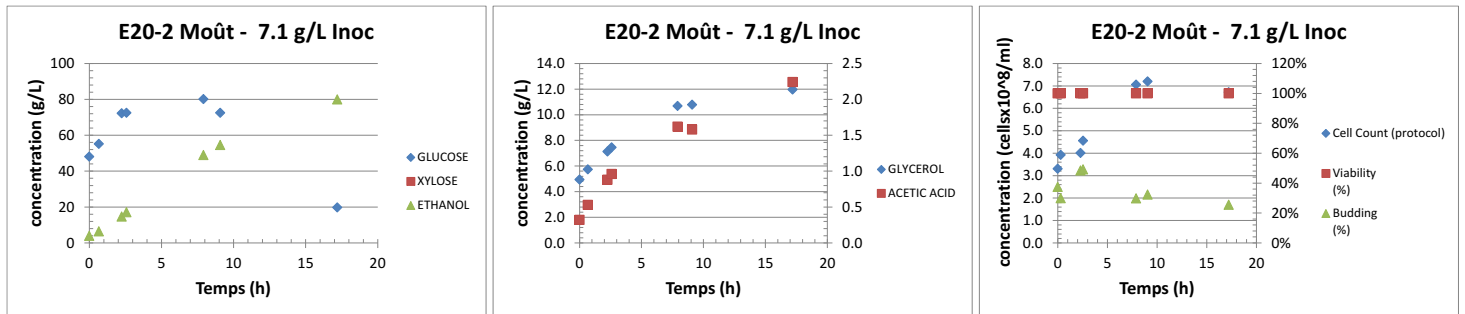


Figure 3.3: Données de suivi de fermentation pour le milieu testé ID# E20-2

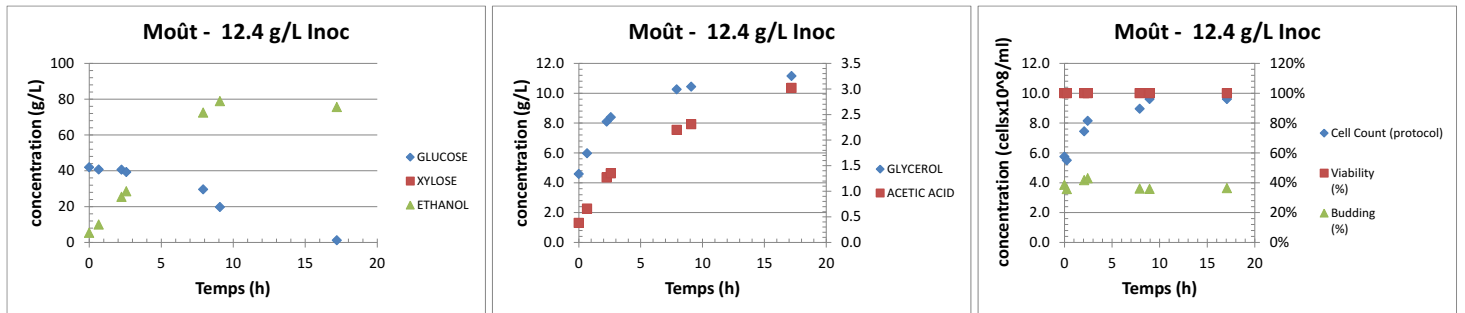


Figure 3.4: Données de suivi de fermentation pour le milieu testé ID# E20-3

Noter l'allure particulière du suivi de la concentration en glucose de la Figure 3.3 et de la Figure 3.4 où la concentration de sucres augmente ou stagne initialement. Noter que cela est dû au fait que les enzymes hydrolysant les chaînes d'amidon du mout ont été ajoutées en début de fermentation et cela mène à la relâche progressive du glucose.

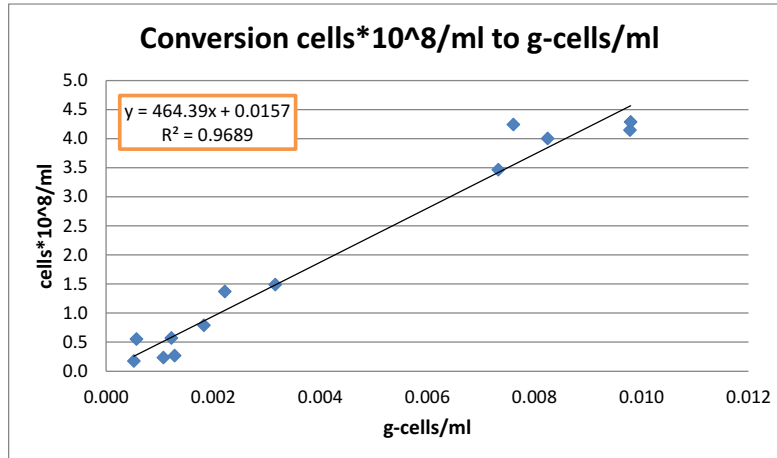


Figure 3.5: Corrélation entre les unités de concentration cellulaire « g-cells/ml » et « x10⁸ cells/ml

La Figure 3.5 montre les résultats des mesures de la concentration cellulaire dans les 2 unités étudiées. En utilisant un outil de régression linéaire, cela permet d'obtenir la corrélation entre les 2 unités et cette corrélation permet d'interchanger entre ces 2 unités.

Tableau 3.11: Résultats comparatifs de la concentration cellulaire des 3 milieux testés dans la série d'essais #20

Milieu	Composition	Cells ini (cells*10 ⁸ /ml)	Cells fin (cells*10 ⁸ /ml)	Cells ini (g/L)	Cells fin (g/L)	Ratio Réplication	Masse de cellule générée (g/L)
E20-1	MS - 0.4 g/L Inoc	0.2	4.1	0.4	8.8	20.6	8.4
E20-2	Moût - 7.1 g/L Inoc	3.3	7.2	7.1	15.5	2.2	8.4
E20-3	Moût - 12.4 g/L Inoc	5.8	9.6	12.4	20.6	1.7	8.2

Le Tableau 3.11 rapporte les résultats des 3 milieux de propagation testés entre le début de la propagation (t = 0 h) et la fin de la propagation (t = 10 h). Le ratio de réplication consiste à diviser la concentration de cellules finale sur la concentration de cellules initiale. Ce ratio indique clairement que le taux de croissance diminue en relation à la concentration initiale de cellules. Par contre, les masses de cellules générées dans les 3 milieux testés durant les 10h de propagation sont très similaires. Cela est particulier et il est difficile d'expliquer ce résultat de façon phénoménologique.

Tableau 3.12: Tableau et figure du modèle de croissance cellulaire développé pour le milieu de fermentation E20-1

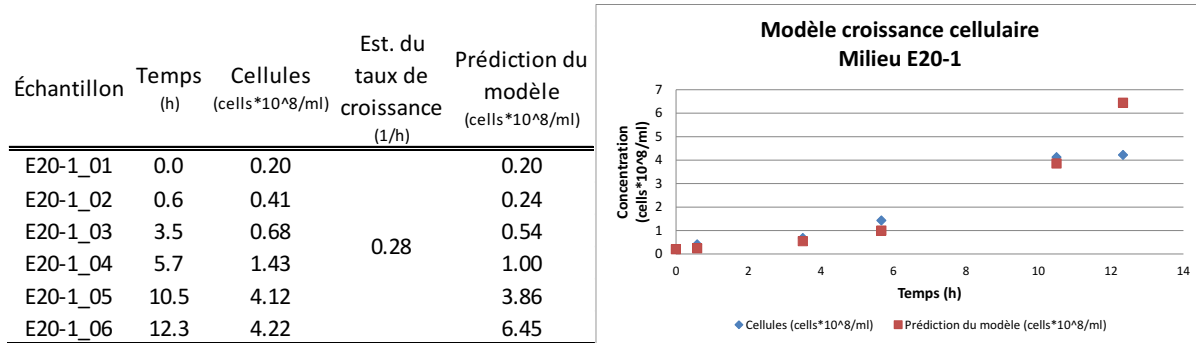


Tableau 3.13: Tableau et figure du modèle de croissance cellulaire développé pour le milieu de fermentation E20-2

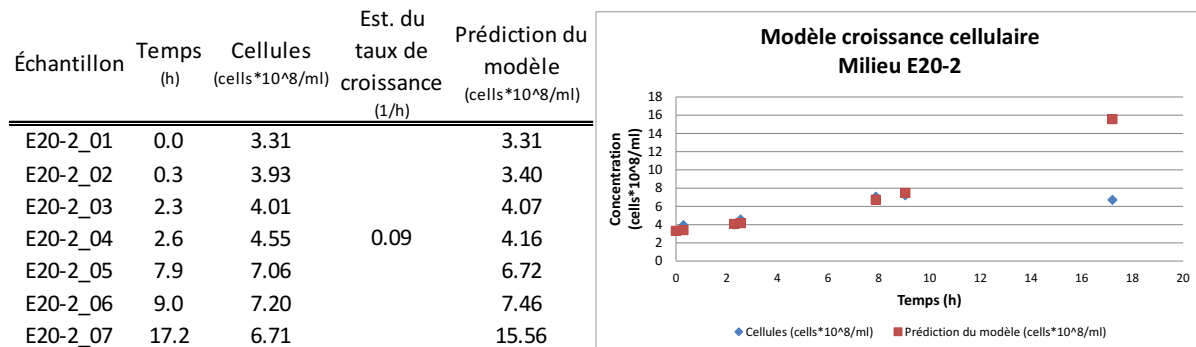
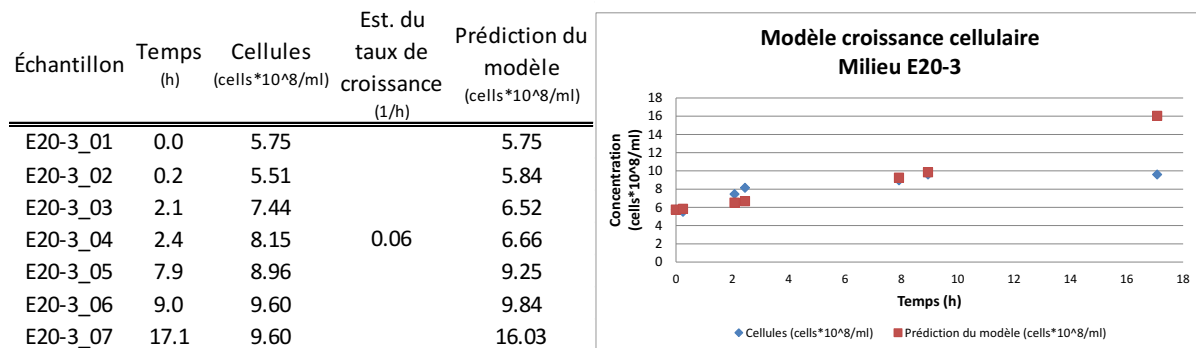


Tableau 3.14: Tableau et figure du modèle de croissance cellulaire développé pour le milieu de fermentation E20-3



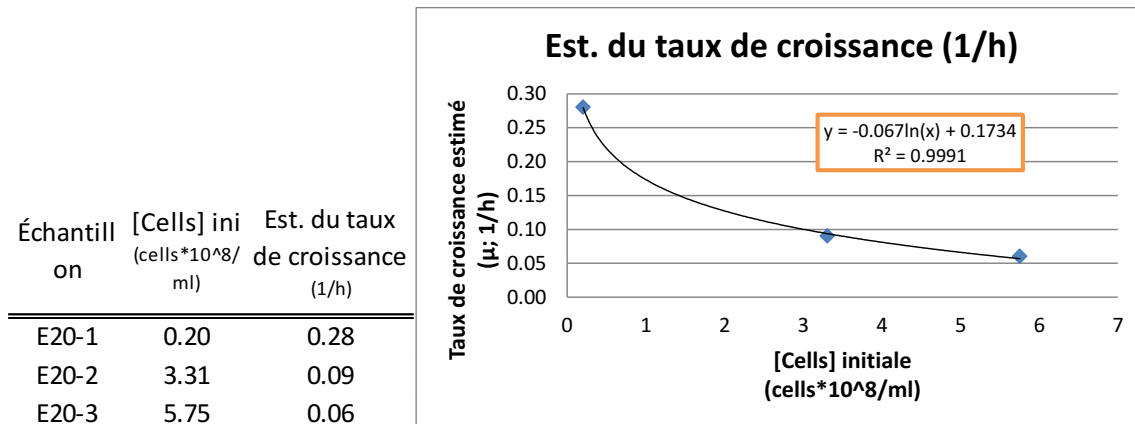
Les figures et tableaux ci-dessus (Tableau 3.12, Tableau 3.13, Tableau 3.14) détaillent les données de croissance cellulaire des trois milieux testés, ainsi que le modèle de cette croissance pour chacun d'eux. Effectivement, le taux de croissance de LOGM1 est une donnée importante afin de pouvoir modéliser l'étape de propagation dans un procédé industriel de fermentation des LCH. Les valeurs du taux de croissance (μ) estimé pour les 3 milieux sont choisies afin que le modèle de croissance cellulaire approxime adéquatement la croissance réelle durant les 10 premières heures de la propagation. Ceci est dû au fait qu'il est anticipé que la propagation à l'échelle industrielle sera d'une durée approximative de 10 h. Le taux de croissance du modèle doit donc être changé adéquatement afin de représenter fidèlement la réalité à l'échelle industrielle.

[1]

$$[Cells]_t = [Cells]_{ini} e^{\mu t}$$

Noter que le modèle de croissance utilisé ici est une simple relation de croissance exponentielle telle que décrite par l'équation ci-dessus. Il ne tient donc pas compte du fait qu'il semble y avoir une concentration en levures maximale atteignable.

Tableau 3.15: Modélisation de la corrélation entre le taux de croissance de LOGM1 et la concentration initiale en levure dans le milieu de fermentation.



Le Tableau 3.15 compare les résultats des 3 milieux testés en rapportant leur concentration cellulaire initiale et leur taux de croissance respectif. Une régression exponentielle permet par la suite d'obtenir une corrélation entre la concentration cellulaire initiale et le taux de croissance. Noter que la corrélation est une approximation et n'est valide que dans la plage de données testées dans cette série d'expérimentation : soit entre 0.2 et 5.8 cells*10⁸/ml et entre 0 h et 10h de propagation. Cette relation est un outil important afin de pouvoir donner une flexibilité à un modèle développé afin de simuler une propagation dans le cadre d'un procédé de fermentation à l'échelle industrielle (voir section 4.4.2).

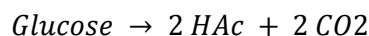
Tableau 3.16: Coefficients des réactions métaboliques durant la propagation, obtenus par expérimentation et exprimés sur une base massique

Base	Estimations	Glucose	Éthanol	Glycérol	Acide Acétique	CO ₂	Levures
mole	Théorique	-3	2	2	2	4	NA
Mass	Données	-81.40	31.63	4.87	1.55	31.35	NA

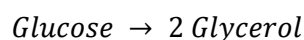
[2]



[3]



[4]



Le Tableau 3.16 présente les coefficients molaires (théoriques) et massiques (mesurés dans cette série d'expériences) des équations de réaction métabolique de formation de l'éthanol, du glycérol et de l'acide

acétique à partir du glucose. Les coefficients massiques mesurés expérimentalement sont requis afin de pouvoir modéliser l'étape de propagation à l'échelle industrielle. Le coefficient massique de production de CO₂ est calculé à partir de la production d'éthanol et de glycérol. La quantité de levures produite durant la propagation peut être déterminée en utilisant le modèle adéquat de croissance cellulaire présenté précédemment dans cette section.

3.4.3. Conclusions

Cette section permet de tirer les conclusions suivantes :

1. Le taux de croissance de LOGM1 varie en fonction de la concentration cellulaire initiale. Plus la concentration initiale est élevée, plus le taux de croissance diminue. Dans cette section, 3 taux de croissance ont été proposés afin de modéliser la croissance de LOGM1 à partir de 3 concentrations cellulaires initiales.
2. La croissance de LOGM1 s'effectue jusqu'à l'atteinte d'une concentration cellulaire maximale qui dépend de la concentration cellulaire initiale. La concentration maximale atteignable dans l'étape de propagation (suivant le protocole de propagation décrit dans cette section) est de 4.2, 7.2 et 9.6 cells*10⁸/ml pour une concentration cellulaire initiale de 0.2, 3.3 et 5.8 cells*10⁸/ml, respectivement.
3. En utilisant les données présentées dans cette section, il est possible de simuler fidèlement une étape de propagation d'une durée approximative de 10h à partir d'une concentration cellulaire initiale avoisinant l'une 0.4, 7.1 ou 12.4 g-cells/L.

3.5. Conclusion générale des expérimentations à l'échelle laboratoire

Il a été démontré que les principaux facteurs affectant les performances de fermentation de LOGM1 sont la présence d'inhibiteurs dans les LCH et l'étape de propagation des levures. LOGM1 présente un métabolisme de type diauxique quant à la consommation du glucose et du xylose. Le métabolisme de fermentation du xylose est nettement moins rapide que celui du glucose, alors que le rendement des 2 métabolismes est similaire. De plus, le métabolisme du xylose est plus fortement affecté que celui du glucose par les changements environnementaux de la fermentation ou la présence d'inhibiteurs. La totalité des résultats des tests effectués en laboratoires sont donnés à Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20. Cette annexe fournit aussi les analyses et conclusions de ces tests. Grâce à ces données de performance, il est possible d'estimer les cinétiques de propagation, la productivité et le rendement de fermentation des LCH par LOGM1. Ces estimations sont requises afin de pouvoir élaborer une simulation du procédé à l'échelle industrielle et en analyser la faisabilité technico-économique.

4. Ingénierie préliminaire du procédé LCH²

4.1. Vue d'ensemble du procédé LCH : choix des étapes de transformation

Vue l'immaturation des technologies de fermentation des LCH, plusieurs données restent encore inconnues quant au fonctionnement des différentes étapes de la chaîne de production d'un procédé de fermentation des bouillons d'hydrolyse cellulosique et hémicellulosique à l'échelle industrielle. Principalement, la composition chimique de certains intrants ou extrants et les consignes optimales des paramètres de certaines opérations unitaires pouvant poser un problème quant au design de certains équipements. Conséquemment, lors du design préliminaire du procédé LCH cela génère plusieurs possibles configurations d'opérations unitaires. La Figure 4.1 présente un diagramme de transformation rudimentaire dans lequel, pour chacune des étapes de transformation, il existe multiples options d'opérations.

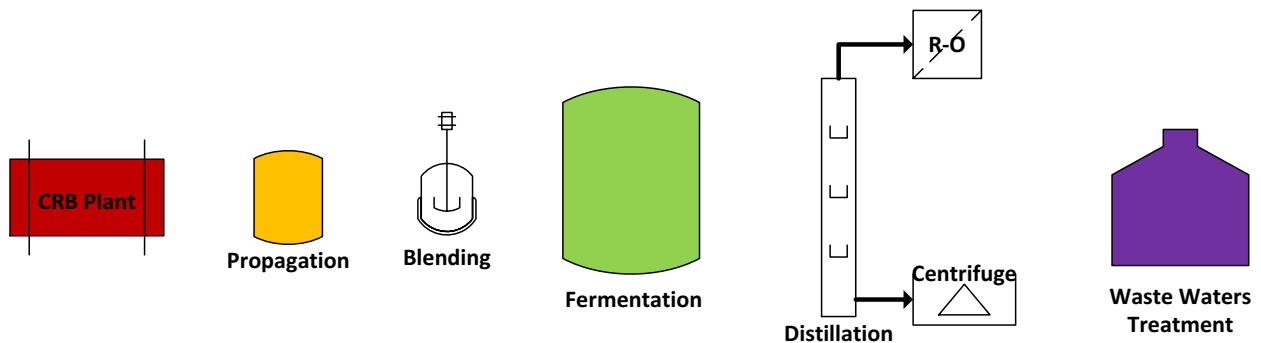


Figure 4.1: Diagramme de transformation rudimentaire du procédé LCH.

La Figure 4.2 propose une vue, sous forme de diagramme hiérarchique, de toutes les configurations potentielles qui ont été analysées pour le procédé LCH. Noter qu'elle ne présente que la première branche du diagramme et non la totalité. Cette section résume la rationnelle des choix ayant été faits afin de réduire le nombre de configurations possibles, de plusieurs dizaines à seulement 6.

² Noter que, dans cette section, plusieurs des tableaux et des figures sont présentés en anglais. En effet, cette section présente le rapport d'ingénierie préliminaire du procédé de fermentation d'hydrolysats lignocellulosiques à l'échelle industrielle, qui a initialement été rédigé en anglais pour le partenaire industriel Éthanol Greenfield Inc.

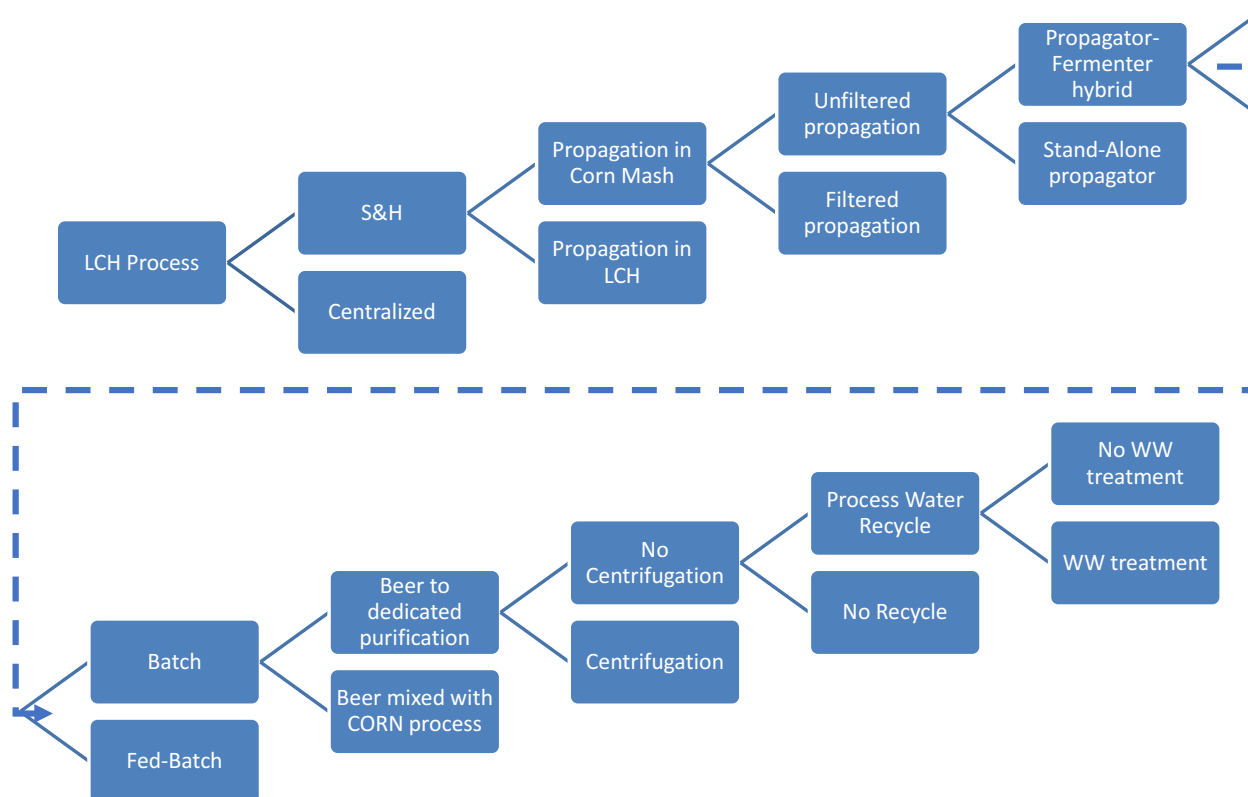


Figure 4.2: Diagramme hiérarchique montrant la pluralité des configurations envisageables pour le procédé LCH.

4.1.1. Production des hydrolysats lignocellulosiques : S&H vs Centralisé

Le 1^{er} embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose le choix suivant :

- Configuration « S&H » : La localisation de l'usine de production des LCH de CRB est totalement séparée de l'usine d'ETG où sera localisé le procédé LCH. Cette configuration appelée « Spokes & Hub » (S&H) propose donc des usines satellites de production des LCH pouvant fournir une production centralisée d'éthanol cellulosique. Ce scénario oblige que le transport des LCH se fasse par voie routière;
- Configuration « Centralisé » : L'usine de production des LCH de CRB est localisée sur le site de l'usine d'ETG. Ce scénario appelé « Centralisé » (Centralized) permet la livraison des LCH directement de CRB au procédé LCH par voie de pipeline.

Ces deux scénarios sont possibles, la différence majeure repose sur les coûts de transport engendrés par la configuration S&H. Noter que, dans le cas d'une configuration Centralisée, le coût d'investissement initial sera plus élevé dû à la construction du pipeline.

Dans le cadre de la production d'éthanol lignocellulosique, la stratégie d'ETG est de n'être que l'acheteur de jus sucrés et de déléguer tout ce qui a trait à la manipulation de la MLC à CRB. Malgré cela, il est important d'analyser l'ensemble des impacts des 2 configurations sur les coûts d'opération de toute la chaîne de production, car ETG reste le seul acheteur de jus sucré et se verra donc assumer toutes hausses de coûts opérationnels du procédé de production des LCH.

Si les hydrolysats sont produits hors site, cela implique :

- 1) Plusieurs petites unités de stockage de la MLC. En effet, la perte de biomasse par moisissures due au mauvais entreposage est significative et la construction d'un bâtiment d'entreposage sera probablement requise [Holmes, 2013]. La prévention de la perte de MLC par moisissures demande la construction d'un abri. Dans une configuration Centralisée, cela représente un investissement moins grand que dans un scénario S&H, car plusieurs petits bâtiments seront plus coûteux qu'un seul gros bâtiment. L'exception faite de l'éventualité où la MLC reste entreposée chez le producteur; en quel cas le coût d'investissement reste nul, peu importe de la configuration;
- 2) L'élaboration d'une logistique de transport des LCH. En effet, il est envisagé qu'il soit profitable pour les usines CRB de produire de façon continue un plus petit volume que de fonctionner par intermittence à plus grande capacité. Donc un réservoir tampon sera nécessaire au site de production d'hydrolysats. Ce volume tampon devra être de dimensions similaires à celles du fermenteur. Dans une configuration S&H, plusieurs petits réservoirs tampons seront plus coûteux qu'un seul plus volumineux dans le cas d'une configuration C;
- 3) Dans le cas où les eaux usées sont retournées aux usines satellites de CRB, un réservoir tampon devra être présent aux deux sites : aux usines satellites de CRB et au procédé LCH central d'ETG. Cela implique encore un investissement plus important s'il y a plusieurs usines satellites.

Si les hydrolysats sont produits sur le site, cela implique :

- 1) Une seule unité de stockage de la MLC pour CRB;
- 2) Une seule unité de stockage tampon des LCH;
- 3) Une baisse de complexité par rapport à la logistique de transport des LCH, qui se fait par pipeline au lieu de camions-citernes.

4.1.2. Source de sucres pour la propagation : propagation dans les LCH ou dans le mout de maïs

Le 2^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose le choix suivant :

- A. Propager les levures directement dans les LCH;
- B. Propager les levures dans un médium plus « propre » et plus propice à une bonne croissance cellulaire telle que le mout de maïs.

Les expérimentations en laboratoire ont fermement démontré le pouvoir des LCH comme inhibiteurs de croissance cellulaire (section 10.3). De plus, il est estimé que les coûts d'achat de LOGM1 servant à la fermentation des LCH seront élevés (section 5.2). Conséquemment, une opération de propagation permettrait d'accroître significativement la quantité de levure initiale dans le fermenteur à des coûts moindres qu'une inoculation directe. Finalement, les expérimentations en laboratoire ont aussi démontré l'importance d'une bonne propagation afin d'obtenir de bonnes cinétiques de fermentation (section 3.3). Pour cela, il faut opérer la propagation dans un milieu minimisant le stress sur les levures. Le mout de maïs est un bon candidat pour cela, et il est un substrat abondant, de qualité constante et facilement accessible par le biais du procédé MG s'opérant présentement chez ETG.

Pour ces raisons, il est supposé que la propagation doit s'opérer en utilisant du mout de maïs, et l'option d'utiliser des hydrolysats est abandonnée.

4.1.3. Propagation dans un propagateur dédié ou directement dans le fermenteur

Le 3^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose un choix quant à la propagation. La propagation est une étape cruciale à une bonne fermentation subséquente. De plus, il est estimé qu'il sera nécessaire d'avoir une aération durant la propagation. Ainsi, cela requiert un propagateur bien construit et optimisé pour la propagation des levures OGM. Deux options s'offrent ici :

- A. La construction d'un propagateur séparé du fermenteur (ce qui est retrouvé de façon standard dans l'industrie). Afin de servir adéquatement dans le procédé LCH, ce propagateur devrait avoir un volume actif d'environ 20 m³. Or, un propagateur dédié demandera ses propres pompes, son échangeur de chaleur, sa tuyauterie et devrait être situé à l'intérieur d'un bâtiment. Une estimation du département d'ingénierie d'ETG porte le coût d'investissement d'une telle approche à près de 800 k\$ (soit 300 k\$ pour le propagateur et 500 k\$ pour le bâtiment);
- B. La possibilité de faire l'étape de propagation directement dans le fermenteur s'avère donc être une option intéressante. En effet, cela permet de réduire le nombre d'équipements nécessaires et de réduire les coûts. Par contre, cela augmente la complexité du design du fermenteur, car le volume utile minimal doit être très petit (de seulement 10 m³; section 4.3.5) et le système d'aération doit être conçu à même le fermenteur.

Il est estimé qu'un bon design du fermenteur, en prenant compte des besoins de la propagation et de la fermentation, peut être accompli afin d'accommoder les deux opérations. Cela diminue le coût et la complexité du procédé de fermentation LCH. Pour ces raisons, il est supposé que la propagation s'opèrera directement dans le fermenteur, qui sera équipé et conçu en conséquence. L'option d'avoir un propagateur séparé est en conséquence rejetée.

4.1.4. Filtration du mout de maïs

Le 4^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose un choix quant à la revalorisation des solides du mout de maïs. Sachant que le mout de maïs est utilisé dans la propagation, il faut évaluer l'impact que cela aura sur le procédé MG et le procédé LCH. En effet, dans le procédé MG, le mout contient le potentiel de produire l'éthanol, les drêches de distilleries et le CO₂, soit les 3 sources de revenus du procédé MG. Il devient donc intéressant de séparer les sucres solubilisés des solides suspendus dans le mout afin d'utiliser la fraction liquide pour la propagation du procédé LCH et de retourner les solides suspendus dans le procédé MG. Se faisant, la fraction solide pourrait être convertie en drêches de distillerie et avoir une valeur ajoutée; alors que si elle est laissée dans le procédé LCH, elle n'aura aucune valeur ajoutée. La série d'équations [5] calcule le retour sur l'investissement (ROI) de cette option.

$$\begin{aligned} \text{Volume de fermentation LCH} &= 200 \text{ m}^3 \\ \text{Volume de propagation} &= 15 \text{ m}^3 \text{ (ratio 1: 15)} \\ 15 \text{ m}^3 &= 15000 \text{ L} * 32\% \text{ solides} = 4800 \text{ kg de maïs équivalent} \\ 4.8 \text{ ton maïs} * 29\% \text{ taux de récupération des DDGS} &= 1.392 \text{ ton} \end{aligned}$$

$$1.392 \text{ ton} * 280\$/\text{ton} * 50 \text{ fermentations}/\text{an} = 19488\$/\text{a}$$
$$\text{Coût d'un système de filtration} = 84\text{k}\$ \rightarrow \text{ROI} = 4.3 \text{ ans}$$

[5]

Toutes les estimations présentées dans les calculs ci-dessus sont issues des données du procédé d'ETG et l'estimation du coût d'achat d'un système de filtration de 84k\$ a été fournie par l'ingénierie d'ETG. Un ROI de 4.3 ans pourrait être acceptable, néanmoins il faut prendre en compte d'autres facteurs :

1. L'ajout de mout « entier » dans le procédé LCH apporte des nutriments essentiels à la fermentation subséquente et cela pourrait permettre de réduire les coûts d'achat en nutriments nécessaires à la fermentation des LCH (section 5.2);
2. Le mout possède une excellente capacité d'agent anti-mousse provenant des gras qu'il contient. La filtration de ce dernier pourrait lui retirer cette capacité et il serait alors nécessaire d'ajouter un agent anti-mousse dans la fermentation des LCH;
3. Il n'y aura pas réellement 55 cuvées par ans de fermentation des LCH. En effet, le projet de procédé LCH avec en son centre un fermenteur de 200 kL est conçu afin de pouvoir accepter des matières premières autres que les LCH, telles que des mélasses, et qui n'ont pas besoin de l'unité de filtration. Ainsi, le ROI réel se trouve probablement plus dans la plage des 8 ans.

Ces facteurs font en sorte que l'unité de filtration du mout est éliminée des scénarios possibles et ne sera donc pas explorée plus profondément.

4.1.5. Fermentation type cuvée ou cuvée-alimentée

Le 5^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose un choix dans le mode d'alimentation du fermenteur lors de la fermentation des LCH :

- A. Mode cuvée (batch), dans lequel les hydrolysats sont transvidés dans le fermenteur rapidement en début de fermentation. Ce scénario requiert des équipements à plus grande capacité, car le débit de chargement est élevé;
- B. Mode cuvée alimentée (fed-batch), dans lequel les hydrolysats sont transvidés de manière graduelle tout au long de la fermentation. Ce type de fermentation est parfois utilisé afin d'éviter le phénomène d'inhibition par le substrat. Ici, une telle opération permettrait de diminuer la capacité du réservoir tampon des LCH.

La section 10.2.1 présente une série de tests effectués en laboratoire afin d'analyser les performances de fermentation des LCH en cuvée-alimentée. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre le mode cuvée ou cuvée-alimentée. Par ailleurs, le seul avantage entrevu par l'opération du procédé en mode cuvée-alimentée serait une réduction dans le volume du réservoir tampon des LCH et conjointement la réduction du coût d'achat de cet équipement. Cela a un effet négligeable sur le total de l'investissement en capital initial et sur les coûts opérationnels du procédé LCH (résultats non montrés). À des fins de simplification, le choix d'un procédé opérant en mode cuvée-alimentée est rejeté.

4.1.6. Mélange de la bière du procédé LCH à la bière du procédé MG

Le 6^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose l'option de mélanger directement la bière du procédé LCH à la bière du procédé MG actuellement opéré chez ETG. Cela aurait l'avantage de diminuer appréciablement l'investissement en capital initial du procédé LCH puisqu'aucun nouvel équipement de purification d'éthanol ne serait requis. Néanmoins, il est difficilement envisageable que la bière sortant du fermenteur LCH puisse être mélangée à la bière du procédé MG, pour les raisons énumérées ici-bas :

- 1) La coloration foncée de la bière provenant du procédé LCH pourrait changer la coloration des drêches du procédé MG d'un jaune clair à une autre couleur jugée inacceptable;
- 2) Les réglementations gouvernementales ou les pressions de la clientèle ne permettent actuellement pas le mélange des OGM du procédé LCH avec les produits du procédé MG;
- 3) Vue la nouveauté technologique du procédé LCH et les subventions gouvernementales associées au projet, il est probable qu'un système de purification propre à ce procédé soit requis à des fins de certification de productivité (effectuée par des firmes externes; ex : installation d'un débitmètre d'éthanol pur certifié par une tierce partie).

Ces facteurs éliminent la possibilité de joindre la bière des 2 procédés. Conséquemment, seule la configuration où le procédé LCH possède ses propres unités de purification et où aucun mélange ne se produit avec le procédé MG est retenue.

4.1.7. Unité de centrifugation

Le 7^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose une unité de centrifugation du Stillage (extrants du bas de la colonne à distiller). La centrifugation permet de récupérer les drêches de distillerie dans les procédés de fermentation conventionnels. Par contre, les LCH ne contiennent pas de fraction de solides insolubles. Une centrifugation permettrait donc de récupérer seulement les levures mortes et le peu de solides suspendus non fermentables apporté par le mout de maïs utilisé pour la propagation. De plus, même si les solides étaient récupérés, il n'existe pas de marché pour ce type de drêche en ce moment. Ces drêches seront de couleur noire, contiendront des levures OGM et seront produites en petite quantité. Il est estimé que la fraction de solides en suspensions dans la bière suite à la fermentation de LCH ne serait que de 1-3% (résultats non montrés). Conséquemment, il est supposé qu'une unité de centrifugation ne sera pas nécessaire dans le procédé LCH.

4.1.8. Recyclage des eaux usées

Le 6^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose l'option de recycler ou non les eaux usées du procédé LCH. Le recyclage des eaux usées dans les distilleries est un aspect environnemental crucial. En effet, le rejet d'eaux usées riches en demande chimique en oxygène (COD) et en matières en suspension ne peut pas se faire sans traitement. Les eaux usées produites par le procédé LCH sont composées du Stillage, des eaux usées provenant de l'opération du nettoyage en place (waste CIP waters; WCIP) et du perméat de la filtration membranaire. Dans le procédé MG actuel, ces eaux sont traitées par voie de biométhanisation avant d'être recyclées à l'entrée du procédé. La demande en eau principale dans la chaîne de transformation du procédé LCH se trouve dans le procédé d'hydrolyse de la MLC par CRB. Selon les connaissances actuelles, il ne semble pas y avoir de problème à recycler les eaux usées directement dans le procédé d'hydrolyse de CRB (avec ou sans traitement par biométhanisation).

La possibilité de ne pas recycler les eaux usées existe; par contre, il est nécessaire de les traiter afin de rencontrer les normes environnementales de rejet. Ceci s'effectue en ajoutant une opération de traitement des eaux usées. Cependant, l'investissement en capital pour une unité de biométhanisation pouvant traiter les eaux usées du procédé LCH (avec les capacités décrites à la section 4.9) est évalué à près de 500 k\$ [Dick, 2013-04-10]. Or, cela n'est pas envisageable en considérant les présentes prédictions économiques (section 5).

Néanmoins, ETG procède présentement à la construction d'une usine de biométhanisation des déchets putrescibles de la ville de Varennes (usine Biométhanisation Varennes). Le site de ce nouveau procédé est localisé au présent site d'ETG où sera aussi construit le procédé LCH. Il serait donc possible d'y envoyer les eaux usées par voie de pipeline afin qu'elles y soient traitées. L'intégration des 2 procédés (fermentation des LCH et Biométhanisation Varennes) dépasse la portée de ce rapport, mais il est fortement suggéré d'en explorer la faisabilité.

En conclusion, il existe présentement 2 options envisageables : le recyclage direct des eaux usées du procédé LCH dans le procédé d'hydrolyse de CRB, ou bien, envoyer les eaux usées à la future usine de Biométhanisation Varennes.

4.1.9. Traitement des eaux usées

Le 7^e embranchement rencontré dans la Figure 4.2 propose l'option de traiter ou non les eaux usées du procédé LCH. Tel que discuté dans la section précédente, si les eaux usées ne sont pas recyclées dans le procédé d'hydrolyse, alors le traitement devient obligatoire. Le seul traitement économiquement viable est d'envoyer les eaux usées à la future usine de Biométhanisation Varennes. Suite à leur traitement, les eaux seront en état d'être retournées à l'environnement ou encore pourront être recyclées dans le procédé d'hydrolyse de CRB.

4.2.Sélection des 6 configurations du procédé LCH à l'étude

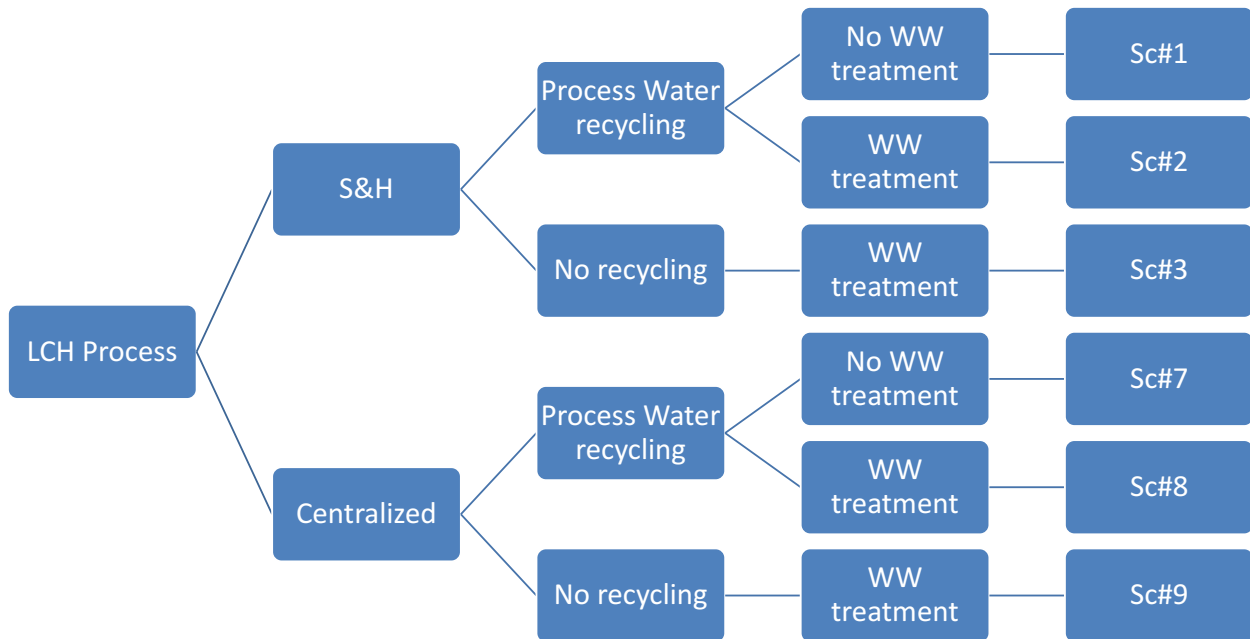


Figure 4.3: Diagramme hiérarchique détaillant les 6 configurations du procédé LCH à l'étude.

Suite aux choix et conclusions tirés dans les sections précédentes, la Figure 4.3 présente les 6 configurations possibles et potentiellement réalisables que peut prendre le procédé de fermentation des LCH.

1. Le 1^{er} embranchement présente le choix entre un procédé centralisé (Centralized) dans lequel les liquides voyageant entre CRB et ETG sont transportés par voie de pipeline ou le choix d'un procédé de type Spokes & Hub (S&H) dans lequel le transport se fait par camions-citernes.
2. Le 2^e embranchement présente le choix de recycler les eaux usées sortant du procédé LCH dans le procédé d'hydrolyse de CRB. L'option de ne pas recycler les eaux usées est retenue, mais ne devrait être prise qu'en défaut de la première option.
3. Le 3^e embranchement présente le choix de traiter les eaux usées afin d'en diminuer la teneur en matière organique ou de ne pas traiter les eaux usées. Puisque le traitement des eaux usées apporte un niveau de complexité et des coûts d'investissement supérieurs, cette option est jugée inférieure au recyclage direct sans traitement.

Les 6 configurations à comparer et étudier dans ce rapport sont :

1. Configuration #1 : S&H / Recyclage des eaux / Sans traitement;
2. Configuration #2 : S&H / Recyclage des eaux / Avec traitement;
3. Configuration #3 : S&H / Sans recyclage / Avec traitement;
4. Configuration #7 : Centralisé / Recyclage des eaux / Sans traitement;
5. Configuration #8 : Centralisé / Recyclage des eaux / Avec traitement;
6. Configuration #9 : Centralisé / Sans recyclage / Avec traitement.

4.3.Résumé du procédé

L'analyse de faisabilité présentée à la section précédente (section 4.1) a permis de conclure que 6 configurations de procédé LCH étaient potentiellement réalisables. Cette section présente un résumé du procédé LCH accompagnant les diagrammes d'écoulement pour chacune des 6 configurations présentées à la section 4.6.2. Puisque certaines étapes du procédé LCH divergent dépendamment de la configuration étudiée, les configurations auxquelles s'applique l'item discuté sont précisées. Noter que les références aux diagrammes d'écoulements (D-E) de la section 4.6.2 sont inscrites en italique.

4.3.1. Transport et stockage de la MLC

Il est entrevu que ETG sera l'acheteur des LCH (ou autres jus sucrés), mais ne s'occupera pas de leur production. Dans le plan d'affaires envisagé, il est prévu que CRB sera en charge de tout ce qui a trait à la production des LCH, de l'achat de la biomasse lignocellulosique à l'entreposage des hydrolysats avant leur transport vers le procédé LCH d'ETG. Il apparaît donc que CRB sera propriétaire et en charge des items suivants :

1. Achat, transport et entreposage de la biomasse lignocellulosique (applicable à toutes les configurations);
2. Procédé d'hydrolyse de la biomasse et entreposage des LCH (applicable à toutes les configurations);
3. Transport et entreposage des eaux usées ou des eaux de procédé recyclées (applicable aux configurations # 1,2, 7, et 8).

Conséquemment, bien que certaines estimations et simulations concernant ces trois items se retrouvent dans ce rapport, elles n'y sont présentées qu'à titre indicatif et elles ne seront pas incluses dans les analyses économiques. À ce stade, il est simplement important de noter que les coûts de transport de la biomasse devront être analysés à des fins d'évaluation préliminaire des coûts d'achat des LCH. Quant au stockage de la MLC, une analyse coûts-bénéfices du type de stockage choisi devra être faite par CRB. En effet, sachant que la perte de matière organique due à la décomposition de la MLC par moisissures varie de 2% à 35% [Holmes, 2013; Kosinski, ; Wilcke et al., 1999], il est nécessaire de trouver la méthode d'entreposage optimale.

Dans le cadre de ce projet, les coûts de transport de la MLC ont été estimés et se retrouvent dans la simulation ChemCAD (pour plus de détails, se référer au guide d'utilisation de la simulation section 4.7).

4.3.2. Production et stockage des LCH

Une fois que la MLC est acheminée à l'usine de CRB, leur procédé d'hydrolyse permet de générer les LCH. La simulation et l'analyse du procédé d'hydrolyse de CRB dépassent la portée de ce rapport et ne sont donc pas présentées en détail. Néanmoins, les coûts opérationnels du procédé d'hydrolyse sont fournis dans l'analyse économique. De plus, il est supposé que le seul client pour les LCH de l'usine de CRB sera ETG (du moins, à court et moyen terme). Conséquemment, la production des LCH devrait être bien ajustée à la cédule et la capacité de fermentation d'ETG. Toutes les configurations analysées dans ce rapport requièrent un réservoir tampon des LCH. Les diagrammes d'écoulements présentent l'usine de CRB (*CRB Plant*) alimentant le réservoir tampon des LCH (*RT_LCH*) par le flux *F-8*.

4.3.3. Transport des LCH

Lors du remplissage du fermenteur du procédé LCH, les hydrolysats doivent être transportés du réservoir *RT_LCH* à la pompe du fermenteur *Pump_01*. Dépendamment de la configuration choisie, cela peut se faire par voie de camions-citernes ou par voie de pipeline. Les configurations #1 à #3 reposent sur l'hypothèse que l'usine de CRB est à une distance appréciable d'ETG, ainsi le transport des hydrolysats doit se faire par voie de camions-citernes (Figure 4.6, Figure 4.7 et Figure 4.8). Les configurations #7 à #9 reposent sur l'hypothèse que l'usine de CRB est située sur le même site qu'ETG et que les hydrolysats peuvent être livrés par voie de pipeline entre leur réservoir de rétention et le fermenteur. Le pipeline est représenté par le flux *F-10* dans les Figure 4.9, Figure 4.10 et Figure 4.11.

4.3.4. Mélange des intrants à la propagation

Avant de procéder à la fermentation, il faut réaliser une propagation. Tel que discuté à la section 3.3, la propagation est une étape importante afin d'accroître la quantité de levures et de les préparer à la fermentation. La propagation requiert un mélange de plusieurs intrants :

1. Mout de maïs hydrolysé (flux *F-1*);
2. Levures (flux *F-2*);
3. Urée (flux *F-2*);
4. Nutriments Essentiels aux Levures (YEN; flux *F-2*);
5. Lactrol (un antibactérien; flux *F-2*);
6. Eau (flux *F-43*).

La source de sucres pour la propagation provient du mout de maïs hydrolysé. La quantité de mout de maïs nécessaire à la propagation est envoyée au fermenteur. Le mélange des intrants s'opère dans la cuve de mélange (*Blend Tank*). Ce réservoir est déjà présent dans le procédé MG, ainsi que la boucle de recyclage pour mélange incluant la pompe *Pump_02* et les flux *F-3*, *F-4*, *F-5* et *F-6*. Une fois que toutes les substances sont dissoutes dans un certain volume d'eau, le mélange est envoyé au fermenteur grâce à la *Pump_02* par le flux *F-7*.

4.3.5. Propagation

Une fois que tous les intrants à la propagation sont entrés dans le fermenteur, la propagation commence. Le but de cette opération étant d'accroître la quantité initiale de levures et d'en augmenter la robustesse pour la fermentation subséquente. La propagation s'opère de façon similaire à la fermentation, à la différence qu'il y a une aération du milieu de culture et que le volume est nettement inférieur (10 à 20x moins volumineux que celui de la fermentation). Noter que l'aération durant la propagation est assurée par une soufflante (*Blow_01*) qui distribue le débit d'air requis dans le bulleur à gaz à la base du fermenteur (*Aerator*).

4.3.6. Mélange des intrants à la fermentation

La fermentation requiert un mélange de plusieurs intrants afin d'assurer des performances optimales :

1. Milieu de propagation;
2. LCH (flux *F-10*);
3. Urée (flux *F-2*);

4. YEN (flux $F-2$);
5. Eau (flux $F-43$).

Le milieu de propagation est déjà présent dans le fermenteur et les LCH sont acheminés de leur réservoir tampon RT_LCH jusqu'au fermenteur à un débit déterminé par la méthode de remplissage optimale pour la fermentation. L'urée et les YEN sont préalablement mélangés dans une certaine quantité d'eau dans la cuve de mélange (*Blend Tank*) avant d'être aussi transvidés dans le fermenteur.

4.3.7. Conditionnement des intrants à la fermentation

Le contrôle du pH et de la température des intrants est primordial à de bonnes performances de fermentation. Ainsi, préalablement à leur entrée dans le fermenteur, la température des intrants est soit augmentée ou diminuée à la consigne par l'injecteur de vapeur vive (*Inject_01*) ou l'échangeur de chaleur du fermenteur (*HE_01*), respectivement. Il est supposé qu'un bon contrôle du pH initial des hydrolysats permet d'obtenir le pH optimal pour la fermentation sans autres ajustements subséquents. Néanmoins, la section 10.4.5 rapporte qu'un contrôle du pH durant la fermentation peu amener des bénéfices et il est donc aussi envisageable d'installer un contrôleur de pH en ligne sur les boucles $F-11, 12, 13, 14, 15, 16$. Le présent rapport n'explore pas cette option.

4.3.8. Fermentation

Les intrants à la fermentation sont introduits suivant une séquence prédéterminée et optimisée pour de bonnes performances. La fermentation est considérée comme activée lorsque le chargement des LCH dans le fermenteur débute. À ce moment, l'aération doit être stoppée et les autres paramètres d'opération de la fermentation doivent être changés de leur consigne de propagation à leur consigne de fermentation. Durant la fermentation, la température est maintenue à la consigne par les boucles $F-11, 12, 13, 14, 15, 16$ en utilisant le *HE_01* et la pompe *Pump_01*.

La sortie des gaz doit être changée du flux $F-20$ (utilisé durant la propagation) au flux $F-21$ acheminant ainsi le gaz produit durant la fermentation vers l'unité d'épuration (*Scrubber*) qui retire l'éthanol du gaz en l'emportant dans une phase liquide (ici, de l'eau). Le gaz, principalement composé de CO_2 , est alors acheminé vers l'usine PRAXAIR qui l'achète pour la production de glace sèche. La soufflante *Blow_02* maintient la perte de pression requise à l'évacuation du gaz de la fermentation.

4.3.9. Distillation (purification de l'éthanol)

Suite à la fermentation, une bière est obtenue. L'éthanol contenu dans la bière doit être purifié à un niveau respectant les normes internes et externes à ETG. La pureté de l'éthanol doit être supérieure à 99.5% m/m et la distillation est l'opération de choix pour la séparation de l'éthanol contenue dans une solution aqueuse. Cette technologie a été choisie vu son historique dans l'industrie de la distillerie, sa simplicité et l'expérience d'ETG avec ce procédé. Néanmoins, la purification de l'éthanol par voie membranaire a aussi été retenue vu son potentiel (section 4.8.11). Conséquemment, la distillation permet de concentrer l'éthanol jusqu'à environ 50 à 60 % m/m. La filtration membranaire, moins coûteuse en énergie, compensera jusqu'à la consigne de 99.5 %.

La bière est pompée à la colonne à distiller grâce à la pompe *Pump_01* par le flux $F-17$ à la tête de la colonne. La colonne à distiller, tel qu'envisagé dans ce procédé, ne requiert qu'une perte de pression en

tête de colonne et une injection de vapeur en base de colonne afin de fonctionner. Le vacuum en tête de colonne sera créé par l'unité de filtration membranaire (requérant un vacuum pour son fonctionnement). La vapeur, quant à elle, est envisagée être de la vapeur résiduelle (flux *U-4*; *Vapor Effect*) du présent procédé MG. En effet, cette vapeur en surplus est estimée être suffisante pour nourrir la colonne à distiller selon la spécification du procédé LCH tel que présenté dans ce rapport.

4.3.10. Filtration membranaire (purification de l'éthanol)

La concentration de l'éthanol par voie membranaire est un procédé novateur à l'échelle industrielle dans le domaine des distilleries éthyliques. Cette technologie présente néanmoins des avantages marqués en comparaison à la distillation : moins énergivore, facile d'entretien, modulaire et requérant moins d'espace. La faisabilité et les paramètres d'opération d'une telle unité sont encore inconnus et échappent à la portée de ce rapport. ETG est stratégiquement positionnée avec un fournisseur de cette technologie et les détails ne sont pas disponibles. Ainsi, cette unité de purification sera traitée comme une « boîte noire » dans le présent rapport.

L'éthanol purifié à 50-60% sortant de la tête de colonne à distiller (distillat) est dirigée vers la filtration membranaire par gradient de pression dans le flux *F-37*. La filtration membranaire génère ensuite un produit fini d'éthanol à 99.5% (flux *F-39*) qui est pompé (*Pump_05*) dans son réservoir tampon (*RT_Ethanol*) avant d'être expédié par camions-citernes. Cette unité de purification génère aussi un perméat, une solution aqueuse d'éthanol à environ 4% m/m (flux *F-38*). Le perméat est recyclé dans la colonne à distiller jusqu'à l'obtention du taux de récupération d'éthanol voulu (ex : consigne = 97% de l'éthanol dans la bière doit se retrouver dans le flux *F-39*).

L'effluent du bas de colonne est appelé Stillage (flux *F-25*). Il consiste en tout ce qui composait la bière, moins l'éthanol, et les levures sont considérés complètement mortes. Le Stillage est alors pompé par *Pump_03* vers son réservoir tampon *RT_Still-a*.

4.3.11. Nettoyage en place (CIP)

Suite à la fermentation et à la purification de l'éthanol, les effluents de ces opérations unitaires sont stockés dans leur réservoir tampon respectif. Puisque le procédé LCH proposé est opéré en mode cuvée (batch), il est requis de nettoyer les unités de fermentation, de distillation et de filtration membranaire avant de procéder à la cuvée suivante. Cela est accompli par un procédé de nettoyage en place (CIP; clean in place). Le CIP s'opère en circulant un petit volume d'une solution de 2% m/m NaOH dans les différentes unités durant un court laps de temps. Suite au CIP, il est possible d'amorcer la cuvée subséquente. Les eaux usées de CIP (WCIP; Waste CIP) sont principalement constitués d'eau et de NaCO₃ aqueux, et possèdent encore un léger pouvoir basique.

Il est envisagé que la solution de CIP sera préparée dans la *Blend Tank* puis distribuée soit dans le fermenteur soit dans la colonne à distiller par le biais des pompes *Pump_02* et *Pump_01*. Les WCIP du fermenteur seront dirigées dans la cuve tampon *RT_WCIP* par le biais du flux *F-24* et de la pompe *Pump_03*. Quant à celles de la colonne à distiller, elles passeront par *F-25, 26, 27, 28*.

4.3.12. Stockage des eaux usées

Les eaux usées sont constituées du Stillage, des WCIP et du perméat de la filtration membranaire. Il est proposé de stocker ces eaux usées dans deux réservoirs tampons propres à chacun, puisque le pouvoir basique des WCIP permet de contrôler le pH de l'unité de biométhanisation subséquente (applicable aux configurations # 2, 3, 8 et 9), ou encore, elles procurent une source de solution basique nécessaire au procédé d'hydrolyse de CRB (applicable aux configurations # 1 et 7). Le stockage des eaux usées est nécessaire afin de procurer un tampon entre le temps où elles sont produites et le temps où elles sont utilisées. Les diagrammes d'écoulements schématisent ces deux réservoirs tampons sur le site d'ETG sous le nom de *RT_WCIP-a* et *RT_Still-a* pour les WCIP et le Stillage, respectivement. Les configurations # 1 et 7, pour lesquelles les eaux usées sont directement recyclées à l'usine de CRB, requerront aussi deux unités de rétention au site de CRB : *RT_WCIP-b* et *RT_Still-b*. Alors que les configurations #2 et 8, pour lesquelles les eaux usées sont traitées (devenant alors des « eaux de procédé ») ne requerront qu'un seul réservoir tampon au site de CRB : réservoir tampon d'eau de procédé, *RT-PW*.

4.3.13. Traitement des eaux usées

Le traitement des eaux usées permet d'en réduire la teneur en demande chimique d'oxygène (COD) et d'autres marqueurs de pollution auxquels il faut se conformer afin de pouvoir rejeter ces eaux à l'environnement. Noter que seules les configurations # 1, et 7 ne requièrent aucun traitement des eaux usées, car elles sont directement recyclées dans le procédé de CRB soit par camions-citernes soit par pipeline en utilisant la pompe *Pump_04*.

Les autres configurations requièrent un traitement des eaux usées afin d'en réduire la teneur en COD. Les configurations # 3 et 9 requièrent un traitement des eaux usées complet puisqu'elles seront rejetées à l'environnement. Dans ce cas, il faut se conformer aux exigences gouvernementales. Il est envisagé que la future usine de Biométhanisation Varennes sera dotée de la capacité à accepter ces eaux usées et de les traiter jusqu'au niveau requis par la réglementation gouvernementale. Afin de se conformer aux normes, des unités de traitement supplémentaires à la biométhanisation sont généralement requises. Les configurations # 2 et 8, pour lesquelles les eaux usées traitées (eaux de procédé) sont directement recyclées au site de CRB, ne requièrent pas un traitement aussi complet. En effet, dans ces cas, le rôle principal du traitement des eaux usées est d'éliminer les acides organiques qui pourraient inhiber la fermentation s'ils s'accumulaient dans le procédé dû au cycle constant des eaux usées. À cette fin, la biométhanisation des eaux usées représente une technologie adéquate, sans autre traitement supplémentaire. C'est effectivement ce qui est présentement utilisé dans le procédé MG d'ETG.

Finalement, bien que les eaux usées soient acheminées au traitement ou recyclées en prenant le chemin du flux *F-32*, il existe un recyclage des eaux usées directement dans le procédé MG par le flux *F-33*. Cela est une mesure de sécurité requise en cas de non-possibilité de traitement ou recyclage des eaux usées. En effet, le procédé MG est capable d'absorber la production d'eaux usées du procédé LCH de façon temporaire en les utilisant dans son unité de lavage (Scrubber).

4.4. Tableaux des hypothèses et bases de calculs

4.4.1. Tableau des hypothèses de design et des bases de calculs

Tableau 4.1: Hypothèses de design et bases de calculs, incluant les explications de leur choix

Donnée	Valeur	Unité	Commentaire	Référence
Matière Lignocellulosique				
Hauteur d'un ballot	1.52	m		
Diamètre d'un ballot	1.52	m		[Holmes, 2013; Kosinski, ; Wilcke et al., 1999]
Masse d'un ballot (humide)	544	kg		
Humidité d'un ballot	17.5%	m/m		
Nombre de sites de production de MLC	3	sites		
% de production de MLC et distance par rapport à l'usine de CRB	#1-33%- 25km; 2- 33%-40km; 3-33%-60km			Hypothèse
Composition				
<i>Sucres fermentables (Glucose + Xylose)</i>	60.7%	m/m		
<i>Ratio de Glucose</i>	66.1%	m/m	Masse Glucose / Masse totale de sucres	[F. M. Girio et al., 2010; Balat, 2011; J. Lee, 1997]
<i>Ratio de Xylose</i>	33.9%	m/m	Masse Xylose / Masse totale de sucres	
Production des LCH (usine de CRB)				
Rendement du procédé d'hydrolyse	90%	m/m	Quantité de sucres récupérés / totale théorique des sucres disponibles	[Berberi, 2013]
Cadence de production des LCH	1.325	m ³ /h	Sachant qu'un cycle de cuvée est d'une durée de 151h et que la consigne d'alimentation du fermenteur est de 200m ³ /cuvée. Il est supposé qu'afin de diminuer la taille de leurs équipements, CRB diminuera sa production au minimum.	Hypothèse

Nombre de site de production de LCH (usine CRB)	1	site	
% de production de LCH et distance par rapport à l'usine d'ETG Varennes	#1-100%-50km		Applicable seulement pour configurations S&H.

Composition des LCH

Eau	81.570%	m/m	
Glucose	11.682%	m/m	Basé sur une concentration de sucres totaux de 200 g/L et le ratio glucose/xylose présent dans la MLC
Xylose	6.004%	m/m	
Acide acétique	0.531%	m/m	Basé sur un maximum de 2.5g/L [Berberi, 2013]
5-HMF	0.088%	m/m	Basé sur un maximum de 0.5g/L
Furfural	0.018%	m/m	Basé sur un maximum de 0.1g/L
Acide formique	0.018%	m/m	Basé sur un maximum de 0.1g/L
Acide lévulinique	0.088%	m/m	Basé sur un maximum de 0.5g/L

Propagation

Durée	10	h	
Ratio fermentation/propagation	15	vol. ferm. / vol. prop.	
Température	33	C	
Pression	1.08	bar	En tête de fermenteur. [Corcos, 2013]
Aération	1	vvm	
Cinétiques métaboliques	voir section 4.4.2		
Enthalpie de réaction (formation d'éthanol)	765	BTU/kg _{éthanol}	Enthalpie de réaction pour la formation d'éthanol par voie fermentaire. Les enthalpies des autres réactions métaboliques sont négligées. [Boulet, 2013]

Composition du mout de maïs

<i>Eau</i>	0.68	kg/kg		
<i>Glucose</i>	0.26	kg/kg		
<i>Solides en suspension (USS)</i>	0.02	kg/kg	Définition de USS, voir Lexique	[Boulet, 2013]
<i>Solides dissous (UDS)</i>	0.04	kg/kg	Définition de UDS, voir Lexique	

Composition optimale du milieu de propagation

<i>Mout de maïs</i>	ND		Selon consigne Ratio fermentation/propagation	[Boulet, 2013]
<i>Levures</i>	ND		Selon consigne pour la fermentation.	
<i>Urée</i>	0.001	kg/kg		
<i>YEN</i>	0.00005	kg/kg		[D'Aoust, 2013]
<i>Lactrol</i>	ND		Selon consigne fermentation.	[Boulet, 2013]

Fermentation

Volume total du fermenteur	250	m ³		
Temps de fermentation	80	h		
Température	33	C		
Pression	1.08	bar	En tête de fermenteur.	[Corcos, 2013]
Cinétiques de fermentation	voir section 4.4.3			
Enthalpie de réaction (formation d'éthanol)	765	BTU/kg _{éthanol}	Enthalpie de réaction pour la formation d'éthanol par voie fermentaire. Les enthalpies des autres réactions métaboliques sont négligées.	[Ingledeew et al., 2009]

Composition optimale du milieu de fermentation

<i>LCH</i>	200	m ³ /cuvée	Base de calcul principale.	
<i>Levures</i>	0.5	x10 ⁸ cells/ml	ou 0.0011 kg/kg	[Corcos, 2013]
<i>Urée</i>	0.005	kg/kg		[Boulet, 2013]
<i>YEN</i>	0.00005	kg/kg		[D'Aoust, 2013]

Lactrol 0.0000176 kg/kg [Boulet, 2013]

Purification de l'éthanol

Durée de l'étape de purification	48	h	
Teneur en éthanol à la sortie de la distillation	50-60%	m/m	
Température et pression du Vapor Effect	85.5 / 0.574	C / bar	
Teneur en éthanol à la sortie de la filtration membranaire	≥99.5%	m/m	Hypothèses
Teneur en éthanol du perméat sortant de la filtration membranaire	4.0%	m/m	

Séquence du procédé cuvée

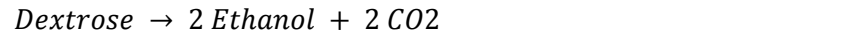
Durée d'opération annuelle	350	j	Hypothèses
Durée d'un cycle cuvée complet	151	h	
Nombre de cuvées	55	cuvées	

Analyse économique

Taux d'imposition marginale	29%			[Boulet, 2013]
Durée de vie du projet	20	ans	En plus de cela, un temps de 1 an est alloué à la construction de l'usine et 1 an est alloué au démantèlement.	
Coût de démantèlement	0	\$	Il est estimé que le coût de démantèlement sera égal au coût de revente des équipements et autres revenus liés à la disposition des équipements.	Hypothèse
Amortissement	30%		30% du FCI peut être amorti annuellement, à des fins fiscales. En plus, la règle de la demi-année s'applique pour la première année.	[Chan et al., 2009]

4.4.2. Cinétiques de propagation

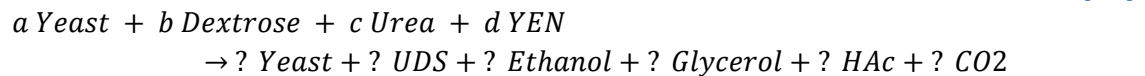
La simulation de l'étape de propagation du procédé LCH est cruciale afin de pouvoir obtenir une analyse économique représentative. À cette fin, une approximation réaliste des flux et des rendements métaboliques est nécessaire. Durant la propagation, chez les levures de l'espèce de LOGM1, il existe plusieurs réactions métaboliques, dont les principales sont les suivantes (base molaire) :



En plus de ces trois réactions principales de la glycolyse, en phase de croissance, les levures génèrent aussi de la biomasse selon l'équation suivante :



Où *UDS* sont des métabolites secondaires solubles et de nature inconnue. La réaction globale obtenue :



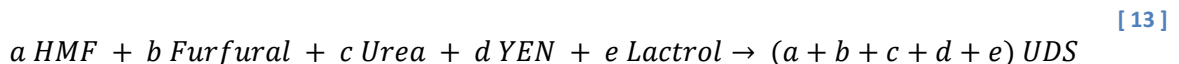
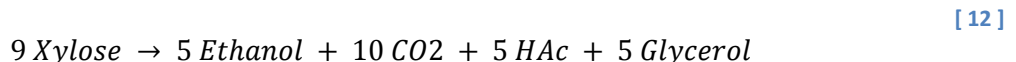
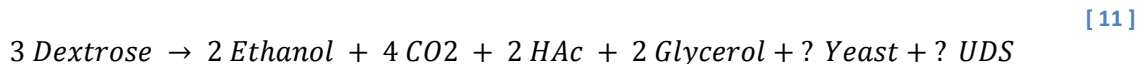
À partir de données expérimentales présentées à la section 3.4, les données des cinétiques de propagation utilisées dans la simulation du procédé LCH utilisées dans ce rapport sont présentées au Tableau 4.2.

Tableau 4.2: Détermination des cinétiques métaboliques de propagation.

Hypothèses supplémentaires	Il est supposé que, sur une base massique, la balance du glucose ayant été consommée et ne se retrouvant pas sous forme d'éthanol, d'HAc, de glycérol, de CO ₂ ou de levure, se retrouve sous forme de UDS.
	Il est supposé que toute l'urée et tous les YEN sont convertis en UDS à un ratio massique de 1:1.
Taux de croissance de LOGM1 durant la propagation	Grâce au taux de croissance, la concentration finale de LOGM1 dans le milieu de propagation peut être calculée. Le taux de croissance est déterminé suivant le Tableau 3.15.
Limites du modèle	Concentration cellulaire initiale comprise entre 0.2 et 5.8 x10 ⁸ cells/ml.
	Temps de propagation entre 0 et 10 h.
Équation métabolique applicable (coefficients base massique)	$1 \text{ Dextrose} + a \text{ Urea} + b \text{ YEN} + c \text{ Yeast} \\ \rightarrow 0.389 \text{ Ethanol} + 0.385 \text{ CO}_2 \\ + 0.019 \text{ HAc} + 0.060 \text{ Glycerol} \\ + d \text{ Yeast} + e \text{ UDS}$ <p>Où:</p> <ul style="list-style-type: none"> • a, b et c = consignes optimales • d est calculé grâce au taux de croissance • e = 1+a+b+c-0.389-0.385-0.019-0.060-d • coefficients tirés du Tableau 3.16 • Chaleur de réaction = 765 BTU/kg_{Éthanol produit}

4.4.3. Cinétiques de fermentation

Dans la même optique que pour la propagation, il est crucial de pouvoir simuler de façon représentative l'étape de fermentation du procédé LCH. À cette fin, les principales réactions métaboliques ont été identifiées (base molaire) :



Ces 3 équations représentent les principales réactions ayant été relevées durant les multiples tests à l'échelle laboratoire (Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20). Les coefficients pour chacune des substances peut être aisément calculés sur une base massique grâce aux données expérimentales typiques, tel que présenté à l'Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20. Ces coefficients doivent être ajustés dépendamment de la composition du milieu de fermentation. En effet, la présence de substances inhibitrices et la concentration des sucres affectent les rendements et la productivité de la fermentation. Suivant la composition des LCH proposés dans ce rapport (Tableau 4.1), les cinétiques de fermentations utilisées dans la simulation du procédé LCH sont fournies au Tableau 4.3. Noter que la productivité de la fermentation est ajustée par rapport au temps alloué à l'étape de fermentation. Cette étude estime un

temps de fermentation de 80 h, alors, il est supposé que tous les substrats sont consommés en 80 h. Noter que pour les deux réactions de production d'éthanol, la chaleur de réaction est de 765 BTU/kg_{éthanol produit} [Ingledeew et al., 2009].

Tableau 4.3: Détermination des cinétiques de fermentation.

Équation	Coefficient	Valeur	Équation
éq.1	a	1	$a \text{ Dextrose} \rightarrow b \text{ Ethanol} + c \text{ CO}_2 + d \text{ HAc} + e \text{ Glycerol} + f \text{ Yeast} + g \text{ UDS}$
	b	0.43	
	c	0.44	
	d	0.04	
	e	0.08	
	f	0.0002	
	g	=a-b-c-d-e-f	
éq.2	h	1	$h \text{ Xylose} \rightarrow i \text{ Ethanol} + j \text{ CO}_2 + k \text{ HAc} + l \text{ Glycerol}$
	i	0.43	
	j	0.462	
	k	0.07	
	l	0.015	
éq.3	m	=concentration présente dans le milieu de fermentation initial, selon ce qui est prévu par la simulation du procédé LCH présentée dans ce rapport.	$m \text{ HMF} + n \text{ Furfural} + o \text{ Urea} + p \text{ YEN} + q \text{ Lactrol} \rightarrow r \text{ UDS}$
	n		
	o		
	p		
	q		
	r		

4.4.4. Tableau des écoulements

Le Tableau des écoulements détaille la composition et les propriétés thermodynamiques de chacun des flux d'un diagramme d'écoulement. Aux fins de ce rapport, le tableau des écoulements pour chacun des flux de la simulation ChemCAD présenté à la section 4.7 est fourni à l'Annexe D : Tableau des écoulements. Les numéros d'identification des différents flux massiques appartenant à la simulation ChemCAD (Annexe D : Tableau des écoulements) ne correspondent pas aux numéros d'identification des flux massiques appartenant aux diagrammes d'écoulements des 6 configurations étudiées présentés à la section 4.6.2 (flux commençant par *F-* ou *U-*). Afin de pouvoir faire la transition entre les 2 plans, le Tableau 4.4 répertorie la correspondance entre les flux de la simulation ChemCAD et ceux des diagrammes d'écoulement. En utilisant les valeurs des flux de la simulation ChemCAD et la cédule cuvée, il est possible de calculer n'importe quel flux massique durant n'importe quelle étape de la cédule cuvée, et ce, pour tous les flux de tous les diagrammes d'écoulements (voir équation [14]).

Quant aux flux électriques des 6 diagrammes d'écoulement (flux commençant par *E-*), leur puissance correspond simplement à celle retrouvée dans le Tableau 4.6, tableau du dimensionnement des équipements. L'énergie consommée par chacun des flux électriques doit tenir compte de la durée

d'utilisation de l'équipement durant une batch et du % de la puissance totale réellement utilisée par l'équipement, car la puissance affichée dans le Tableau 4.6 est la puissance maximale et non la puissance d'utilisation moyenne (voir Annexe F : Consommation électrique du procédé LCH).

4.4.5. Tableau de correspondance des flux (entre les D-E et la simulation ChemCAD)

Tableau 4.4: Correspondance entre les #ID des flux des diagrammes d'écoulement et des flux de la simulation ChemCAD du procédé LCH.

Propagation		
Étapes concernées (suivant section 4.5)	2 - Transfert du mout 3 - Mélange des intrants 4 - Transfert des intrants 5 - Phase de propagation	
#ID flux D-E	#ID flux ChemCAD	Commentaire
F-1	8	Mout de maïs
F-2	20+26+33+31	Levures; Urée; YEN; Lactrol
F-43	125	Eau
F-7	27	P-Worth
F-46	63	Air
F-20	36	Vent: au T.O.
U-1	113	Eau reff. nouv.
U-2	114	Eau reff. usée.
Fermentation		
Étapes concernées (suivant section 4.5)	7 - Mélange des intrants 8 - Transfert des intrants 9 - Transfert des LCH (vidange de RT_LCH) 10 - Phase de fermentation 11 - Vidange de la bière	
#ID flux D-E	#ID flux CAD	Commentaire
F-10	51	LCH
F-2	3+30	Urée; YEN
F-43	4	Eau
F-7	5	Total des intrants
F-12	61	F-Worth
F-15	12	F-Broth
F-21	37	Vent: au Scrubber
F-17	68	Vidange bière

U-1	111	Eau reff. nouv.
U-2	112	Eau reff. usée.
U-3	102	Vapeur vive

Purification de l'éthanol

Étapes concernées 13 - Distillation
(suivant section 4.5) 14 - Filtration membranaire

#ID flux D-E	#ID flux CAD	Commentaire
F-17	68	Bière
F37	42	Distillat
F25	39	Stillage
U4	109	Vapor Effect
F-44	44	Perméat (total)
F-38	121	Perméat (recyclé)
F-35	68	Perméat (résiduel)
F-39	41	Éthanol 99.5%

Remplissage des cuves de rétentions et recyclage des eaux usées

Étapes concernées 16 - Remplissage de RT_Still-a
(suivant section 4.5) 17 - Remplissage de RT_WCIP-a
18 - Vidange de RT_Still-a
19 - Vidange de RT_WCIP-a

#ID flux D-E	#ID flux CAD	Commentaire
F-29	73	Intrants RT_Still-a
F-30	52	Extrant RT_Still-a
F24	NA	WCIP pour Fermenteur
F-47	NA	WCIP pour Distillation
F-28	78	Intrants RT_WCIP-a
F-31	53	Extrant RT-WCIP-a
F-34	55	Eaux Usées (tot)

Traitement des eaux usées

Étapes concernées
(suivant section 4.5) 20 – Biométhanisation

#ID flux D-E	#ID flux CAD	Commentaire
F-34	44	Intrants à la biométhanisation (calque du Flux CAD 55)
F-35	48	Eaux de procédé

4.5.Séquence complète d'un cycle de fermentation (cédule cuvée)

Cette section détaille étape par étape le déroulement d'un cycle complet pour 1 cuvée de fermentation du procédé LCH (autrement nommé « cédule cuvée »). La Figure 4.4 schématise les étapes et leurs durées pour la configuration #1, les figures équivalentes pour toutes les configurations sont présentées à l'Annexe E : Schéma des cédules Cuvée pour les 6 configurations à l'étude. Pour chacune des étapes concernées, les configurations auxquelles elles s'appliquent sont mentionnées.

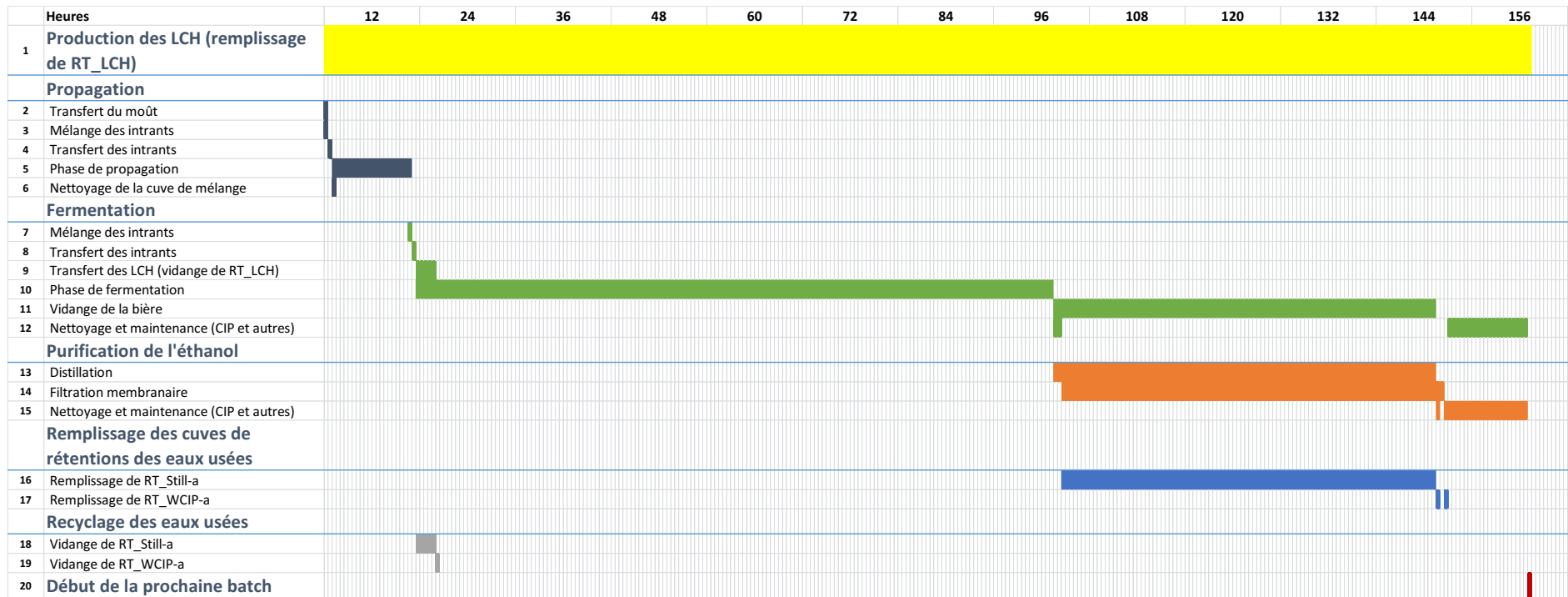


Figure 4.4: Exemple de cédule cuvée. Ici, la cédule d'un cycle cuvée complet pour la configuration #1 est présentée.

Les quantités données ici sont tirées de la simulation ChemCAD, pour plus de détails, voir le Tableau des écoulements (Tableau 11.1) et le Tableau 4.4 (correspondance entre flux). Une cuvée type de fermentation de LCH se passe comme suit :

1. Les hydrolysats sont produits en continu à l'usine de CRB (*CRB Plant*) durant les 151 h, un cycle cuvée complet. Suivant la consigne de 200 m³ de LCH par cuvée de fermentation, le remplissage de la cuve tampon *RT_LCH* s'effectue à 1.325 m³/h;
2. Le transfert du mout se fait en soutirant du mout de maïs du procédé MG (flux *F-1*). Une quantité de 11.79 m³ est transférée dans le fermenteur en 0.5 h grâce aux pompes *Pump_02* et *Pump_01*;
3. Le mélange des autres intrants à la propagation s'opère dans la cuve de mélange *Blend Tank* (flux *F-2* et *F-43*) simultanément au transfert du mout (période allouée de 0.5 h) :
 - a. Levures (112.3 kg/ propagation);
 - b. Urée (1.1 kg/propagation);
 - c. YEN (0.85 kg/propagation);
 - d. Lactrol (0.11 kg/propagation);
 - e. Eau (1 m³/propagation);
4. Les intrants sont transférés dans le fermenteur pas le biais des pompes *Pump_02* et *Pump_01* (période allouée de 0.5 h);
5. La phase de propagation débute, durée totale de 10 h;
6. Suite au transfert des intrants à la propagation, le cycle de CIP de la *Blend Tank* s'effectue (période allouée de 0.5 h);
7. En préparation à la fermentation, les intrants de la fermentation sont mélangés dans la *Blend Tank* (flux *F-2* et *F-43*; période allouée de 0.5 h) :
 - a. Urée (113.9 kg/fermentation);
 - b. YEN (11.4 kg/fermentation);
 - c. Eau (1 m³/fermentation);
8. Les intrants sont transférés dans le fermenteur pas le biais des pompes *Pump_02* et *Pump_01* (période allouée de 0.5 h);
9. Une fois le transfert effectué, le transfert des hydrolysats débute. Deux scénarios sont possibles :
 - a. Les configurations # 1, 2 et 3 comprennent le scénario S&H où les LCH sont livrés par camions-citernes. Afin de minimiser les coûts de transport, le temps de vidange des camions-citernes est gardé au minimum, soit 0.5 h. 5 camions-citernes de 40 m³ par chargement sont requis afin de remplir le fermenteur de 200 m³ de LCH. Ainsi, le temps alloué au transfert des LCH est de 2.5 h;
 - b. Les configurations # 1, 2 et 3 comprennent le scénario Centralized où les LCH sont livrés par pipeline grâce à la *Pump_06*. Sachant que le dimensionnement de la *Pump_01* est effectué afin de permettre le remplissage du fermenteur en 2.5 h, indépendamment de la configuration choisit (voir section 4.8.8 dimensionnement *Pump_01*); le temps alloué au transfert des LCH est aussi de 2.5 h;
10. La fermentation est d'une durée de 80 h;

11. Une fois la fermentation terminée, la vidange de la bière, simultanément à la purification de l'éthanol, débute. Une période de 48 h est allouée à l'étape de distillation, donc la vidange de la bière s'opère aussi en 48 h;
12. Le nettoyage du fermenteur (CIP) peut se faire une fois la vidange terminée. Il est supposé que le transfert du liquide CIP, le CIP lui-même et la vidange des WCIP dans la cuve tampon *RT_WCIP* requièrent une période d'environ 1.5 h. De plus, une période tampon de 10 h est allouée pour les imprévus, la préparation de la prochaine cuvée et la maintenance;
13. La purification de l'éthanol commence avec la distillation afin d'amener une bière contenant entre 5% et 13% m/m d'éthanol à une teneur de 50% à 60%. Une période de 48 h est allouée afin de procéder à la distillation de toute la bière du fermenteur;
14. La 2^e étape de purification est la filtration membranaire permettant au distillat de 50-60% m/m d'éthanol d'atteindre plus de 99.5%. Cette étape débute suite à la stabilisation de la colonne à distiller, puis se poursuit simultanément à la fermentation jusqu'à ce que la totalité du distillat ait été concentré;
15. Suite à la purification, le nettoyage (CIP) des équipements de purification est effectué, une période de 1.5 h est allouée pour chacune des 2 unités. De plus, la période tampon de 10 h débute suite au CIP de 0.5 h de l'unité de filtration membranaire. Cette période de 10 h simultanée à la période de 10 h de l'étape de nettoyage du fermenteur (#12) permet une flexibilité dans la coordination de ces deux étapes;
16. Durant la distillation, le Stillage (effluent du bas de colonne) est entreposé dans la cuve tampon *RT_Still-a* :
 - a. Dans la configuration # 1, cette cuve doit entreposer le Stillage jusqu'au remplissage du fermenteur durant la cuvée suivante, moment auquel les camions-citernes viendront la décharger;
 - b. Dans les configurations # 2, 3, 8 et 9, où il y a un traitement des eaux usées par biométhanisation, la cuve *RT_Still-a* ne sert que de tampon à très court terme (moins de 10 h), car le procédé de biométhanisation est censé pouvoir accepter cette charge d'eaux usées directement;
 - c. Dans la configuration # 7, où les eaux usées sont directement recyclées à l'usine de CRB par voie de pipeline, la cuve tampon est nécessaire puisque CRB utilise les eaux usées à un débit plus faible que le débit de remplissage de la cuve ($F-35 = 1.76 \text{ m}^3/\text{h}$ vs $F-29 = 5.23 \text{ m}^3/\text{h}$, respectivement);
17. Les étapes de nettoyages (CIP) sont assez rapides (période allouée de 1.5 h). Ainsi, les eaux usées provenant du CIP (WCIP) sont stockées dans la cuve tampon *RT_WCIP-a* de façon similaire au Stillage (étape #16). Le CIP se fait en utilisant une solution de NaOH 2 %m/m prélevée directement du procédé MG;
18. La vidange de *RT_Sill-a* s'effectue différemment selon la configuration étudiée tel que mentionné à l'étape #16;
19. La vidange de *RT_WCIP-a* s'effectue de façon similaire à *RT_Still-a* tel que décrit à l'étape #16;
20. L'étape #20 diffère dépendamment de la configuration étudiée :
 - a. Configurations # 1 et 7 n'ayant pas de traitement des eaux usées : une nouvelle cuvée débute;

- b. Configurations # 3 et 9 n'ayant pas de recyclage des eaux de procédé : l'étape #20 est la biométhanisation des eaux usées dont la cadence est assez flexible puisque la seule restriction est de traiter les eaux usées avant la que la distillation de la prochaine cuvée ne débute. Ici, il est suggéré que l'usine de biométhanisation soit capable de traiter les eaux usées à mesure qu'elles sont produites. Cela permet de minimiser le volume tampon nécessaire;
 - c. Dans la configuration # 2 il est nécessaire d'attendre le remplissage du fermenteur de la cuvée suivante avant de pouvoir recycler les eaux de procédé;
 - d. Dans la configuration # 8, les eaux de procédé sont recyclées à l'usine de CRB par voie de pipeline de façon continue;
21. Suivant les options détaillées à l'étape #20, il s'agit soit du début d'une nouvelle cuvée (configurations # 3 et 9), soit le recyclage des eaux de procédé (configurations # 2 et 8).

4.6. Diagrammes

4.6.1. Diagramme entrée-sortie

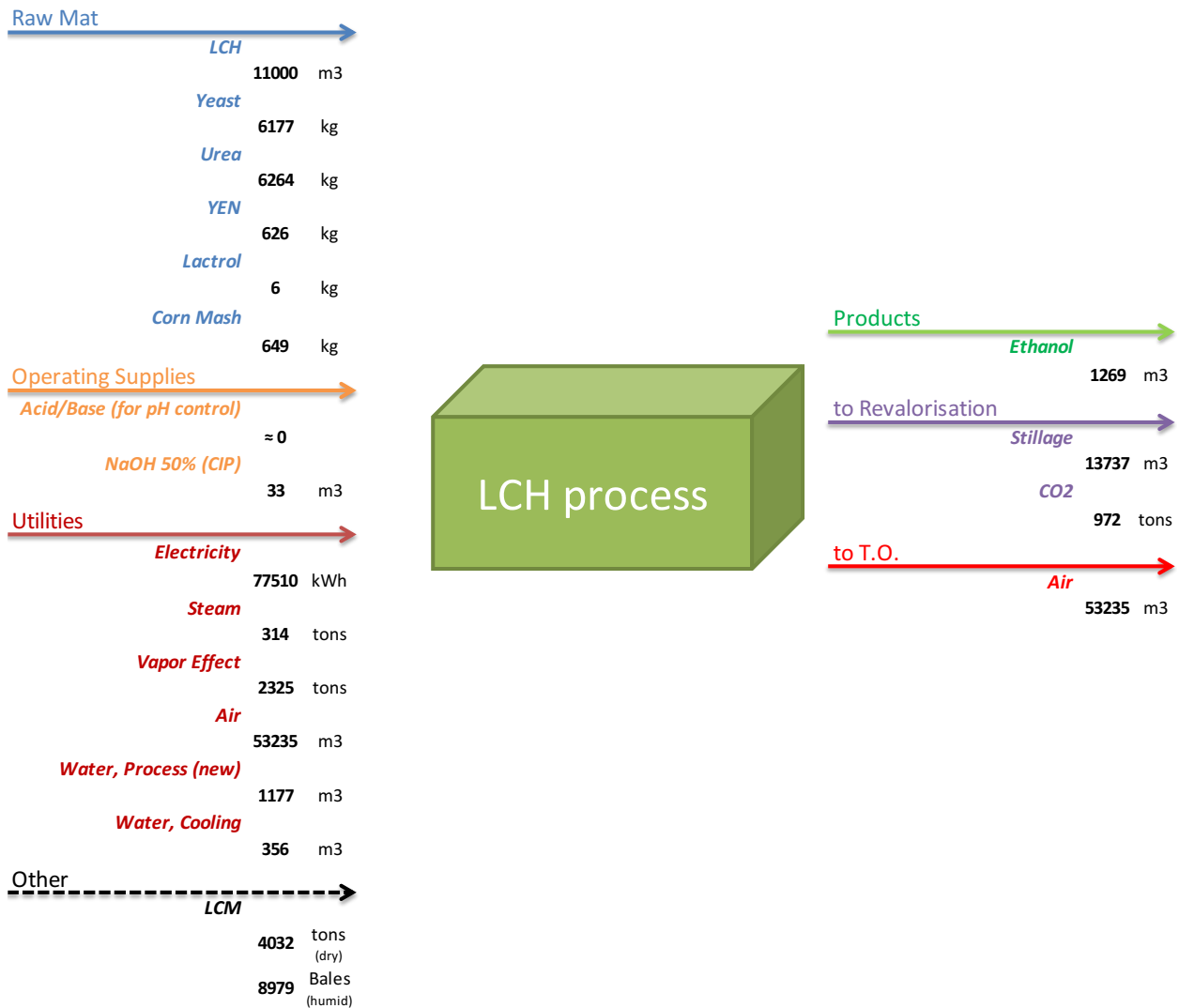


Figure 4.5: Diagramme entrée-sortie du procédé LCH.

4.6.2. Diagramme des écoulements

Cette section présente les diagrammes d'écoulements des 6 configurations étudiées dans ce rapport. Ces schématisations offrent une vue détaillée du procédé LCH, sans toutefois fournir les valeurs des flux massiques et énergétiques de tous les flux présentés. Ces données sont fournies par la simulation ChemCAD et détaillées à l'Annexe D : Tableau des écoulements.

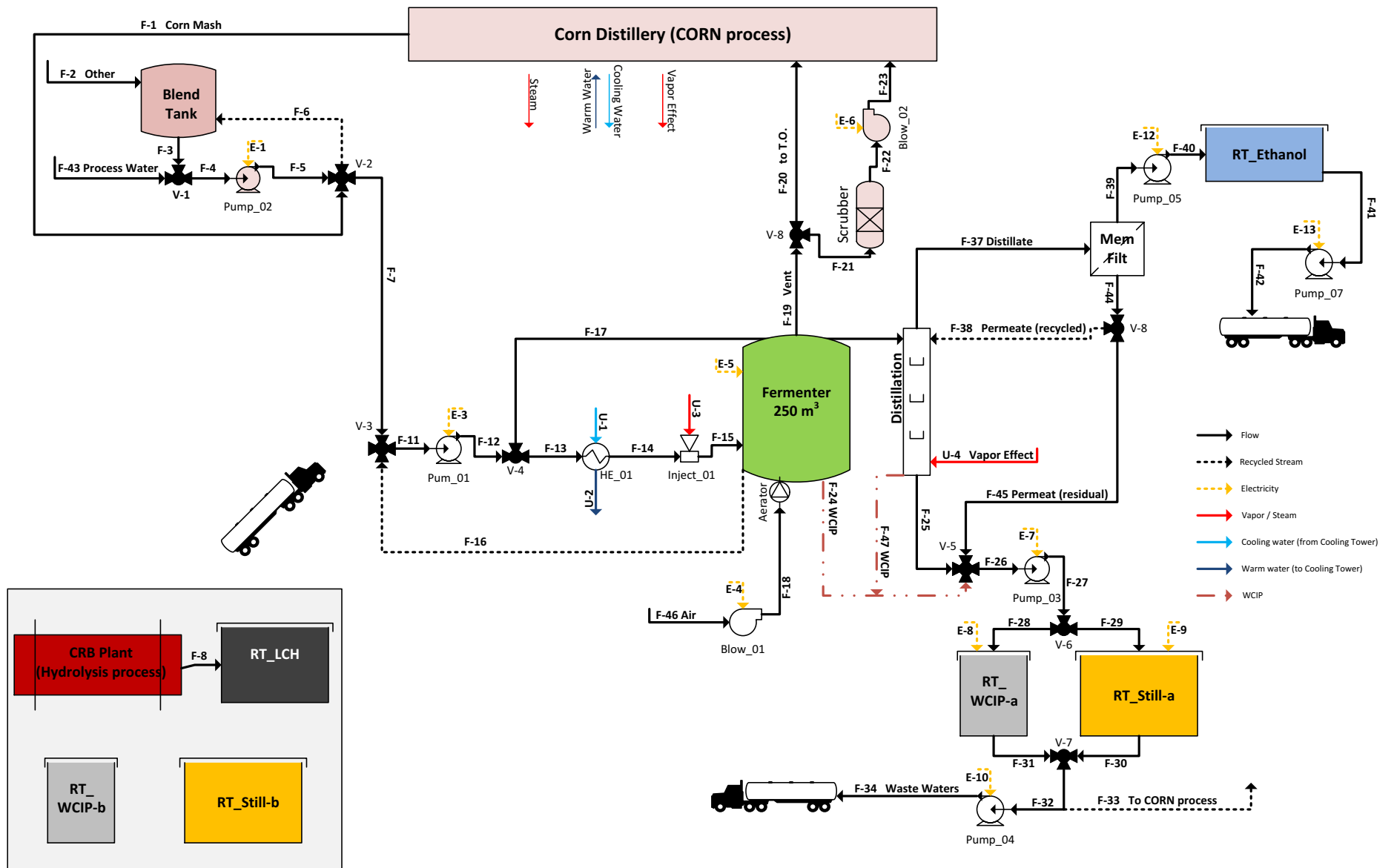


Figure 4.6 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #1 (S&H / Recyclage des eaux / Sans traitement)

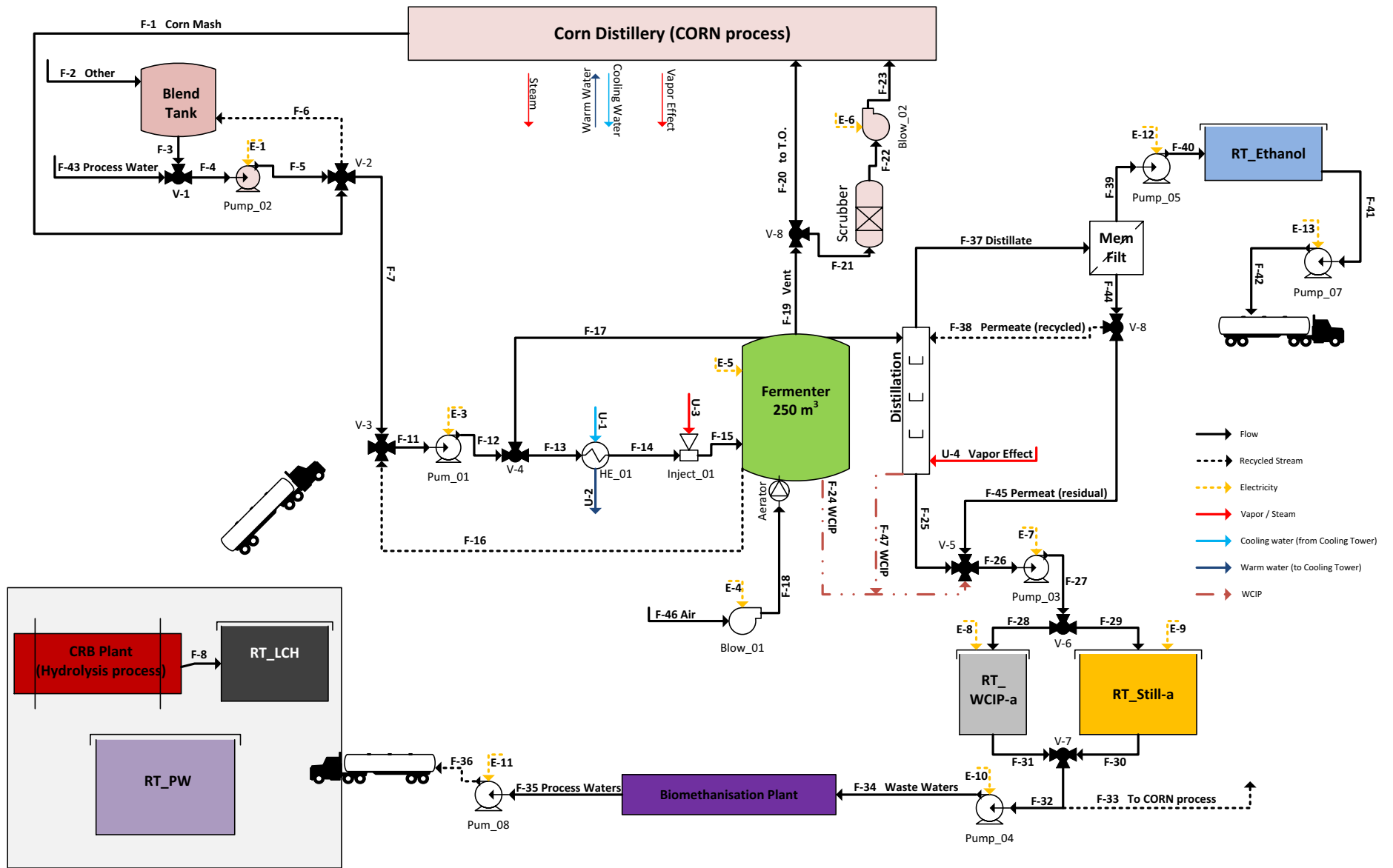


Figure 4.7 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #2 (S&H / Recyclage des eaux / Avec traitement).

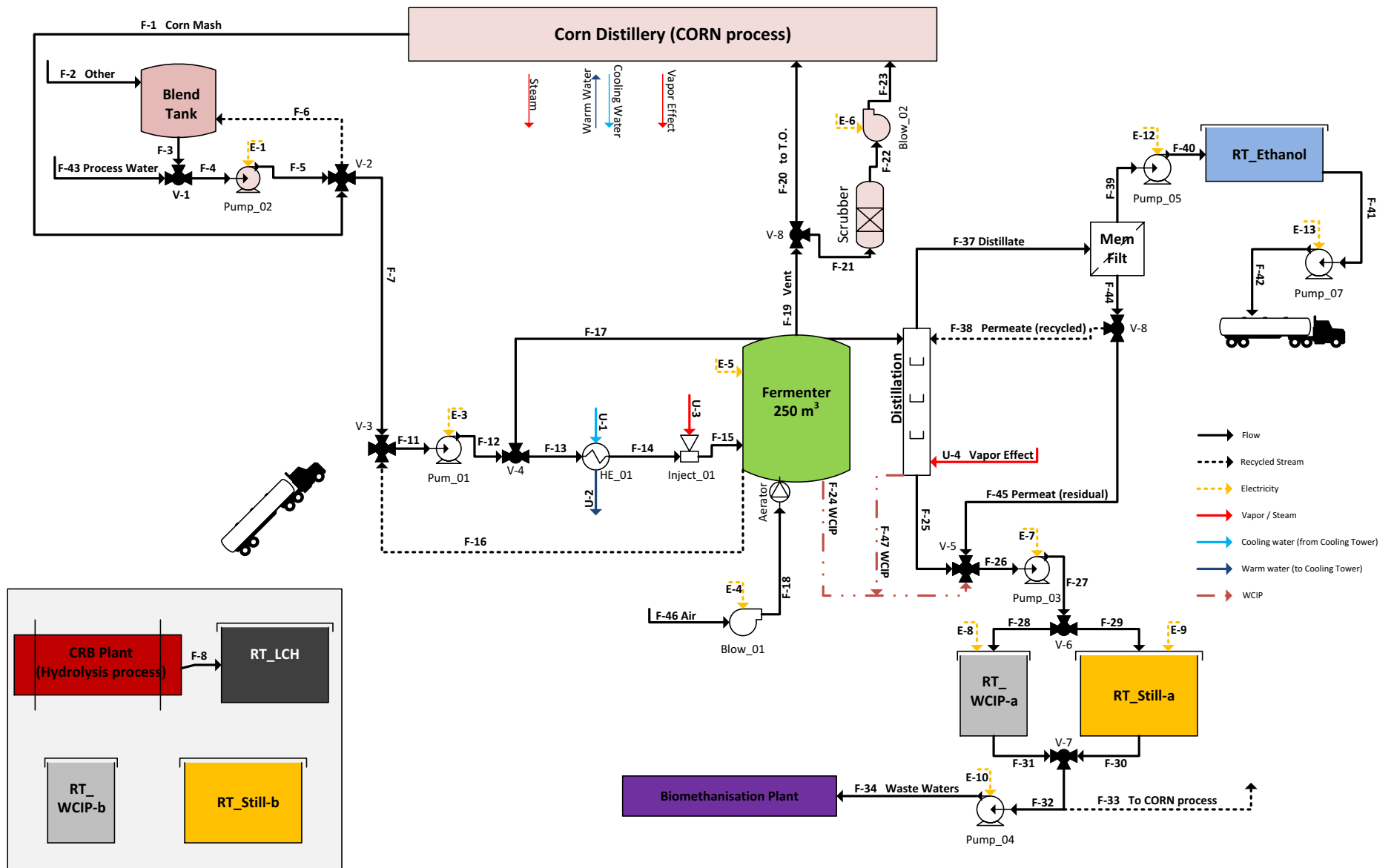


Figure 4.8 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #3 (S&H / Sans recyclage / Avec traitement).

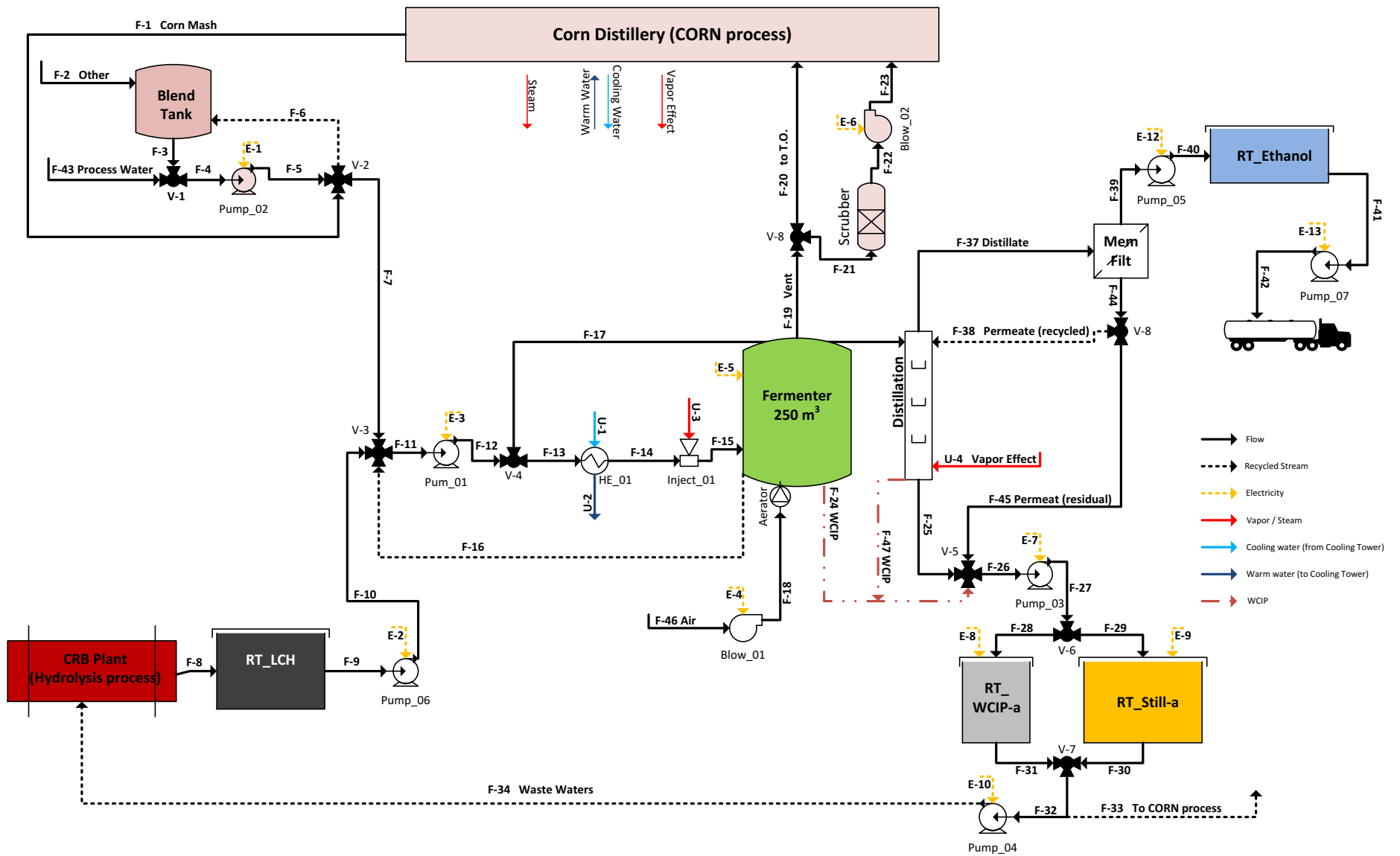


Figure 4.9 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #7 (Centralisé / Recyclage des eaux / Sans traitement).

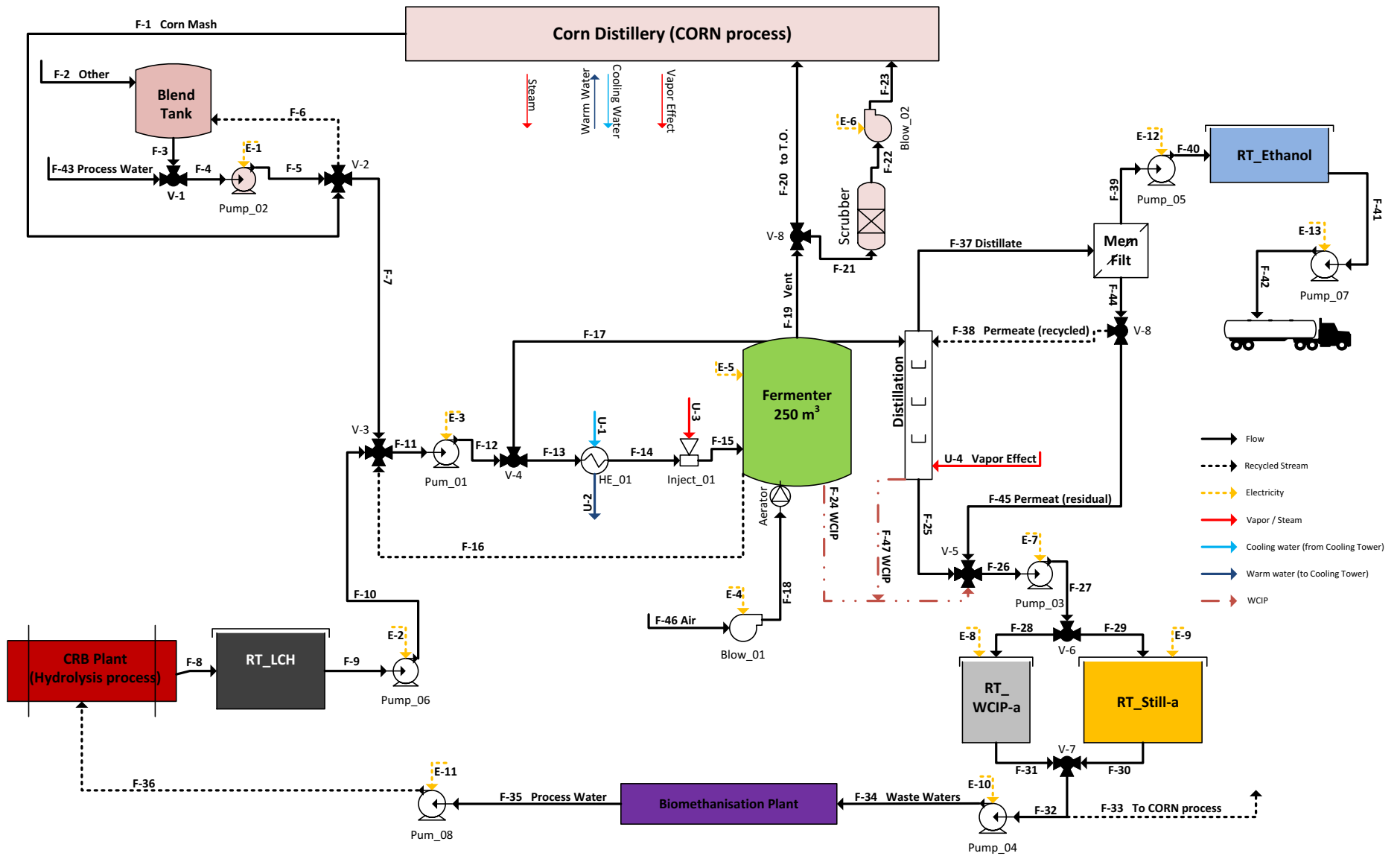


Figure 4.10 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #8 (Centralisé / Recyclage des eaux / Avec traitement).

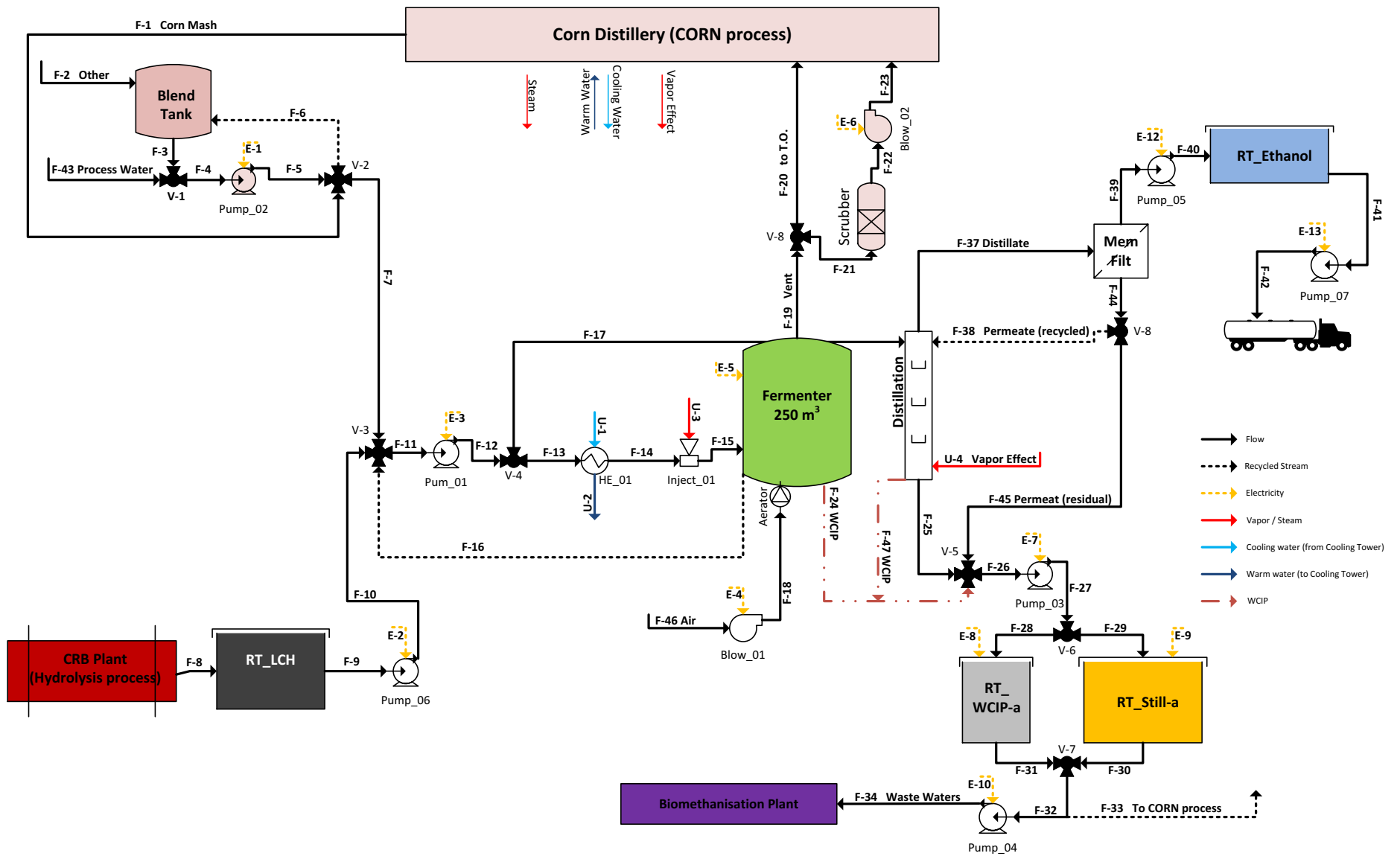


Figure 4.11 : Diagramme des écoulements du procédé LCH pour la configuration #9 (Centralisé / San recyclage / Avec traitement).

4.7.Simulation ChemCAD

Afin de calculer les différents flux massiques et énergétiques, le logiciel de simulation de procédé chimique ChemCAD a été utilisé. Deux fichiers permettent la simulation complète du procédé LCH : un fichier de simulation ChemCAD (voir Annexe I : Dossiers de simulation du procédé LCH) et un fichier Microsoft Excel (MSE). Noter que ces deux fichiers sont interdépendants, les deux sont nécessaires au bon fonctionnement de la simulation. La simulation du procédé LCH est bâtie de telle sorte qu'elle permet de simuler le procédé en mode continu et non en mode cuvée, tel qu'il sera opéré en réalité. Conséquemment, tous les flux rapportés par la simulation sont moyennés sur la totalité de la durée d'une cédule cuvée; soit 151 h. Par exemple, sachant que 200 m³ de LCH sont requis par cuvée, le débit d'entrée des LCH dans la simulation est de 200/151= 1.325 m³/h. Pour connaître le débit réel des LCH dans le fermenteur lors du procédé en mode cuvée, il suffit de se référer à la cédule cuvée de la section 4.5 et de multiplier le flux calculé par la simulation ChemCAD en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Flux réel en mode cuvée} = \text{flux dans la simulation} * \frac{\text{temps d'une cuvée}}{\text{temps d'opération de l'étape concernée}} \quad [14]$$

Par exemple, toujours en utilisant le transfert des 200 m³ de LCH dans le fermenteur, la cédule cuvée donne un temps d'opération de 2.5 h et l'équation 15 montre que le débit obtenu est bel et bien 80 m³/h.

$$\text{Flux réel en mode cuvée} = 1.325 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} * \frac{151 \text{ h}}{2.5 \text{ h}} = 80 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} \quad [15]$$

Noter que ceci n'est valide que pour les flux massiques et énergétiques. Les propriétés thermodynamiques (température, pression et densité) des flux sont identiques, peu importe le mode d'opération (continu ou cuvée).

Les diagrammes d'écoulement des 6 configurations du procédé LCH étudiées sont présentés à la section 4.6.2. Ces diagrammes représentent une vue fidèle du procédé (mode cuvée), tandis que la simulation ChemCAD n'est qu'un outil de calcul des bilans massiques et énergétiques. Conséquemment, les numéros d'identification des flux massiques et énergétiques entre les diagrammes et la simulation ne correspondent pas entre eux. Un tableau détaillant quels flux de la simulation correspondent à quels flux sur les diagrammes d'écoulement est fournis à la section 4.4.5 (Tableau 4.4).La présente section offre une explication sommaire des fichiers de simulation (ChemCAD et MSE).

4.7.1. Vue d'ensemble

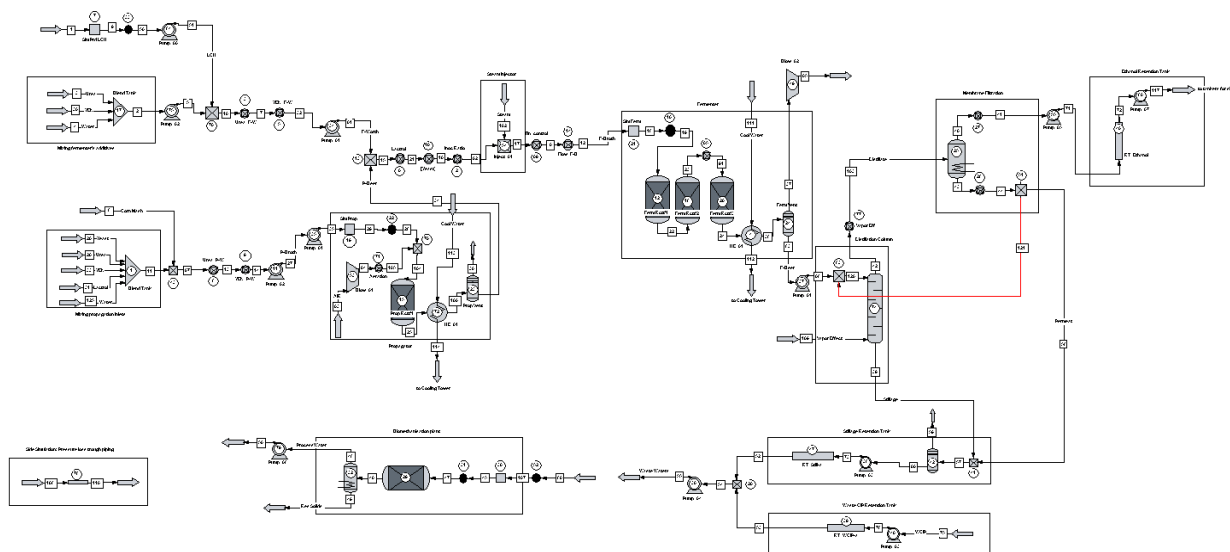


Figure 4.12: Vue d'ensemble du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.

La Figure 4.12 présente la simulation ChemCAD dans son ensemble. Les étapes de mélange des intrants, de propagation, de fermentation, de distillation, de filtration membranaire et de traitement des eaux usées y sont représentées. Chacun des équipements du procédé LCH est simulé par une ou plusieurs opérations unitaires dans ChemCAD, appelées « UnitOP ».

4.7.2. Production et transport des LCH

La simulation de la production des LCH est prise en charge par le fichier MSE sous l'onglet « Simul Prd LCH ». La composition des LCH y est déterminée suivant les hypothèses de design. Ensuite la composition est transmise au fichier ChemCAD. Noter que le fichier MSE offre aussi une simulation des coûts de transport de la MLC et des LCH sous l'onglet « Simul Transport ».

4.7.3. Propagation

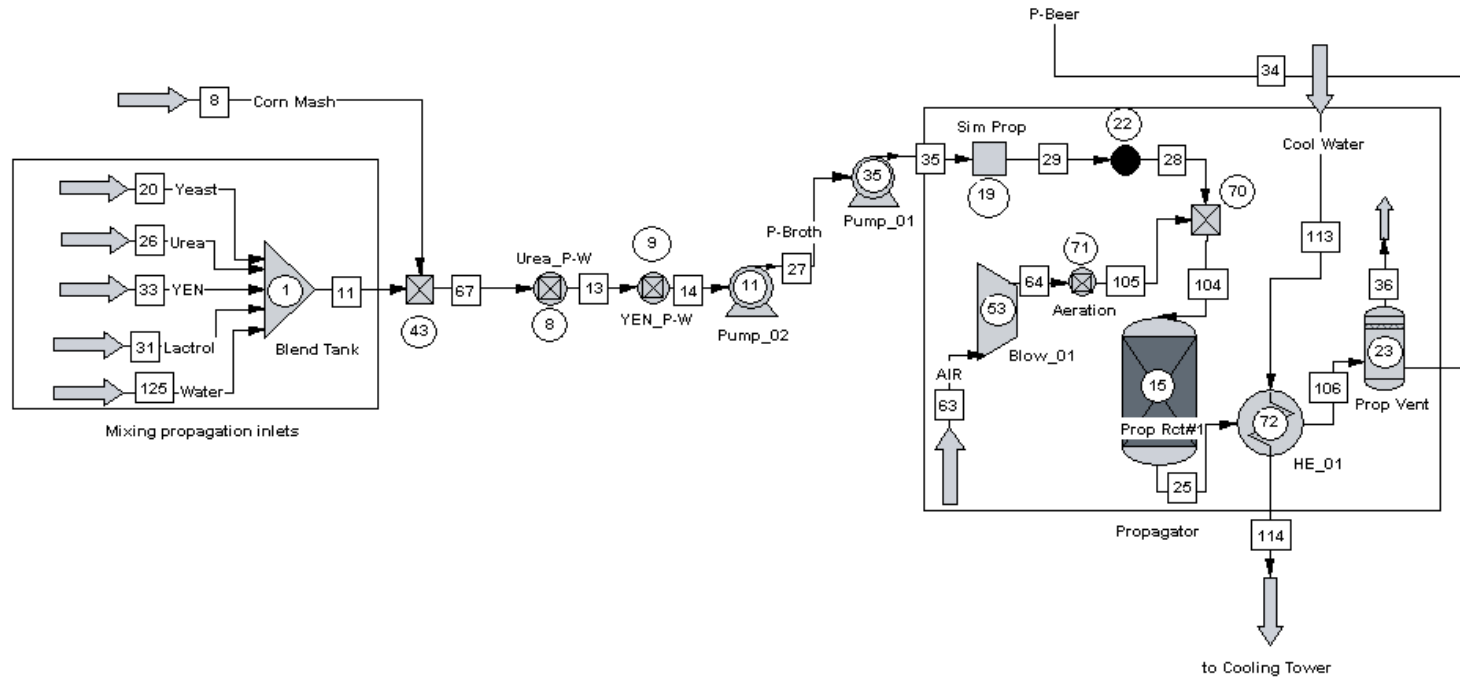


Figure 4.13: Vue de l'étape de propagation du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.

La Figure 4.13 présente les éléments servant à la simulation de la propagation dans le fichier ChemCAD. Le Tableau 4.4 présente la correspondance entre les #ID des flux des diagrammes d'écoulement et de CAD durant les étapes de la cédule cuvée #2, 3, 4 et 5. Noter qu'une fois tous les intrants de la propagation mélangés ensemble, ce mélange est nommé *P-Broth* (ou « bouillon de propagation »). De même, lorsque la propagation est complétée, on obtient un milieu nommé *P-Beer* (ou « bière de propagation »). L'aération de la propagation est assurée par *Blow_01*. Les réactions de propagation sont simulées grâce au réacteur *UnitOP 15*. Noter qu'il n'est pas possible de simuler la présence de la boucle de contrôle de température dans le fichier ChemCAD (*F-11, 12, 13, 14, 15* et *16* des diagrammes d'écoulement). En effet, en mode continu, le *HE_01* doit être situé après le propagateur. Les gaz s'échappant de la propagation sont ventilés (*UnitOP 23*) vers l'Oxidateur Thermique du procédé MG qui n'est pas simulé dans le cadre de ce projet.

4.7.4. Fermentation

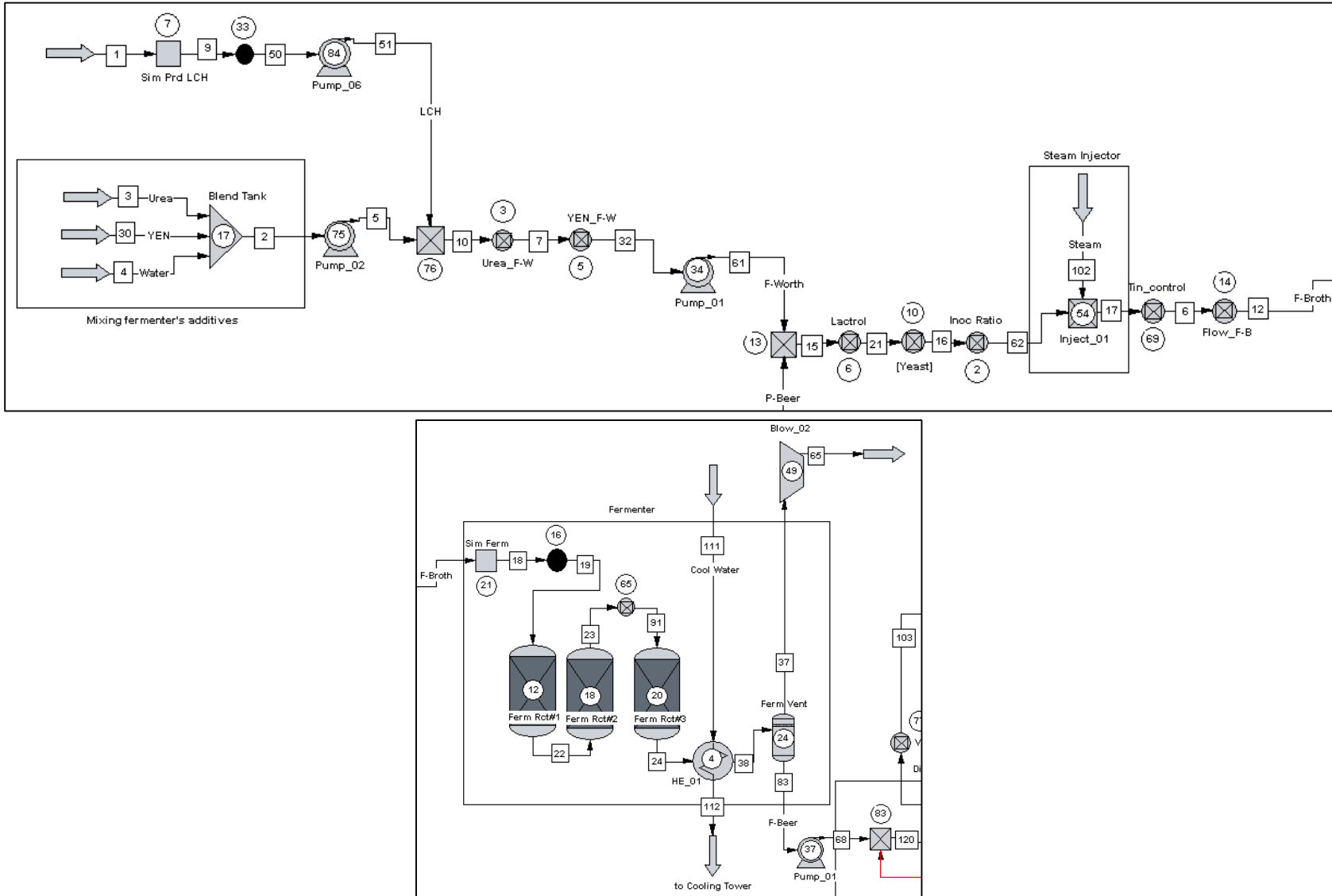


Figure 4.14: Vue de l'étape de fermentation du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.

La Figure 4.14 présente les éléments servant à la simulation de la fermentation dans le fichier ChemCAD. Le Tableau 4.4 présente la correspondance entre les #ID des flux des diagrammes d'écoulement et de ChemCAD durant les étapes de la cédule cuvée #7, 8, 9, 10 et 11. Noter qu'une fois tous les intrants de la propagation mélangés ensemble, ce mélange est nommé *F-Worth* (ou « milieu de fermentation »). Dans la simulation ChemCAD, *F-Worth* est mélangé avec la *P-Beer* afin de donner le bouillon de fermentation final (*F-Broth*). En réalité, la cédule cuvée montre que cela se fait en plusieurs étapes distinctes. Avant leur entrée dans le fermenteur, le *F-Worth* est ajusté à 33 °C par une injection de vapeur vive (équipement *Inject_01*). Les réactions de fermentation sont simulées grâce aux réacteurs *UnitOP 12, 18* et *20*. Comme pour la propagation, la boucle de contrôle de température ne peut pas être simulée dans le fichier ChemCAD, alors le *HE_01* est placé suite aux réacteurs de fermentation. Les gaz s'échappant de la fermentation sont ventilés (*UnitOP 24*) vers le Scrubber (non simulé), puis compressés par *Blow_02*. Le Scrubber n'est pas simulé puisqu'il s'agira d'une augmentation de capacité du Scrubber existant dans le procédé MG. Cela signifie que l'éthanol perdu par les gaz de fermentation sera récupéré par la distillation du procédé MG et ne pourra pas être comptabilisé dans le procédé LCH. Une fois la fermentation complétée, la bière (*F-Beer*) est envoyée vers la colonne à distiller.

4.7.5. Purification de l'éthanol

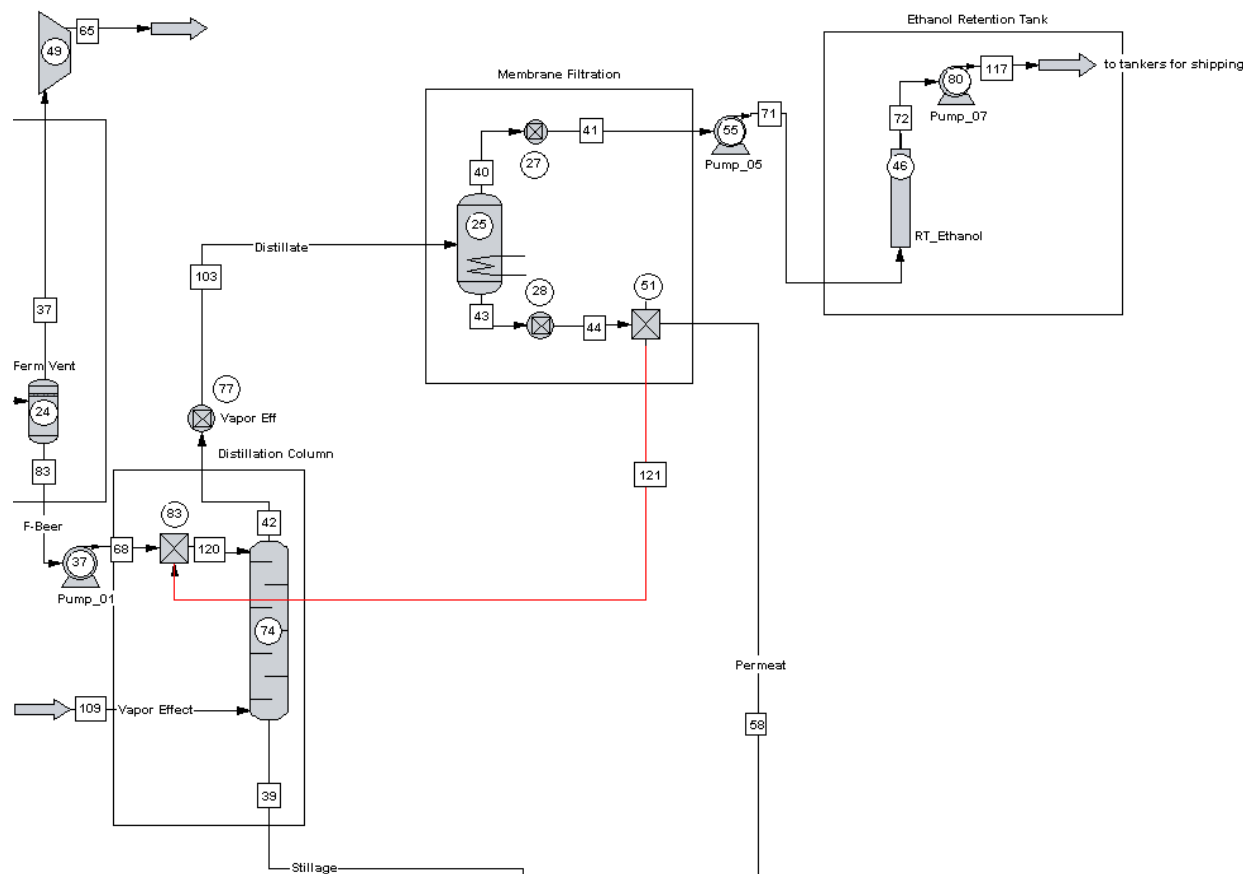


Figure 4.15: Vue de l'étape de la purification de l'éthanol du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.

La Figure 4.15 présente les éléments servant à la simulation de la distillation et à la filtration membranaire dans le fichier ChemCAD. Le Tableau 4.4 présente la correspondance entre les #ID des flux des diagrammes d'écoulement et de ChemCAD durant les étapes de la cédule cuvée #13 et 14. La bière sortant de la fermentation est mélangée au perméat recyclé sortant de la filtration membranaire avant d'entrer en tête de colonne. Le Vapor Effect entre en bas de colonne et son débit est ajusté afin de permettre un taux de récupération de l'éthanol de 99.5%. Le distillat est ensuite envoyé vers l'unité de filtration membranaire où il est concentré jusqu'à 99.5% m/m. Le recyclage de perméat permet de diminuer la perte

en éthanol; il est augmenté jusqu'à ce que le taux de récupération de l'éthanol présent dans la bière (flux #68) soit $\geq 99\%$. Noter que ce taux de récupération exclut l'éthanol perdu dû à l'échappement des gaz de fermentation.

4.7.6. Remplissage des cuves tampon et recyclage des eaux usées

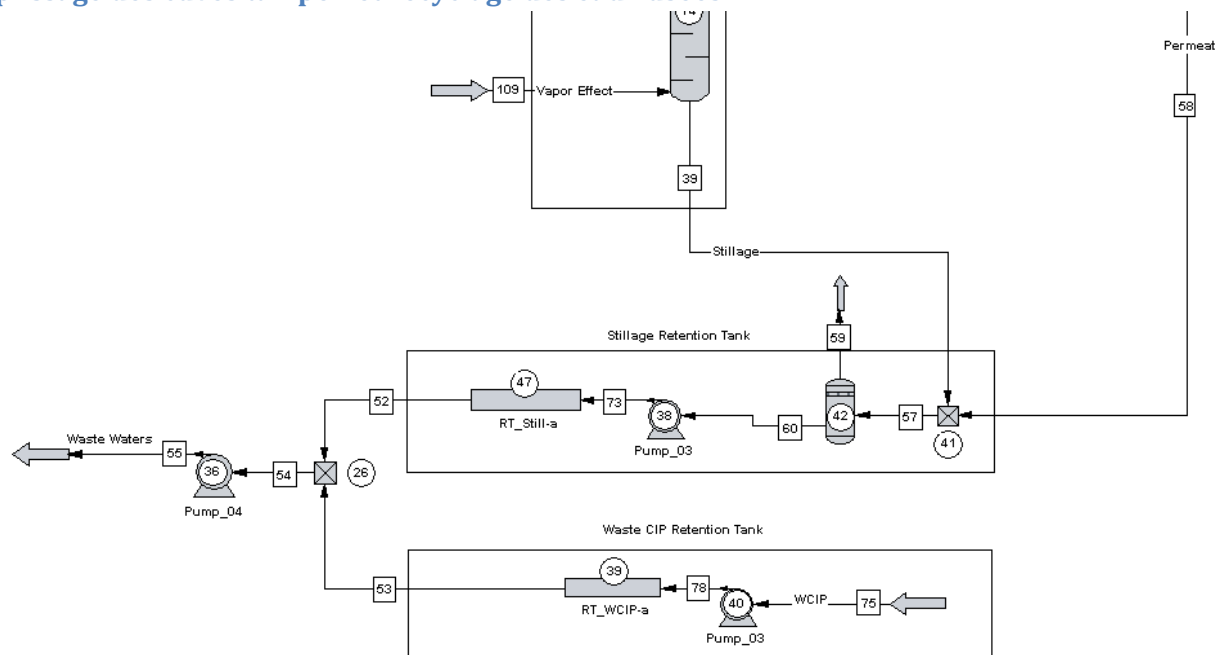


Figure 4.16: Vue de l'étape de stockage des eaux usées du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.

La Figure 4.16 présente les éléments servant à la simulation du transfert des eaux usées vers les cuves tampons dans le fichier ChemCAD. Le Tableau 4.4 présente la correspondance entre les #ID des flux des diagrammes d'écoulement et de ChemCAD durant les étapes de la cédule cuvée #16, 17, 18 et 19. Suite à la fermentation, les eaux usées (Stillage + Perméat non recyclé + WCIP) sont envoyées dans leur cuve tampon respective en passant par la *Pump_03*. En ce qui concerne les eaux usées de nettoyage (WCIP), la simulation ChemCAD n'inclut pas les cycles de CIP, puisqu'elle est en mode continu. Conséquemment, un flux est rajouté (flux #75) afin de simuler la quantité de WCIP qui serait générée durant un cycle cuvée, soit 20 m³ (voir section 4.5). Une fois les eaux usées récoltées dans leurs cuves tampons respectives, elles sont dirigées vers la *Pump_04* afin d'être recyclées à l'usine de CRB ou envoyées à l'usine de Biométhanisation Varennes.

4.7.7. Traitement des eaux usées

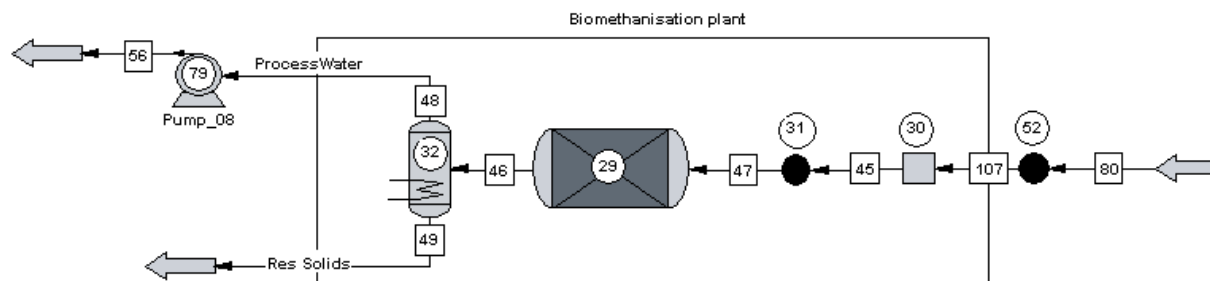


Figure 4.17 : Vue de l'étape de traitement des eaux usées du fichier de simulation ChemCAD du procédé LCH.

La Figure 4.17 présente les éléments servant à la simulation traitement des eaux usées dans le fichier ChemCAD. Le Tableau 4.4 présente la correspondance entre les #ID des flux des diagrammes d'écoulement et de ChemCAD durant les étapes de la cédule cuvée #20 (applicable seulement pour les configurations #2, 3, 8 et 9). Le traitement des eaux usées est prévu prendre place à l'usine de Biométhanisation Varennes. La simulation de ce procédé dépasse la portée de ce rapport. Ainsi, le fichier CAD simule un traitement des eaux usées où toute la matière organique est convertie en solides suspendus (ex : les solides suspendus représenteraient la biomasse générée par les bactéries méthanogènes). Ceci est fait par le biais du réacteur *UnitOP* 29. Ensuite, ces solides suspendus sont séparés du liquide et seulement ce liquide dépourvu de matière organique est apte à être recyclé vers l'usine de CRB, ou encore, relâché à l'environnement, dépendamment de la configuration étudiée.

4.8. Dimensionnement des équipements

Le projet de fermentation des LCH à l'échelle industrielle d'ETG Varennes est jumelé avec leur projet de fermentation de sucres de génération 1.5 (Gén1.5). Le projet de fermentation Gén1.5 a pour but d'augmenter la capacité de la distillerie d'ETG Varennes tout en diversifiant les sources de sucres autres que le maïs-grain. Un exemple de matière première pour la fermentation Gén1.5 serait les Betteraves Énergie (« Energy Beets »). Ces betteraves à haut rendement produisent un jus sucré contenant jusqu'à 220 g/L de sucres fermentables sans autre procédé qu'une extraction des jus [Boulet, 2013]. Conséquemment, il est envisagé que les équipements designés pour le procédé de fermentation LCH serviront aussi à la fermentation Gén1.5. Les levures utilisées dans la fermentation Gén1.5 seront des levures *S. cerevisiae* traditionnelles, et elles auront donc des performances supérieures à celles de LOGM1 du procédé LCH. Les équipements communs aux 2 procédés seront donc dimensionnés en utilisant les hypothèses de performances du procédé Gén1.5. Conséquemment, cette section présente le dimensionnement des équipements du procédé LCH, selon les hypothèses suivantes sur le procédé Gén1.5 :

- 1) La concentration maximale en sucres fermentables des jus sucrés est de 250 g/L;
- 2) Les jus sucrés sont acheminés par voie de camions-citernes avec les mêmes caractéristiques que ceux utilisés pour le procédé LCH;
- 3) La durée de la fermentation est estimée à 40 h;
- 4) La productivité éthylique maximale atteinte durant la fermentation correspond à une consommation de sucres de 10 g/L-h. Le rendement de fermentation est de 94% (ou 0.48 g-éthanol/g-sucres). L'énergie dégagée par la fermentation est la même que celle du procédé LCH (765 BTU/kg-éthanol produit).

Ces données préliminaires ont été obtenues par les laboratoires d'ETG (données non montrées). En utilisant ces hypothèses en plus des hypothèses concernant le procédé LCH, un dimensionnement optimal des équipements est proposé.

4.8.1. Propagateur

Il est proposé d'offrir une certaine flexibilité quant à l'étape de propagation des levures. En effet, vu la variabilité potentielle de la composition des LCH, il est probable que les inhibiteurs affectant la croissance cellulaire s'y retrouvent à différentes concentrations au fur et à mesure que les intrants varient. Conséquemment, il est recommandé de permettre un volume de propagation entre 10 et 20 m³. Ceci représente un ratio milieu de Fermentation/Propagation d'environ 10 à 20x. Cela permettra d'augmenter la concentration initiale en levure dans la fermentation, sans avoir à augmenter de façon dramatique les coûts d'achat de levures (voir section 5.4).

La propagation requiert une aération par air injecté équivalente à 1 vvm. Une propagation de 20 m³ requiert donc une aération de 1200 m³, qui sera assurée par l'équipement *Blow_01*. Durant l'étape de propagation, l'air injecté et le CO₂ produit par les réactions métaboliques doivent être dirigés vers l'unité d'oxydation thermique du procédé MG. En effet, contrairement au CO₂ produit durant la fermentation qui est assez pur afin de le revendre au fabricant de glace sèche PRAXAIR, les gaz produits durant la propagation doivent être brûlés puis rejetés à l'atmosphère, car ils contiennent de l'oxygène et des VOCx.

La pression dans le propagateur est maintenue à 1.08 bar par la soufflante de l'Oxydateur Thermique. La température du milieu de propagation est maintenue à 33 °C. Les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6. Noter qu'aucun facteur de sécurité n'est ajouté pour cet équipement.

4.8.2. Cuve de mélange (Blend Tank)

La cuve de mélange présentement installée dans le procédé MG est utilisée pour le procédé LCH. Un agitateur, une pompe de recirculation (*Pump_02*), une entrée de vapeur et une entrée d'eau de ville sont disponibles pour cette cuve. Les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6. Noter qu'aucun facteur de sécurité n'est ajouté pour cet équipement.

4.8.3. Fermenteur

Le fermenteur est une cuve d'un volume total de 250 m³, ayant une capacité réelle maximale de 225 m³ et munie d'un agitateur. Les dimensions de la cuve sont estimées être proportionnelles à celles des fermenteurs du procédé MG, soit un ratio Diamètre/Hauteur de 1. Il en va de même pour l'agitateur du fermenteur : la puissance de l'agitateur d'un fermenteur de 2000 m³ du procédé MG est de 30 HP, ainsi l'agitateur du fermenteur du procédé LCH est estimé à 3.75 HP (2.8 kW). Les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6. Noter qu'aucun facteur de sécurité n'est ajouté pour cet équipement.

4.8.4. Épuration de gaz (Scrubber)

Le gaz produit durant la fermentation doit passer à travers un scrubber afin de récupérer l'éthanol emporté par le CO₂ produit par les réactions métaboliques. Un scrubber fonctionne en mettant le gaz de fermentation en contact avec un débit d'eau « propre » en contrecourant. Le ventilateur *Blow_02* présent dans le procédé MG permet de maintenir le vacuum tirant les gaz de fermentation. Il est estimé par ETG que le présent Scrubber ne pourra pas prendre en charge le nouvel effluent de gaz de la fermentation des LCH. En utilisant les hypothèses du procédé Gén1.5, le Tableau 4.5 présente la production maximale estimée de gaz de fermentation.

Tableau 4.5: Composition et débit maximum de la production de gaz lors de la fermentation Gén1.5.

Production de CO ₂ maximale durant le pic métabolique	1827 kg/h
Total des gaz emportés hors du fermenteur	1840 kg/h (950 m ³ /h)
Composition	
CO ₂	97.20%
Éthanol	1.80%
H ₂ O	1%

Les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6. Noter qu'aucun facteur de sécurité n'est ajouté pour cet équipement.

4.8.5. Échangeur de chaleur (HE_01)

En utilisant les hypothèses du procédé Gén1.5, une simulation ChemCAD permet de simuler quel débit et quelle puissance est requise par l'échangeur de chaleur du fermenteur. De plus, il est suggéré d'utiliser un échangeur à plaque tel que présentement utilisé sur les fermenteurs du procédé MG. La perte de charge sur ces échangeurs peut être estimée à environ 0.5 bar [Boulet, 2013]. La différence de température entre le côté du caloporteur et du liquide à refroidir doit être d'au moins 10 °C. L'eau de refroidissement disponible pour le procédé LCH est à 20 °C et la fermentation doit être maintenue à 33 °C. Les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6. Noter qu'un facteur de sécurité de 15% est ajouté à la puissance requise calculée.

4.8.6. Injecteur de vapeur (Inject_01)

L'injecteur de vapeur sert à réchauffer les LCH lors de leur transfert dans le fermenteur. En effet, afin de ne pas stresser les levures présentes dans le milieu de propagation, la température des LCH doit être ajustée à 33 °C avant leur entrée dans le fermenteur. Ceci se fait à partir d'un injecteur de vapeur vive générée par la bouilloire du procédé MG. Une simulation ChemCAD permet d'estimer que dans le scénario le plus exigeant, où 200 m³ d'hydrolysats entreraient à 4 °C en 2.5 h dans le fermenteur, le débit de vapeur vive (générée à 174 °C, 8.6 bar) requis afin d'amener leur température à 33 °C serait de 3785 kg/h (équivalent à une puissance de 13864 kW). En tenant compte de ces contraintes, les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6.

4.8.7. Cuves tampons

Les différentes configurations de procédé LCH à l'étude présentent différents agencements de cuves tampons. Les cuves tampons sont dimensionnées suivant les débits présentés dans le Tableau 11.1 (Tableau des écoulements) et la séquence correspondante du cycle cuvée (section 4.5). Grâce à ces deux données, il est possible de calculer le volume utile nécessaire pour une cuve tampon avec l'équation suivante :

$$\text{Volume utile} = \text{débit entrant} * \text{temps de remplissage} * \text{facteur de sécurité} \quad [16]$$

Il est possible que certaines étapes de remplissage et de vidange des cuves s'entrecroisent et théoriquement cela permet de réduire le volume tampon total requis selon l'équation [17]. Cette réduction en volume permettrait de réduire les coûts d'achats d'une telle cuve.

$$\text{Volume utile} = (\text{débit entrant} - \text{débit sortant}) * \text{temps d'entrecroisement} \quad [17]$$

Néanmoins, les gains en réduction de volume de certaines cuves tampons pour lesquelles ceci serait valable sont jugés négligeables par rapport à l'ensemble des coûts d'investissements nécessaires à ce procédé. Par ailleurs, la possibilité d'avoir une capacité tampon correspondant à l'équation [16] est une sécurité importante dans un procédé type cuvée, car elle permet d'absorber les effluents de chacune des opérations unitaires indépendamment l'une de l'autre. Ainsi, dans le cadre de ce projet il est jugé adéquat de déterminer le volume tampon nécessaire suivant l'équation [16], et non l'équation [17].

Noter que le ratio Diamètre/Hauteur est estimé à 0.8, soit identique à celui des cuves tampons du procédé MG. En tenant compte de ces contraintes, les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6.

RT_LCH

Pour les 6 configurations à l'étude, la cuve tampon des hydrolysats est estimée devoir avoir un volume utile de 200 m³. En effet, le volume tampon nécessaire est équivalent à la consommation de LCH totale dans 1 cycle de cuvée complet.

RT_Still-a (et RT_Still-b)

Pour les configurations # 1 et 7, où il n'y a pas de traitement des eaux usées, une unité tampon permettant de retenir la totalité des eaux usées produites durant 1 cycle de cuvée est requise. La plus grande quantité d'eaux usées qui pourrait être produite durant 1 cycle arrive lorsqu'une propagation de 20 m³ est utilisée. Dans ce cas, la simulation ChemCAD montre qu'une quantité totale de Stillage d'environ 255 m³ sera produite. Comparativement, dans le cas de base, utilisant une propagation de 15 m³, le volume de Stillage généré est d'environ 250 m³ (voir Tableau 11.1 Tableau des écoulements). Conséquemment, une cuve ayant un volume utile de 250 m³ avec un facteur de sécurité de 15% est adéquate pour tout usage.

Les configurations # 2, 3, 8 et 9, où les eaux usées sont envoyées à l'usine de Biométhanisation Varennes, requièrent une unité tampon moins volumineuse. En effet, il est estimé que les eaux usées peuvent être utilisées rapidement par l'usine de traitement. Une capacité de rétention de 10 h est estimée être suffisante afin de pouvoir coordonner les 2 procédés. Ainsi, sachant que le débit maximal de Stillage entrevu est de 255 m³ / 48 h = 5.31 m³/h; cela permet de calculer qu'une cuve de rétention de 53.1 m³ est nécessaire, valeur à laquelle est ajouté un coefficient de sécurité de 15%.

RT_WCIP-a (et RT_WCIP-b)

L'opération de nettoyage du fermenteur et des équipements de purification d'éthanol s'effectue grâce à un équipement de CIP. Ce processus est assez rapide : la cédule cuvée prévoit une période 1.5 h allouée pour chacun des équipements. La cuve de rétention des WCIP est estimée devoir avoir la capacité de recevoir la totalité des WCIP avant leur recyclage ou leur envoi au traitement des eaux usées, vue la rapidité à laquelle elles seront produites. Il est estimé qu'un volume de 10 m³ de solution NaOH 2% est nécessaire afin de nettoyer le fermenteur et l'équivalent afin de purger la colonne à distiller. Les besoins de l'unité de filtration membranaire sont inconnus, alors ils sont mitigés. Une capacité totale de 20 m³ est donc requise pour l'équipement *RT_WCIP*, valeur à laquelle est ajouté un coefficient de sécurité de 15%.

RT_PW

La cuve tampon des eaux de procédé (soit les eaux traitées sortant de l'usine de Biométhanisation Varennes et recyclées à l'usine de CRB) se doit de recevoir l'équivalent en volume des deux cuves tampons d'eaux usées, soit un maximum de 255 + 20 = 275 m³. Ceci est requis afin que le procédé LCH soit réellement considéré comme fonctionnant en boucle fermée. Une capacité totale de 275 m³ est donc requise pour l'équipement *RT_PW*, valeur à laquelle est ajouté un coefficient de sécurité de 15%.

RT_ETH

Le volume requis par la cuve tampon d'éthanol purifié est évalué selon les hypothèses émises pour le procédé Gén1.5, en plus d'un taux global de récupération d'éthanol de 99.5%. Dans ces conditions et sachant que le fermenteur peut contenir un maximum de 225 m³ de milieu : l'équation [18] montre qu'un volume utile de 34 m³ est adéquat pour RT_ETH, valeur à laquelle est ajouté un coefficient de sécurité de 15%.

[18]

Vol. d'éthanol max produit

$$= \frac{225 \text{ m}^3 * 0.25 \frac{\text{kg}_{\text{sucres}}}{\text{L}_{\text{milieu}}} * 0.48 \frac{\text{kg}_{\text{éthanol produit}}}{\text{kg}_{\text{sucres}}} * 0.995\%_{\text{éthanol récupérée}}}{\frac{0.789 \text{ kg}_{\text{éthanol}}}{\text{L}_{\text{éthanol}}}} = 34 \text{ m}^3$$

4.8.8. Pompes

Afin de sélectionner une pompe, les principales spécifications à fournir sont le débit maximum, la différence de pression et la composition du fluide pompé. Sauf contre-indication, il est suggéré d'utiliser des pompes centrifuges à fréquence variables en fonte. Noter que l'efficacité globale des pompes est posée à 80%.

Le débit maximum des différentes pompes est calculé en utilisant les débits moyens du Tableau 11.1 corrigé afin de respecter la cédule cuvée telle que rapportée dans la section 4.5. Ensuite, pour chaque utilisation de la pompe, la pression de tête requise est calculée. En utilisant la densité du fluide, le débit et la pression de tête, la puissance requise est calculée suivant la série d'équations ci-dessous ([Peters et al., 2003] p.515) :

[19]

Différentiel de pression = $\Delta P =$ perte par friction tuyauterie + pression de tête

$$\Delta P = f + \rho gh$$

$$\text{Puissance} = W = \frac{(f + \rho gh) * Q * 1.15}{\varepsilon * 10^3}$$

où:

$$f = Pa$$

$$\rho = \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$$

$$g = 9.81 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}$$

h = élévation (m)

$$Q = \text{débit} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{s}} \right)$$

1.15 = facteur de sécurité de 15% pour toutes les pompes

ε = efficacité (80%)

W = kW

Le reste de cette section détaille les caractéristiques de chacune des pompes selon leur utilisation. Les données requises pour le design de ces équipements sont résumées dans le Tableau 4.6.

Pump_01 (Fermenter's main pump)

La pompe du fermenteur (*Pump_01*) a plusieurs utilités. Afin de pouvoir choisir la puissance adéquate de la pompe, il est nécessaire de la dimensionner afin qu'elle puisse accomplir toutes ses tâches.

La 1^{ère} tâche de cette pompe est de maintenir la température de la fermentation à 33 °C. Pour cette tâche, la charge maximale rencontrée par la pompe arrive lors du pic de productivité dans le cadre d'une fermentation de Gén1.5, car ce type de fermentation génère un flux de chaleur plus élevé qu'une fermentation LCH. En utilisant les hypothèses du procédé Gén1.5 et en simulant le pic de productivité à l'aide de ChemCAD, il est possible de calculer le débit de recycle (boucle *F-11, 12, 13, 14, 15 et 16*) permettant de maintenir la température à sa consigne de 33°C.

1. Un débit de 72 m³/h doit être passé à travers *HE_01*;
2. Les pertes de frictions dans *HE_01* sont estimées à 0.5 bar;
3. Une simulation ChemCAD rapporte des pertes de frictions de tuyauterie de 0.5 bar;
4. Un facteur de sécurité de 15% est ajouté au
5. La puissance calculée est donc : $W = (0.5 + 0.5) * 10^5 * (72 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 2.88 \text{ kW}$

La 2^e tâche de cette pompe est de transférer des LCH dans le fermenteur à l'arrivée de la livraison par camions-citernes. Bien que cette application ne soit valide que pour les configurations # 1, 2 et 3; elle est aussi requise pour les fermentations Gén1.5 où il est prévu que les jus sucrés soient livrés de la même façon.

1. La vidange d'un camion-citerne représente un débit de 80 m³/h (40 m³ en 0.5 h);
2. La pompe doit surmonter la colonne de liquide imposé par la hauteur du liquide dans le fermenteur. Connaissant les dimensions du fermenteur (Tableau 4.6) et en sachant que le volume réel peut atteindre 225 m³, une hauteur de liquide maximale de 6.14 m est calculée;
3. Les pertes par friction dans le *HE_01* et dans la tuyauterie sont évaluées à de 0.5 bar chacune;
4. La puissance calculée est donc : $W = (1100 * 9.81 * 6.14 + (0.5 + 0.5) * 10^5) * (80 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 5.31 \text{ kW}$

La 3^e tâche de cette pompe consiste à accueillir les LCH livrés par pipeline (*F-10*) à partir de la *Pump_06* et de procéder au remplissage du fermenteur. Noter que cette utilisation n'est valide que pour les configurations #7, 8 et 9. Le dimensionnement est donc identique à celui fourni pour la tâche #2

La 4^e tâche de cette pompe consiste à accueillir les autres intrants à la fermentation et la propagation provenant de la cuve de mélange (Blend Tank) à partir de la *Pump_02*. Cette application est nécessite une puissance négligeable face aux autres énumérées ci-dessus.

Il est nécessaire de sélectionner un design pouvant performer adéquatement pour toutes les différentes applications de la *Pump_01* énumérées ci-dessus. Conséquemment, une puissance de 5.31 kW est sélectionnée.

Pump_02 Blending tank pump

Cette pompe sert simplement à acheminer les intrants de la propagation et de la fermentation jusqu'à la *Pump_01*. De plus, il est envisagé que la tuyauterie raccordant la *Pump_02* à la *Pump_01* se connectera à l'entrée de la *Pump_01*, ce qui engendre une succion. Conséquemment, la *Pump_02* n'a besoin que de surmonter la perte par friction de la tuyauterie. La puissance requise est donc minime et puisque la *Pump_02* est déjà présente dans le procédé MG, il est estimé que son design ($W = 0.15\text{kW}$) est adéquat pour le procédé Gén1.5.

Pump_03 Stillage pump

La *Pump_03* sert à transporter le Stillage du bas de la colonne à distiller jusque dans sa cuve tampon *RT_Still-a*. Le débit maximum rencontré par la *Pump_03* arriverait dans un scénario où le volume de bière dans la fermentation serait à son maximum, soit dans le cas d'une propagation de 20 m^3 . Dans un tel cas, la simulation montre que la quantité de Stillage sortant du bas de la colonne pourrait atteindre près de 255 m^3 (dû à l'ajout de la Steam et du Vapor Effect). Le débit rencontré par la *Pump_03* serait donc d'environ $255\text{ m}^3 / 48\text{ h} = 5.3\text{ m}^3/\text{h}$.

Pour les configurations#1 et 7, les dimensions de la cuve tampon *RT_Still-a* ont été déterminées (section 4.8.7) et cela permet d'obtenir que la hauteur qu'atteint le Stillage lors du remplissage est de 7.36 m. Il est estimé que la friction dans la tuyauterie est négligeable.

1. La puissance calculée est donc : $W = (1100 * 9.81 * 7.36) * (5.3 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.17\text{kW}$

Pour les configurations#2, 3, 8 et 9 les dimensions de la cuve tampon *RT_Still-a* sont réduites tel qu'indiqué à la section 4.8.7. La hauteur maximale atteinte le Stillage lors du remplissage est de 4.3 m. Il est estimé que la friction dans la tuyauterie est négligeable.

1. La puissance calculée est donc : $W = (1100 * 9.81 * 4.3) * (5.3 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.085\text{ kW}$

Noter que pour les 6 configurations, la *Pump_03* sert aussi à transférer les eaux usées de nettoyage (WCIP) du fermenteur et de la colonne à distiller jusqu'à la cuve de rétention WCIP. Le débit de transfert n'est pas déterminé, puisque l'opération de nettoyage est très flexible : la cédule cuvée prévoyant plus de 10 h à ces fins. Conséquemment, le dimensionnement de la *Pump_03* tel que présenté ci-dessus est estimé être adéquat pour lui permettre d'accomplir la tâche de transfert des WCIP.

Pump_04 Waste Waters discharge pump

Une fois les eaux usées entreposées dans leur cuve tampon respective, elles doivent être transvidées à des fins de recyclage ou de traitement des eaux usées.

Pour la configuration #1, la *Pump_04* transfère les eaux usées de leur cuve tampon jusque dans un camion-citerne chargé de leur rapatriement à l'usine de CRB. Le débit requis est estimé à 80 m³/h (soit le remplissage d'un camion de 40 m³ en 0.5 h), les pertes par friction dans la tuyauterie sont négligées et une élévation de 2 m est assumée.

1. La puissance calculée est donc : $W = (1100 * 9.81 * 2) * (80 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.69 \text{ kW}$

Pour les configurations #2, 3, 8 et 9, les eaux usées sont acheminées vers l'usine de Biométhanisation Varennes par voie de pipeline à mesure où elles sont produites.

1. Une simulation ChemCAD permet d'estimer que la perte de pression dans le pipeline serait d'environ 0.4 bar suivant les hypothèses suivantes :
 - a. Débit de 5.3 m³/h (255 m³ de Stillage produit en 48 h);
 - b. Distance 800 m;
 - c. ID = 0.075 m;
 - d. Rugosité = 0.000259 m;
 - e. Pipeline comprenant 4x gate valves et 6x coudes à 90°;
 - f. 2 m d'élévation;
2. La puissance calculée est donc : $W = (0.4 * 10^5) * (5.3 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.08 \text{ kW}$

Pour la configuration #7, les eaux usées sont recyclées directement à l'usine de CRB par voie de pipeline à un débit constant de 5.73 m³/h, soit un maximum de 275 m³ d'eaux usées (255 m³ de Stillage + 20 m³ de WCIP) en 151 h. Le pipeline est estimé avoir les mêmes caractéristiques que celui décrit ci-dessus.

1. Une simulation ChemCAD permet d'estimer que la perte de pression dans le pipeline serait d'environ 0.42 bar suivant les hypothèses suivantes :
 - a. Débit de 5.73 m³/h;
 - b. Distance 800 m;
 - c. ID = 0.075 m;
 - d. Rugosité = 0.000259 m;
 - e. Pipeline comprenant 4x gate valves et 6x coudes à 90°;
 - f. 2 m d'élévation;
2. La puissance calculée est donc : $W = (0.42 * 10^5) * (5.73 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.096 \text{ kW}$

Pump_05 Ethanol 200 charge pump

La fonction est de remplir la cuve tampon d'éthanol purifié. Le débit maximum tel que montré à la section 4.8.7 serait de 34 m³ / 48 h = 0.708 m³/h. Les dimensions de la cuve tampon *RT_ETH* ont été déterminées et cela permet d'obtenir que la hauteur qu'atteint l'éthanol lors du remplissage est de 3.71 m.

1. La puissance calculée est donc : $W = (789 * 9.81 * 3.71) * (0.708 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.0081 \text{ kW}$

Pump_06 LCH delivery pump

La *Pump_06* n'est présente que dans les configurations #7, 8 et 9, puisqu'elle est utilisée pour acheminer les LCH stockés dans la cuve *RT_LCH* jusqu'à l'entrée de la *Pump_01* lors du remplissage du fermenteur. La succion créée par la *Pump_01* fait en sorte que la *Pum_06* n'a qu'à surmonter les pertes de friction engendrées par le pipeline *F-10*. La cédule cuvée prévoit dans ces configurations un remplissage du fermenteur de 2.5 h, soit à un débit de 80 m³/h.

2. Une simulation ChemCAD permet d'estimer que la perte de pression dans le pipeline serait d'environ 1.1 bar suivant les hypothèses suivantes :
 - a. Débit = 200 m³ / 2.5 h = 80 m³/h
 - b. Distance 800 m;
 - c. ID = 0.15 m;
 - d. Pipe roughness = 0.000259 m;
 - e. Pipeline comprenant 4x gate valves et 6x coudes à 90°;
 - f. 0 m d'élévation;
3. La puissance calculée est donc : $W = (1.1 * 10^5) * (80 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 3.51 kW$

Pump_07 Ethanol 200 discharge pump

La *Pump_07* permet le remplissage des camions-citernes pour livraison du produit fini. Cette pompe livre donc 40 m³ d'éthanol 99.5% en 0.5 h.

1. Une simulation ChemCAD permet d'estimer que la perte de pression dans la tuyauterie serait d'environ 0.25 bar suivant les hypothèses suivantes :
 - a. Débit = 40 m³ / 0.5 h = 80 m³/h
 - b. Distance 10 m;
 - c. ID = 0.1 m;
 - d. Pipe roughness = 0.000259 m;
 - e. Pipeline comprenant 4x gate valves et 6x coudes à 90°;
 - f. 2 m d'élévation;
2. La puissance calculée est donc : $W = (0.25 * 10^5) * (80 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.799 kW$

Pump_08 Process Water discharge pump

La *Pump_08* permet de recycler les eaux de procédé (soit les eaux sortant de l'usine de Biométhanisation Varennes) jusqu'à l'usine de CRB via un pipeline (configuration #8) ou par camions-citernes (configuration #2). Dans le scénario générant le plus d'eaux de procédé, un total de 275 m³ devrait être recyclé à l'usine de CRB, soit l'équivalent des 255 m³ de Stillage et 20 m³ de WCIP qui sont entrés dans le procédé de traitement.

Pour la configuration #2, les camions-citernes ayant amené les LCH se chargeraient de rapporter les eaux de procédé.

1. Une simulation ChemCAD permet d'estimer que la perte de pression dans la tuyauterie serait d'environ 0.5 bar suivant les hypothèses suivantes :
 - a. Débit = $40 \text{ m}^3 / 0.5 \text{ h} = 80 \text{ m}^3/\text{h}$
 - b. Distance 10 m;
 - c. ID = 0.1 m;
 - d. Pipe roughness = 0.000259 m;
 - e. Pipeline comprenant 4x gate valves et 6x coudes à 90°;
 - f. 2 m d'élévation;
2. La puissance calculée est donc : $W = (0.5 * 10^5) * (80 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 1.60 \text{ kW}$

Pour la configuration #8, un pipeline permet de recycler les eaux de procédé jusqu'à la cuve tampon RT-PW :

1. Une simulation ChemCAD permet d'estimer que la perte de pression dans le pipeline serait d'environ 0.21 bar suivant les hypothèses suivantes :
 - a. Débit = $275 \text{ m}^3 / 151 \text{ h} = 1.821 \text{ m}^3/\text{h}$
 - b. Distance 800 m;
 - c. ID = 0.1 m;
 - d. Pipe roughness = 0.000259 m;
 - e. Pipeline comprenant 4x gate valves et 6x coudes à 90°;
 - f. 2 m d'élévation;
2. La puissance calculée est donc : $W = (0.21 * 10^5) * (1.821 * 1.15/3600)/(0.8 * 10^3) = 0.015 \text{ kW}$

4.8.9. Soufflantes

Blow_01

La soufflante *Blow_01* est utilisée afin d'aérer la propagation. Tel que mentionné à la section 4.8.1, une aération maximale de $1200 \text{ m}^3/\text{h}$ d'air est prévue. Cet air est censé être pris directement de l'environnement, être passé à travers un filtre grossier afin d'éliminer les poussières et être compressé par *Blow_01* à une pression lui permettant de surmonter les pertes de charge dans la tuyauterie et de surmonter la colonne de liquide imposée par le milieu de propagation dans le fermenteur. En effet, l'aération se fait en injectant l'air dans un système de distribution d'air au fond du fermenteur. Le design précis de cet aérateur reste indéterminé, alors il est estimé qu'il ne s'agit que d'un tuyau en spirale installé au fond du fermenteur et percé de trous permettant à l'air de s'échapper dans le milieu de propagation. Afin d'estimer les pertes de charges engendrées par la friction dans l'aérateur, il est estimé qu'il s'agit d'un tuyau de 10 cm de diamètre interne, d'une longueur de 50 m et percé de 1000 trous de 5 mm de diamètre. Afin de calculer quel devra être la pression de l'air à l'entrée de l'aérateur, la méthodologie suivante est adoptée :

1. Données connues :

- a. Débit d'air à l'entrée de *Blow_01* = 1200 m³/h à 15 °C et 1.01 bar;
- b. Hauteur du liquide à surmonter dans le propogateur = 3 m. Cela génère une pression de colonne de liquide de $\Delta P = 3m * 1100 * 9.81 * 10^{-5} = 0.324 \text{ bar}$
- c. Une soufflante a un ratio de compression maximum de 2x ([Seider et al., 2009] p.567). Conséquemment, la perte de pression allouable par la friction dans la tuyauterie est :
$$\begin{aligned} & \textit{Pression maximum atteignable} - \textit{pression dans le propogateur} \\ & - \textit{pression de la colonne de liquide} = 1.01 * 2 - 1.08 - 0.324 \\ & = 0.616 \text{ bar} \end{aligned}$$
- d. La méthode utilisée afin de calculer la perte de pression dans la tuyauterie est celle de [Software-Factory Norbert Schmitz, 2013]. Cet outil permet de calculer la perte de pression dans le tuyau principal et dans les orifices d'échappement d'air. Après quelques itérations la méthodologie suivante permet d'atteindre un résultat satisfaisant :
 - i. Une simulation ChemCAD montre que la compression de 1200 Sm³/h d'air (20.05% O₂; 78.05% N₂; 0.1% CO₂) de 1.01 bar et 15 °C jusqu'à 1.5 bar dans un compresseur adiabatique d'une efficacité de 70% génère un flux de gaz de 1540 kg/h à 65 °C d'une densité de 1.53 kg/m³ et d'une viscosité de 0.2013*10⁻⁶ kg/m-s;
 - ii. En entrant ces données dans l'outil, avec un tuyau de 50 m de longueur, 10 cm de diamètre et rugosité de 0.0025 m; il calcule une perte de charge de 0.05 bar;
 - iii. Ensuite, on estime qu'une pression égale sur la longueur du tuyau et que dans chacun des orifices, un débit égale d'air d'échappe. En posant 1000 orifices (type « Orifice thick-edged ») de 5 mm de diamètre, 3 mm d'épaisseur et d'où s'échappe 1540/1000=1.540 kg/h d'air, on obtient une perte de pression de 0.003 bar.
- e. La perte de pression totale dans l'aérateur est de 0.053 bar;
- f. Le calcul de la pression minimale à la sortie de *Blow_01* devient :

Pression min

= *pression d'entrée*

+ *pression dans le propogateur* - *perte de pression dans l'aérateur* - *pression de la colonne de liquide*

= 1.01 + 1.08 - 0.053 - 0.616 = 1.421

- g. À cela s'ajoute un facteur de sécurité de 15% : 1.421*1.15=1.64 bar

Afin de combler les besoins en aération de la propagation, le *Blow_01* doit compresser 1200 m³/h d'air à 15 et 1.01 bar jusqu'à 1.64 bar. ChemCAD permet de calculer que la puissance de ventilateur requise sera de 18.5 kW (supposant 70% d'efficacité). Les données requises pour le design de ces unités sont résumées dans le Tableau 4.6.

Blow_02

Tel que rapporté à la section 4.8.4, il est estimé que durant le pic de productivité de la fermentation Gén1.5, 1840 kg/h (950 m³/h) de gaz seront produits. En mitigeant les pertes de volume dû à l'éthanol absorbé dans le Scrubber, il est possible de calculer la puissance additionnelle que nécessitera la

soufflante du procédé MG (*Blow_02*). Noter que la pression d'entrée est de 1.08 bar et la pression de sortie est de 1.35 bar. Une simulation ChemCAD de *Blow_02* montre qu'afin de compresser 1840 kg/h de gaz (99% CO₂; 1% H₂O; 33 °C) de 1.08 à 1.35 bar avec une efficacité de 70%, cela requiert une puissance de 6.7 kW. Les données requises pour le design de ces unités sont résumées dans le Tableau 4.6.

4.8.10. Distillation

La distillation est conçue afin de concentrer une bière à faible teneur en éthanol (5 à 13% m/m) jusqu'à une consigne entre 50% et 60% m/m. De plus, il est envisagé que cette colonne fonctionnera de façon similaire à la colonne présentement utilisée dans le procédé MG suivant les spécifications suivantes :

1. Colonne à plateaux;
2. Entrée de la bière au plateau #1 (soit le premier plateau situé en tête de colonne);
3. Entrée du Vapor Effect au dernier plateau du bas de la colonne;
4. Le Vapor Effect étant une vapeur d'eau à 85.5 °C et 0.574 bar;
5. Une pression en tête de colonne de 0.357 bar, assurée par le vacuum créé dans l'unité de filtration membranaire;
6. Aucun condenseur en tête de colonne, ni bouilloire en bas de colonne;
7. Un taux de récupération d'éthanol de 99.5%.

En utilisant ces spécifications, une optimisation de la colonne à distiller a été faite grâce à ChemCAD, où le but était de minimiser le Vapor Effect et le nombre de plateaux afin d'obtenir la séparation voulue (50% à 60%) à partir de la bière (5% à 13%). L'optimisation (résultats non montrés) a démontré un optimal quant à l'énergie utilisée, le nombre de plateaux et la flexibilité de la colonne à recevoir une bière plus ou moins concentrée, lorsque la colonne comptait 16 plateaux. Conséquemment, ce rapport se base sur les résultats obtenus avec une colonne à 16 plateaux aux spécifications mentionnées ci-dessus. Il est recommandé d'effectuer une optimisation et un design plus poussé lorsque le procédé LCH et Gén1.5 seront mieux définis. Les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6.

4.8.11. Filtration membranaire

Tel que mentionné précédemment, la technologie de purification d'éthanol par filtration membranaire est encore en développement. ETG est en partenariat présentement avec une firme développant cette technologie. Aucun détail n'est encore disponible. Il est cependant estimé que l'unité sera en mesure de concentrer une bière à partir de 50% d'éthanol jusqu'à 99.5%. Cette unité est envisagée aussi produire un effluent (le perméat) principalement constitué d'eau et d'éthanol à une teneur de 4% m/m. Afin de réduire les pertes en éthanol, le perméat est recyclé en tête de colonne afin d'augmenter le taux de récupération global d'éthanol. La quantité de perméat recyclé est ajusté dans la simulation afin d'obtenir un taux global de récupération d'éthanol supérieur à 97%. C'est-à-dire, la quantité dans le concentrat de l'unité de filtration membranaire doit correspondre au minimum à 97% de la quantité d'éthanol qui était présent dans la bière. Les données requises pour le design de cet équipement sont résumées dans le Tableau 4.6.

4.8.12. Traitement des eaux usées

Pour certaines configurations à l'étude, les eaux usées (Stillage, WCIP et perméat résiduel) sont envoyées pour être traitées à la future usine de Biométhanisation Varennes. Cette usine sera équipée d'un procédé de traitement des eaux usées complet, permettant d'obtenir un effluent « propre »; ici appelé eaux de procédé. Cet effluent sera soit recyclé vers l'usine de CRB (configurations #2 et 8) ou rejeté à l'environnement (configurations #3 et 9). Le design et les spécifications d'un tel procédé dépassent la portée de ce rapport, mais les hypothèses suivantes sont cruciales au bon fonctionnement du procédé LCH :

1. Les eaux usées stockées dans les cuves tampons du procédé LCH peuvent être envoyées à l'usine de traitement par voie de pipeline;
2. L'eau de procédé sortant de Biométhanisation Varennes est considérée assez « propre » pour ne pas affecter le procédé d'hydrolyse de CRB ou le procédé LCH. Principalement, les solides suspendus sont retirés, les inhibiteurs de fermentation sont retirés et la COD est réduite à un minimum.

4.9. Tableau de dimensionnement des équipements

Tableau 4.6 : Tableau de dimensionnement des équipements. Les spécifications de chacun des équipements designer à la section 4.8 y sont résumées.

Fermentation											
Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Capacity (m3)	Working Vol. (m3)	ID (m)	Height (m)	Head at Working Vol. (m)	Min. Pressure (bar)	Max. Pressure (bar)	Working Temp. (°C)
Propagator	ALL	Propagator	15	10	10	ND	ND	2.0	1.01	1.08	33.0
Fermenter	ALL	Fermenter	12-18-20	250	225	6.8	6.8	6.1	1.01	1.08	33.0

Blending										
Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Capacity (m3)	Working Vol. (m3)	ID (m)	Height (m)	Min. Pressure (bar)	Max. Pressure (bar)	Working Temp. (°C)
Blending Tank	ALL	Blend Tank	1-17	1.8	ND	1.2	1.5	1.01	1.01	33.0

Ethanol Recovery										
Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Design Inlet Flow (m3/h)	nb of Stages	Feed stg	Steam stg	Design Ethanol Recovery (Conc/Feed)	Conc. Outlet [Ethanol] (%w/w)	Dil. Outlet [Ethanol] (%w/w)
Distillation Column	ALL	Distillation	74	5.0	16	1	16	99.5%	60.0%	ND
Membrane Filtration	ALL	Mem Filt	25	0.68	1			set for global recovery	99.5%	4.0%
Scrubber	ALL	Scrubber	NA	950				ND	ND	ND

Retention Units

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Capacity (m3)	Working Vol. (m3)	ID (m)	Height (m)	Head at Working Vol. (m)	Min. Pressure (bar)	Max. Pressure (bar)	Working Temp. (°C)
LCH retention tank (CRB)	ALL	RT_LCH	43	230	200	6.2	7.7	6.7	1.01	1.01	20.0
Stillage retention tank (ETG)	1, 7	RT_Still-a	47	287	250	6.6	8.3	7.2	1.01	1.01	20.0
	2, 3, 8, 9	RT_Still-a	47	61	53	4.0	5.0	4.3	1.01	1.01	20.0
Stillage retention tank (CRB)	1, 3, 7, 9	RT_Still-b	41	<i>IDEM to RT_Still-a</i>							
Waste CIP retention tank (ETG)	ALL	RT_WCIP-a	39	23	20	2.9	3.6	3.1	1.01	1.01	20.0
Waste CIP retention tank (CRB)	1, 3, 7, 9	RT_WCIP-b	42	<i>IDEM to RT_WCIP-a</i>							
Process Water retention tank (CRB)	2, 8	RT_PW	50	316	275	6.9	8.6	7.5	1.01	1.01	20.0
Ethanol 200 retention tank (ETG)	ALL	RT_Ethanol	46	39	34	3.4	4.3	3.7	1.01	1.01	20.0

Heat Exchanger

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Design Inlet Flow (m3/h)	Duty (kW)	Inlet Temp. (°C)	Outlet Temp. (°C)	Design pressure drop (bar)
Fermentation Main HE	ALL	HE_01	4-72	72	266.8	33	30	0.5
Live Steam Injector	ALL	Inject_01	54	4709	13864	174	33	6.9

Pumps

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Design Inlet Flow (m3/h)	Power (kW)	TDH (m2/s2)	Inlet Temp. (°C)	ΔP (bar)	Efficiency (total)	Liquid density (kg/m3)
Fermenter's main pump	ALL	Pump_01	34-35	92.00	5.31	151.1	20.0	1.66	0.8	1100
Blending tank pump	ALL	Pump_02	11-75	20.93	0.15	18.3	33.0	0.20	0.8	1100
Stillage pump	1, 7	Pump_03	38-40	6.10	0.17	72.2	20.0	0.79	0.8	1100
	2, 3, 8, 9	Pump_03	38-40	5.30	0.085	42.2	20.0	0.46	0.8	1100
Waste Waters discharge pump	1	Pump_04	36	92.00	0.69	19.6	20.0	0.22	0.8	1100
	2, 3, 8, 9	Pump_04	36	6.10	0.085	36.4	20.0	0.40	0.8	1100
	7	Pump_04	36	6.59	0.096	38.2	20.0	0.42	0.8	1100
Ethanol 200 charge pump	ALL	Pump_05	55	0.81	0.008	36.4	20.0	0.29	0.8	789
LCH delivery pump	7, 8, 9	Pump_06	84	92.00	3.51	100.0	20.0	1.10	0.8	1100
Ethanol 200 discharge pump	ALL	Pump_07	80	92.00	0.80	31.7	20.0	0.25	0.8	789
Process Water discharge pump	2	Pump_08	79	92.00	1.597	45.5	20.0	0.50	0.8	1100
	8	Pump_08	79	2.09	0.015	19.1	20.0	0.21	0.8	1100

Compressors

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Design Inlet Flow (m3/h)	Power (kW)	Inlet Pressure (bar)	Outlet Pressure (bar)	ΔP (bar)	Inlet Temp. (°C)	Outlet Temp. (°C)	Efficiency (total)
Propagation aeration blower	ALL	Blow_01	53	1200	18.5	1.01	1.64	0.63	15.0	66.0	0.7
Scrubber blower	ALL	Blow_02	49	950	6.7	1.08	1.35	0.27	33.0	61.0	0.7

Motors

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Power (kW)
Fermenter's agitator	ALL	NA	NA	2.8
Stillage retention tank (ETG) agitator	ALL	NA	NA	ND
Waste CIP retention tank (ETG) agitator	ALL	NA	NA	ND
Stillage retention tank (CRB)	ALL	NA	NA	ND
Waste CIP retention tank (CRB)	ALL	NA	NA	ND

Waste Waters Treatment

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	UnitOP ID	Design Inlet Flow (m3/h)	Inlet Composition	Length (m)	Data for pressure drop calculations
Methanator	2, 3, 8, 9	Methanisation Plant	29-30-32	6.1	Stillage	NA	NA NA
Pipeline to methanisation plant	2, 3, 8, 9	F-34	NA	6.1	Stillage & WCIP	800	ID = 0.1 m; Roughness = 0.000259 m;
LCH delivery pipeline	7, 8, 9	F-10	NA	92	LCH	800	Including 4x gate valves & 6x 90° elbows; 2m elevation
PW delivery pipeline (Meth-CRB)	8	F-36	NA	2.09	PW	800	

5. Analyse Économique³

Connaissant les spécifications des équipements, les flux massiques et énergétiques du procédé LCH, il est possible de mener une analyse économique complète. Le but de cette section est de fournir une analyse de rentabilité du procédé LCH, ainsi qu'une analyse de sensibilité. Celles-ci permettent de conclure sur la viabilité d'un tel procédé à l'échelle industrielle et d'émettre des recommandations spécifiques par rapport aux risques encourus.

L'analyse économique présentée dans ce rapport est basée sur la méthode proposée par Peters et al. (2003). Premièrement, une liste des coûts connexes à l'investissement en capital initial est établie, puis connaissant le coût d'achat de chacun des équipements du procédé, il est possible de calculer le coût total d'investissement (TCI; Total Capital Investment). Deuxièmement, les flux massiques et énergétiques du procédé sont utilisés afin de calculer les coûts opérationnels du procédé (TPC; Total Product Costs). Troisièmement, le TCI et le TPC sont utilisés pour produire un état des résultats et un état des flux de trésorerie. L'état des flux de trésorerie permet de déterminer la rentabilité du procédé selon divers critères, comme le retour sur l'investissement (ROI; Return On Investment). Finalement, l'analyse de sensibilité permet de faire ressortir les coûts critiques du procédé et les risques leur étant associés.

5.1.1. Tableau des bases de calculs concernant le TCI

Le TCI représente la somme de tous les capitaux initiaux à déboursier lors de la construction de l'usine afin de la rendre complètement fonctionnelle. Le Tableau 5.1 présente une liste exhaustive des coûts associés à la construction du procédé LCH.

Tableau 5.1: Répartition des coûts d'investissement en capital requis afin de construire et démarrer le procédé LCH.

Level	Total Capital Investment includes (TCI)	Accronym	Actual Set Point (% of f.o.b.)	Reference
1.2.2	Direct Costs	FCI_DC		
	Equipment (f.o.b.)	C_PE	100.0%	
	Machinery	C_PM	NA	
	Spares	C_spares	3.3%	[Boulet, 2013]
	Storage & Surge Tanks	C_storage	NA	
	Shipping	C_Ship	5.0%	[Peters et al., 2003; Seider et al., 2009] (p.244, 555)
	Installation	C_Inst	34.0%	[Peters et al., 2003] (p.244)

³ Noter que dans cette section, plusieurs des tableaux et des figures sont présentés en anglais. En effet, cette section présente l'analyse économique du procédé de fermentation d'hydrolysats lignocellulosiques à l'échelle industrielle, qui a initialement été rédigée en anglais pour le partenaire industriel Éthanol Greenfield Inc.

	Piping	C_Pip	57.0%	[Peters et al., 2003] (p.245)
	Electrical	C_Elec	20.0%	[Peters et al., 2003] (p.246)
	Initial catalyst	C_Catalyst	NA	
	Control system	C_Cont	16.0%	[Peters et al., 2003] (p.240)
	Process Buildings	C_P-Build	NA	[Peters et al., 2003; Seider et al., 2009] (p.246, 557)
	Non-Process Buildings	C_N-Build	NA	
	Service facilities	C_Serv	6.0%	[Peters et al., 2003] (p.247)
	Site Preparation (Yard Improvements)	C_Site Prep	3.0%	[Peters et al., 2003] (p.246)
	Land	C_Land	NA	
1.2.1	Indirect Costs	FCI_IC		
	Engineering & Supervision	C_Eng	34.0%	
	Construction expenses	C_Const	35.0%	[Peters et al., 2003] (p.249)
	Legal expenses	C_Legal	3.0%	
	Contractor's fee	C_Contractor	13.0%	
	Health, Safety and Environnement functions	C_HSE	2.0%	[Peters et al., 2003] (p.247)
	Contingency	C_Contingency	35.0%	[Peters et al., 2003; Seider et al., 2009] (p.557, 249)
1.2	Fixed Capital Investment	FCI		
1.1	Working Capital Investment	WCI	ND	[Peters et al., 2003; Seider et al., 2009] (p.557, 233)
1	Total Capital Investment	TCI		

Le Tableau 5.1 détaille l'estimation des coefficients qui sont utilisés afin de calculer le TCI à partir des coûts d'achats des équipements (C_PE) obtenus par diverses méthodes. Ce tableau est basé sur la méthodologie de Peters et al. (2003). Les coefficients pour chacun des coûts sont estimés en prenant en compte les plages proposées par ces deux références. Dans le cas où les infrastructures sont déjà en place chez ETG, l'estimation du coefficient s'est faite vers le bas des plages proposées, sinon il s'est fait en utilisant la moyenne. Dans certains cas, il est envisagé que les coûts seront plus hauts que la moyenne. Par exemple, pour la tuyauterie, il est estimé qu'un surplus de tuyauterie sera nécessaire afin de raccorder

le fermenteur à la cuve de mélange déjà présente dans le procédé MG et un autre sera nécessaire afin d'acheminer les gaz produits durant la propagation ou la fermentation vers le procédé MG.

Le Tableau 5.1 montre la liste des coûts directs et indirects, composant le coût en capital fixe (FCI). Noter que, pour cette analyse, les coûts de machinerie et de cuves tampons sont inclus dans les coûts d'équipement. En ce qui concerne le procédé LCH, les coûts de bâtiment et de terrain ne s'appliquent pas puisqu'ils sont déjà existants à l'usine d'ETG. L'estimation du coût en capital d'opération (WCI) représente le fonds de roulement nécessaire au démarrage de l'usine et est estimé ici comme étant l'équivalent de 1 mois en coûts d'opération [Peters et al., 2003; Seider et al., 2009].

5.1.2. Coûts des équipements

Le Tableau 5.2 présente le coût d'achat (C_PE) de chacun des équipements présents dans le procédé LCH, suivant le dimensionnement proposé à la section 4.8.

Tableau 5.2: Coûts d'achat des équipements du procédé LCH.

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	Calculated C_PE (\$CAD)
Fermentation			
Propagator	ALL	<i>Propagator</i>	Included in fermenter
Fermenter	ALL	<i>Fermenter</i>	440,529
Blending			
Blending Tank	ALL	<i>Blend Tank</i>	Exisiting
Ethanol Recovery			
Distillation Column	ALL	<i>Distillation</i>	660,793
Membrane Filtration	ALL	<i>Mem Filt</i>	Included in Distillation
Scrubber	ALL	<i>Scrubber</i>	88,106
Retention Units			
LCH retention tank (CRB)	ALL	<i>RT_LCH</i>	Not Included (CRB)
Stillage retention tank (ETG)	1, 7	<i>RT_Still-a</i>	181,311
	2, 3, 8, 9	<i>RT_Still-a</i>	46,433
Stillage retention tank (CRB)	1, 3, 7, 9	<i>RT_Still-b</i>	Not Included (CRB)
Waste CIP retention tank (ETG)	ALL	<i>RT_WCIP-a</i>	38,951
Waste CIP retention tank (CRB)	1, 3, 7, 9	<i>RT_WCIP-b</i>	Not Included (CRB)
Process Water retention tank (CRB)	2, 8	<i>RT_PW</i>	Not Included (CRB)
Ethanol 200 retention tank (ETG)	ALL	<i>RT_Ethanol</i>	44,477
Heat Exchanger			
Fermentation Main HE	ALL	<i>HE_01</i>	Included in fermenter
Live Steam Injector	ALL	<i>Inject_01</i>	Included in fermenter

Pumps

Fermenter's main pump	ALL	<i>Pump_01</i>	8,255
Blending tank pump	ALL	<i>Pump_02</i>	1,000
Stillage pump	1, 7	<i>Pump_03</i>	1,000
	2, 3, 8, 9	<i>Pump_03</i>	1,000
Waste Waters discharge pump	1	<i>Pump_04</i>	4,398
	2, 3, 8, 9	<i>Pump_04</i>	1,000
	7	<i>Pump_04</i>	1,000
Ethanol 200 charge pump	ALL	<i>Pump_05</i>	1,000
LCH delivery pump	7, 8, 9	<i>Pump_06</i>	4,158
Ethanol 200 discharge pump	ALL	<i>Pump_07</i>	4,581
Process Water discharge pump	2	<i>Pump_08</i>	5,180
	8	<i>Pump_08</i>	1,000

Compressors

Propagation aeration blower	ALL	<i>Blow_01</i>	17,652
Scrubber blower	ALL	<i>Blow_02</i>	Existing

Motors

Fermenter's agitator	ALL	NA	Included in fermenter
Stillage retention tank (ETG) agitator	ALL	NA	Included in Tank cost
Waste CIP retention tank (ETG) agitator	ALL	NA	Included in Tank cost
Stillage retention tank (CRB)	ALL	NA	Included in Tank cost
Waste CIP retention tank (CRB)	ALL	NA	Included in Tank cost

Waste Waters Treatment

Waste Waters treatment plant	2, 3, 8, 9	<i>Biomethanisation Plant</i>	Not Included (Biomethanisation Varennes)
Pipeline to methanisation plant	2, 3, 8, 9	<i>F-34</i>	44,052
LCH delivery pipeline	7, 8, 9	<i>F-10</i>	44,052
PW delivery pipeline (Meth-CRB)	8	<i>F-36</i>	Not Included (CRB)

Le coût d'achat du fermenteur a été fourni par le département d'ingénierie d'ETG sur une base forfaitaire incluant l'échangeur de chaleur et l'injecteur de vapeur. De même, l'estimation pour la purification de l'éthanol inclut les étapes de distillation et de filtration membranaire. Les estimations pour le Scrubber, les pipelines et les cuves tampons sont aussi fournies par le département d'ingénierie d'ETG. Noter que le coût des différentes cuves tampons est obtenu interpolant ou extrapolant sur ces estimations. En effet, le département d'ingénierie estime le coût d'une cuve tampon de 10 m³ à 55 k\$, de 50 m³ à 95 k\$ et de 100 m³ à 190 k\$. En utilisant la règle de mise à l'échelle proposée par Peters et al. (2003) (p.247), il est possible de déterminer le coût de cuves plus ou moins volumineuses en utilisant l'équation suivante :

$$\$_{Cuve\#2} = \$_{Cuve\#1} * \left(\frac{Vol_{Cuve\#2}}{Vol_{Cuve\#1}} \right)^{0.57}$$

Le coût d'achat des pompes est obtenu en utilisant la méthode proposée par Peters et al. (2003) (p.260) (voir équation [21]).

[21]

$$C_P = F_T F_M C_B$$

$$C_B = e^{9.7171 - 0.6019 \ln(S) + 0.0519 [\ln(S)]^2}$$

$$S = Q * H^{0.5}$$

où:

C_P = coût d'achat (C_{PE}) en \$USD année 2006

$F_T = 1$

$F_M = 1$

S = facteur de taille

Q = débit (gpm)

$$H = \text{pression de tête} = \frac{\Delta P \left(\frac{lb_f}{ft^2} \right)}{\rho \left(\frac{lb}{ft^3} \right)}$$

Le coût des soufflantes (blowers) est obtenu en utilisant la méthode proposée par Seider et al. (2009) (p.510, 542, 567, 568).

[22]

$$C_P = F_M C_B$$

$$C_B = e^{6.8929 + 0.7900 \ln(P_C)}$$

$$P_C = 0.00436 \left(\frac{k}{k-1} \right) \frac{Q_I P_I}{n} \left[\left(\frac{P_O}{P_I} \right)^{\frac{k-1}{k}} - 1 \right]$$

où:

C_P = coût d'achat (C_{PE}) en \$USD année 2006

$F_M = 1$ (facteur de correction pour matériel)

n = efficacité totale (moteur + fan) = 70%

k = ratio des chaleurs spécifiques = $\frac{\text{Specific heat}_{outlet}}{\text{Specific heat}_{inlet}}$

Q_I = débit réel de gaz à l'entrée $\left(\frac{ft^3}{min} \right)$

P_O et P_I = pression sortie et entrée, respectivement $\left(\frac{lb_f}{in^2} \right)$

Afin de rapporter les coûts obtenus en \$USD 2006 à un équivalent en \$CAD 2013, un ajustement suivant l'indice « Chemical Engineering Plant Cost Index » est utilisé (équation [23]). L'indice pour l'année 2006 est de 500 ([Seider et al., 2009] p.561) et pour 2013 il est de 590 [Chemical Engineering Magazine, 2013]. En ce qui concerne le taux d'échange USD/CAD, il est posé à 1 :1.

[23]

$$Cost = Base\ Cost \left(\frac{I}{I_{base}} \right)$$

5.2. Tableau des bases de calculs concernant le TPC et les revenus

En utilisant les bilans massiques et énergétiques du procédé LCH, en plus de la cédule cuvée, il est possible de calculer le coût d'opération du procédé. Le tableau de l'Annexe G : Détail des coûts opérationnels et des revenus du procédé LCH) présente en détail les méthodes de calcul des coûts opérationnels de toutes les étapes de production du procédé LCH. De plus, le Tableau 14.2 de l'Annexe G : Détail des coûts opérationnels et des revenus du procédé LCH) détaille les revenus du procédé LCH.

5.3. Analyse économique de base des 6 configurations

Une fois le TCI et le TCP calculés pour chacune des configurations étudiées, il est possible de produire leurs états des résultats et leurs flux de trésorerie sur toute la durée du projet afin de déterminer leur rentabilité et de les comparer. Cette section du rapport présente l'analyse des 6 configurations basées sur le graphique des flux de trésorerie. L'analyse complète, incluant le TCI, le TPC, l'état des résultats et les flux de trésorerie sous forme de tableau détaillé sont présentés à l'Annexe H : Détails des analyses économiques pour les 6 configurations du procédé LCH. Noter que les hypothèses suivantes par rapport au projet doivent être incluses :

1. Taux d'imposition de 29%;
2. Durée du projet de 20 ans, avec la construction de l'usine à l'année 1 et le démantèlement/disposition à l'année 22;
3. Le coût du démantèlement est égal aux profits de revente des équipements usagés après la disposition;
4. L'amortissement des équipements est appliqué à la totalité du FCI, en utilisant un taux de 30% et la règle de la demi-année. L'amortissement présenté est l'amortissement fiscal, la table d'amortissement est présentée à l'Annexe H : Détails des analyses économiques pour les 6 configurations du procédé LCH.

La configuration #1 présuppose un modèle S&H de production des hydrolysats est utilisé, où les eaux usées sont recyclées directement à l'usine de CRB par voie de camions-citernes. La Figure 5.1 montre clairement un déficit de 174 k\$ par année sur la totalité de la vie du projet. Cela est inacceptable d'un point de vue économique : la configuration #1 doit être rejetée, si les hypothèses émises pour y arriver sont jugées adéquates.

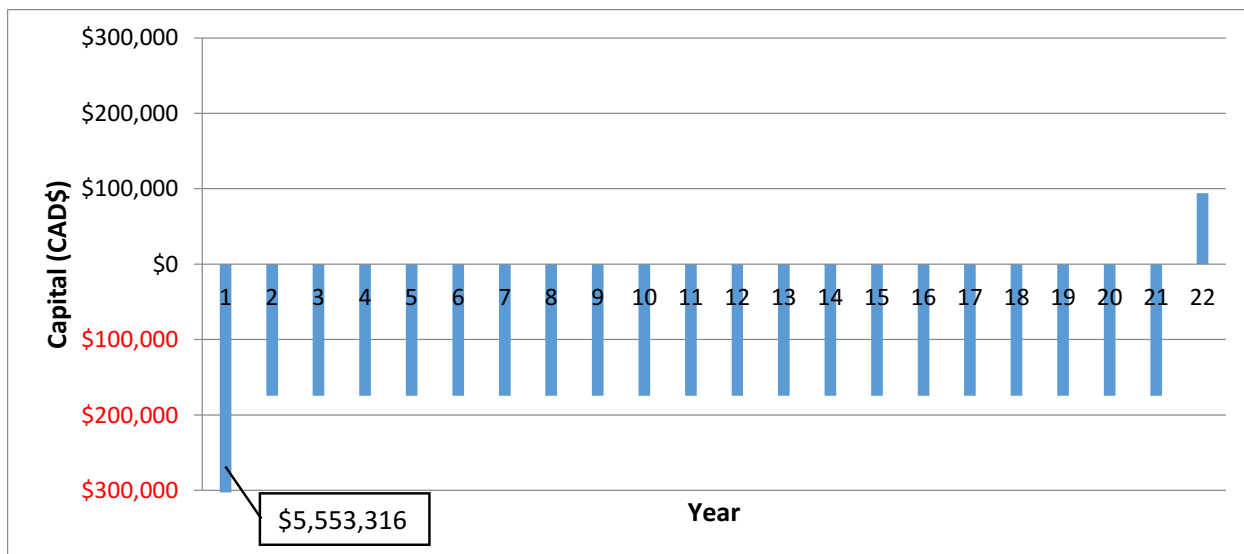


Figure 5.1: Flux de trésorerie de la configuration #1 pour la totalité de vie du projet (22 ans).

La configuration #2 présuppose qu'un modèle S&H de production des hydrolysats est utilisé, où les eaux usées sont traitées à l'usine de Biométhanisation Varennes et où les eaux de procédé sont recyclées à l'usine de CRB par voie de camions-citernes. Suivant ces suppositions, la Figure 5.2 présente les flux de trésorerie pour la configuration #2. L'analyse montre clairement un déficit de 170 k\$ par année sur la totalité de la vie du projet. Cela est inacceptable d'un point de vue économique : la configuration #2 doit être rejetée.

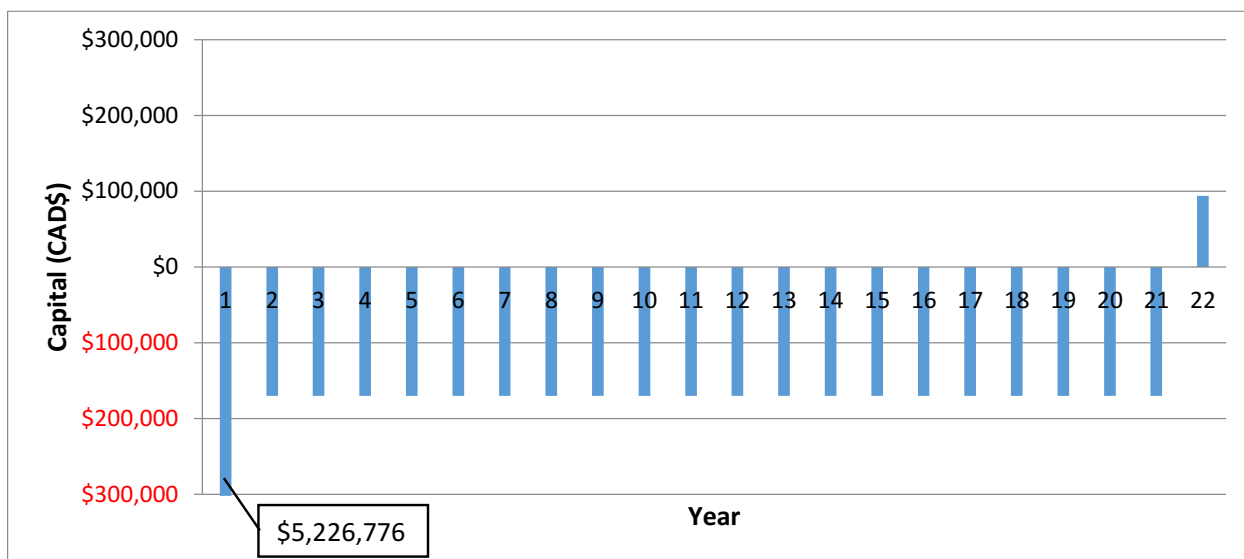


Figure 5.2: Flux de trésorerie de la configuration #2 pour la totalité de vie du projet (22 ans).

La configuration #3 présuppose qu'un modèle S&H de production des hydrolysats est utilisé, où les eaux usées sont traitées à l'usine de Biométhanisation Varennes et où les eaux de procédé ne sont pas recyclées à l'usine de CRB. Suivant ces suppositions, la Figure 5.3 présente les flux de trésorerie pour la configuration

#3. L'analyse montre clairement un déficit de 170 k\$ par année sur la totalité de la vie du projet. Cela est inacceptable d'un point de vue économique : la configuration #3 doit être rejetée.

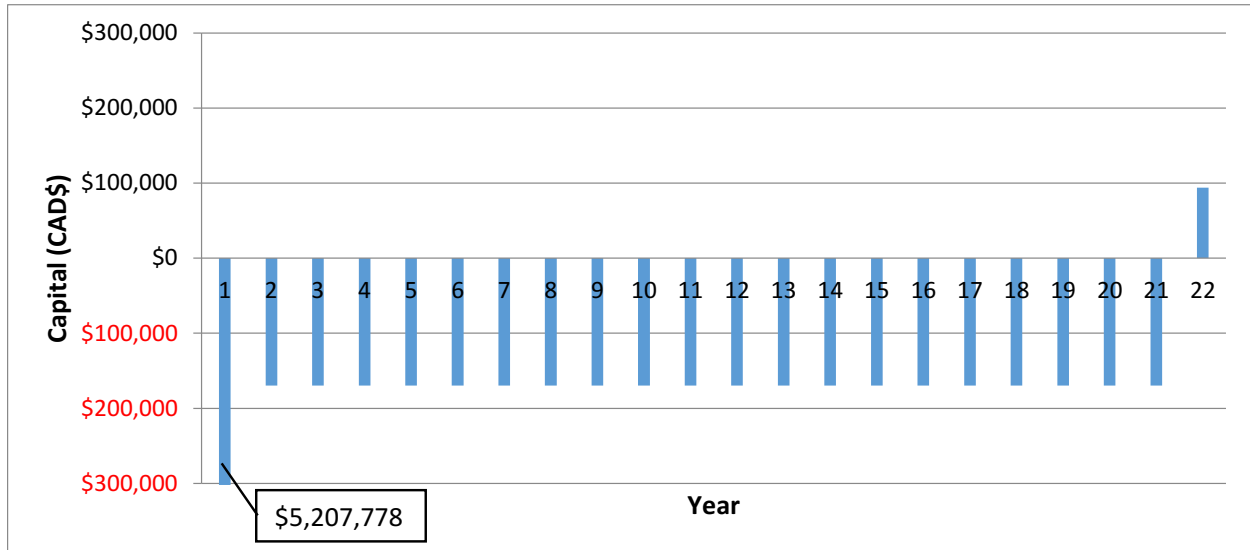


Figure 5.3: Flux de trésorerie de la configuration #3 pour la totalité de vie du projet (22 ans).

La configuration #7 présuppose qu'un modèle Centralisé de production des hydrolysats est utilisé, où les eaux usées sont traitées à l'usine de Biométhanisation Varennes et où les eaux de procédé sont recyclées à l'usine de CRB par voie de pipeline. Suivant ces suppositions, la Figure 5.4 présente les flux de trésorerie pour la configuration #7. L'analyse montre un profit de 137 k\$ par année jusqu'à la 8^e année, suivie d'une baisse progressive jusqu'à atteindre 98 k\$ à la 21^e année (dernière année de production). Cela représente un ROI plus élevé que la totalité de la durée du projet, ce qui signifie aussi que le taux de rendement calculé sur la totalité du projet est négatif (approx. -7.1%) puisque l'investissement initial ne peut pas être récupéré.

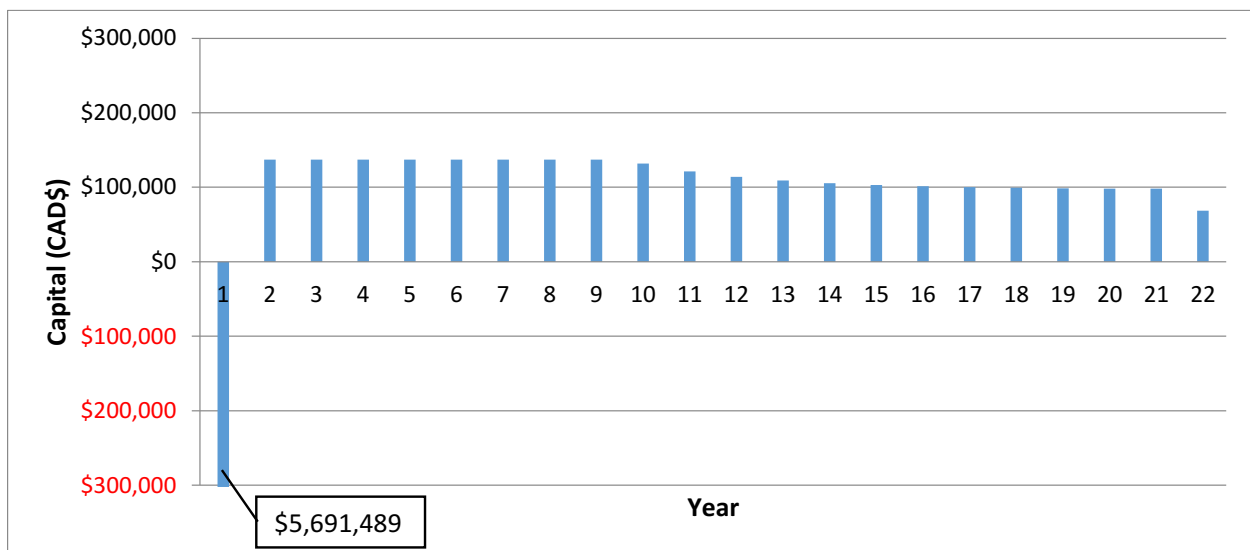


Figure 5.4: Flux de trésorerie de la configuration #7 pour la totalité de vie du projet (22 ans).

La configuration #8 présuppose qu'un modèle Centralisé de production des hydrolysats est utilisé, où les eaux usées sont traitées à l'usine de Biométhanisation Varennes et où les eaux de procédé sont recyclées à l'usine de CRB par voie de pipeline. Suivant ces suppositions, la Figure 5.5 présente les flux de trésorerie pour la configuration #8. L'analyse montre un profit de 142 k\$ par année jusqu'à la 9^e année, suivie d'une baisse progressive jusqu'à atteindre 101 k\$ à la 21^e année (dernière année de production). Cela représente un ROI plus élevé que la totalité de la durée du projet, ce qui signifie aussi que le taux de rendement calculé sur la totalité du projet est négatif (approx. -6.5%) puisque l'investissement initial ne peut pas être récupéré.

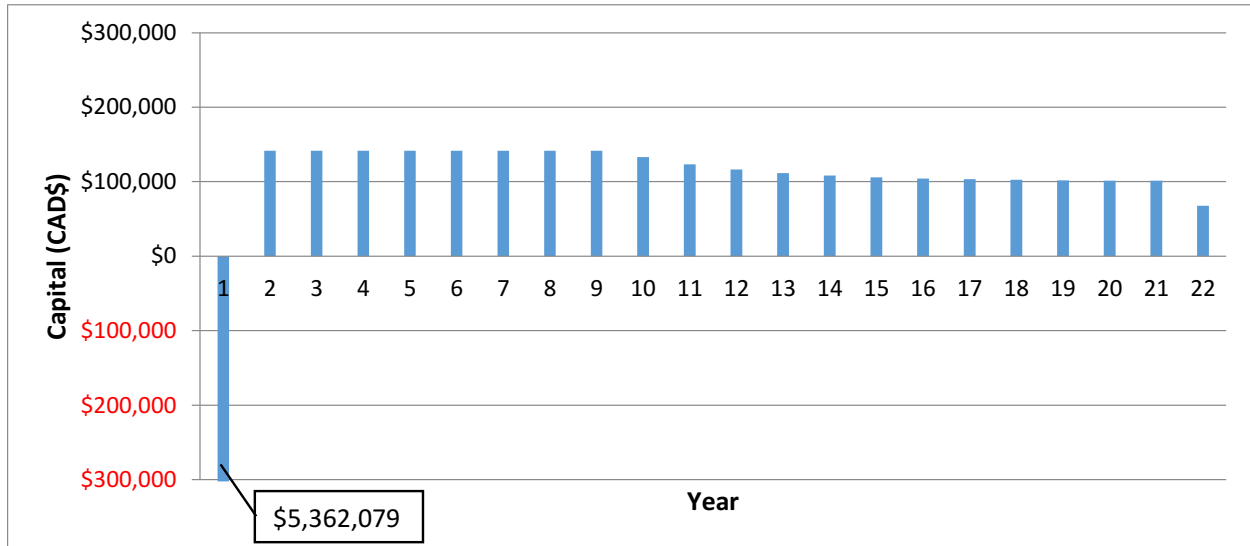


Figure 5.5: Flux de trésorerie de la configuration #8 pour la totalité de vie du projet (22 ans).

La configuration #9 présuppose qu'un modèle Centralisé de production des hydrolysats est utilisé, où les eaux usées sont traitées à l'usine de Biométhanisation Varennes et où les eaux de procédé ne sont pas recyclées à l'usine de CRB. Suivant ces suppositions, la Figure 5.6 présente les flux de trésorerie pour la configuration #9. L'analyse montre un profit de 142 k\$ par année jusqu'à la 9^e année, suivie d'une baisse progressive jusqu'à atteindre 101 k\$ à la 21^e année (dernière année de production). Cela représente un ROI plus élevé que la totalité de la durée du projet, ce qui signifie aussi que le taux de rendement calculé sur la totalité du projet est négatif (approx. -6.5%) puisque l'investissement initial ne peut pas être récupéré.

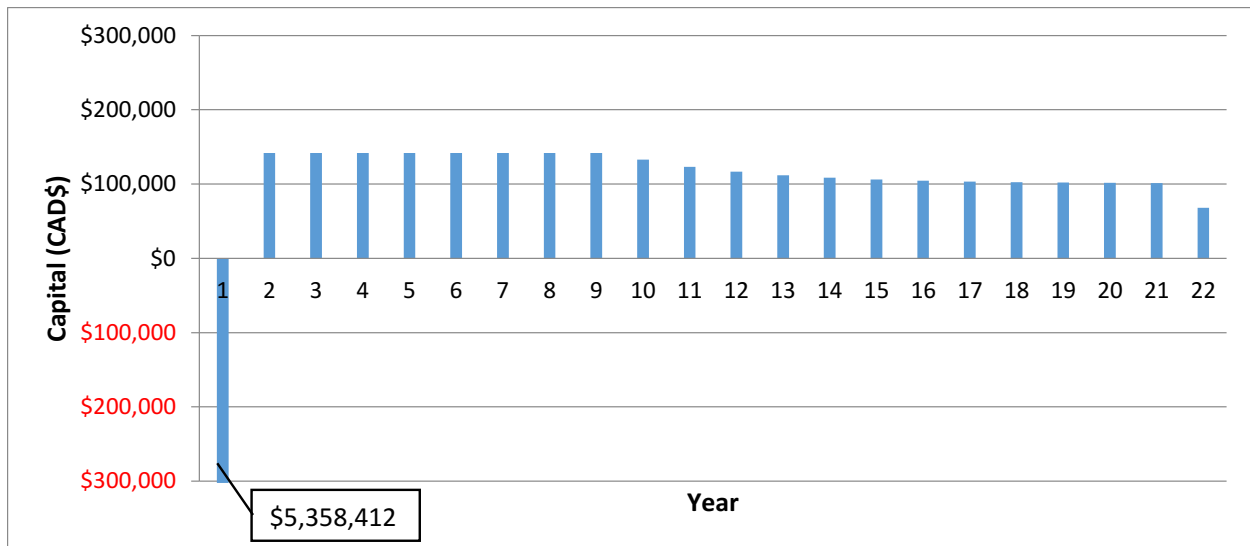


Figure 5.6: Flux de trésorerie de la configuration #9 pour la totalité de vie du projet (22 ans).

5.4. Analyse de sensibilité

Les conclusions de la section 5.3 démontrent la faible rentabilité, ou même le déficit, du procédé LCH à l'étude. Il importe donc d'analyser l'importance des coûts du TPC afin d'émettre des recommandations permettant de réduire les coûts et d'augmenter la rentabilité.

Le Tableau 5.3 détaille les coûts du TPC pour la configuration #2 et offre une mesure de ces coûts en terme de % du TPC total ou encore en terme de % des revenus totaux. Il apparaît que les coûts principaux sont (en ordre décroissant) : le coût d'achat des LCH (42.3% du TPC), le coût d'achat des levures OGM (19.3% du TPC), le coût du transport des LCH (19.1% du TPC) et le coût de transport des eaux de procédé (ou de façon équivalente le transport des eaux usées pour la configuration #1).

Tableau 5.3: Détails des coûts composant le TPC pour la configuration #2 (exprimés en % du TPC total et en % des revenus).

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	As % of TPC	As % of Revenues
1.3.4.7 Raw Material				
Purchase cost of LCH		\$462,828	42.3%	50.1%
LCH transport		\$209,290	19.1%	22.6%
Yeasts (LOGM1)		\$211,560	19.3%	22.9%
Urea		\$3,570	0.3%	0.4%
Yeast Essential Nutrients (YEN)		\$10,017	0.9%	1.1%
Lactrol		\$1,316	0.1%	0.1%
Corn Mash		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.6 Operating Labor		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.5 Operating supervision		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.4 Utilities				
Electricity		\$4,154	0.4%	0.4%
Steam		\$5,146	0.5%	0.6%
Vapor Effect		\$0	0.0%	0.0%
Waste Treatment and Disposal (Stillage)				
<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>		\$0	0.0%	0.0%
<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>		\$104,645	9.6%	11.3%
Water, Process (new)		\$373	0.0%	0.0%
Water, Cooling		\$125	0.0%	0.0%
1.3.4.3 Maintenance & Repairs		\$70,100	6.4%	7.6%
1.3.4.2 Operating supplies				
Acid/Base (pH control)		\$0	0.0%	0.0%
NaOH 50% (CIP)		\$11,550	1.1%	1.2%
1.3.4.1 Laboratory charges		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4 Variable Production costs		\$1,094,674	100.0%	118.4%
1.3.3 Fixed Charges		\$0		
1.3.2 Depreciation (CCA)		ND		
1.3.1 Plant Overhead		\$0		
1.3 Manufacturing costs		\$1,094,674		
1.2 General Expenses		\$0		
1.1 Contingency		ND		
1 Total Product Costs (TPC)		\$1,094,674		

Le Tableau 5.4 détaille les coûts du TPC pour la configuration #8 et offre une mesure de ces coûts en terme de % du TPC total ou encore en terme de % des revenus totaux. Il apparaît que les coûts principaux sont (en ordre décroissant) : le coût d'achat des LCH (59.1% du TPC), le coût d'achat des levures OGM (27% du TPC) et les coûts de maintenance (9.2% du TPC).

Tableau 5.4: Détails des coûts composant le TPC pour la configuration #8 (exprimés en % du TPC total et en % des revenus).

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	As % of TPC	As % of Revenues
1.3.4.7 Raw Material				
	Purchase cost of LCH	\$462,828	59.1%	50.1%
	LCH transport	\$0	0.0%	0.0%
	Yeasts (LOGM1)	\$211,560	27.0%	22.9%
	Urea	\$3,570	0.5%	0.4%
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	\$10,017	1.3%	1.1%
	Lactrol	\$1,316	0.2%	0.1%
	Corn Mash	\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.6 Operating Labor		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.5 Operating supervision		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.4 Utilities				
	Electricity	\$4,150	0.5%	0.4%
	Steam	\$5,146	0.7%	0.6%
	Vapor Effect	\$0	0.0%	0.0%
	Waste Treatment and Disposal (Stillage)			
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	\$0	0.0%	0.0%
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	\$0	0.0%	0.0%
	Water, Process (new)	\$373	0.0%	0.0%
	Water, Cooling	\$125	0.0%	0.0%
1.3.4.3 Maintenance & Repairs		\$72,302	9.2%	7.8%
1.3.4.2 Operating supplies				
	Acid/Base (pH control)	\$0	0.0%	0.0%
	NaOH 50% (CIP)	\$11,550	1.5%	1.2%
1.3.4.1 Laboratory charges		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4 Variable Production costs		\$782,936	100.0%	84.7%
1.3.3 Fixed Charges		\$0		
1.3.2 Depreciation (CCA)		ND		
1.3.1 Plant Overhead		\$0		
1.3 Manufacturing costs		\$782,936		
1.2 General Expenses		\$0		
1.1 Contingency		ND		
1 Total Product Costs (TPC)		\$782,936		

La décortication des coûts offerts par les 2 tableaux ci-dessus montre l'importance d'éliminer les coûts de transport par camionnage en construisant l'usine de CRB sur le même site que le procédé de fermentation LCH. De plus, il ressort que le coût d'achat des levures OGM est très élevé par rapport à ce qu'il représente dans une distillerie maïs-grain conventionnelle. Par exemple, le coût d'achat des levures représente environ 0.044% des revenus totaux pour le procédé MG d'ETG (voir Tableau 5.5). En effet, cela est possible, non seulement dû au fait que les levures conventionnelles sont moins dispendieuses (approx. 6.85 \$/kg vs 34.25 \$/kg), mais surtout dû au fait que le moût de maïs ne contient pas d'inhibiteurs de croissance cellulaire comme les LCH. Conséquemment, les levures se reproduisent beaucoup plus

rapidement et leur métabolisme est beaucoup plus rapide que celui retrouvé chez LOGM1 lors de la fermentation de LCH. Cela permet de réduire considérablement la concentration initiale en levure dans la fermentation. Par exemple, dans le procédé MG d'ETG, un total de 0.01 kg_{levures}/m³ est requis dans la fermentation, contrairement à 0.56 kg_{levures}/m³ dans le procédé LCH (voir Tableau 5.5). Sachant que le coût d'achat de LOGM1 est aussi élevé dans ce procédé, il pourrait devenir plus économique d'investir dans des technologies efficaces de détoxification des LCH.

Le coût opérationnel le plus important reste l'achat des LCH. À 49.8% des revenus totaux, le coût d'achat des LCH est moins élevé que celui du maïs-grain dans le procédé MG d'ETG. En effet, l'achat du maïs représente près de 80% des revenus totaux dans le procédé MG. Cela représente une nette diminution, mais dans l'optique où le procédé de fermentation des LCH ne génère qu'une seule source appréciable de revenu, l'éthanol, cela reste élevé. En effet, le procédé MG a l'avantage de produire une panoplie de produits : l'éthanol, les drêches, le CO₂ et l'huile de maïs. Conséquemment, bien que le maïs représente 80% des revenus totaux, sur une base volumique équivalente, les revenus du procédé MG sont nettement plus élevés que ceux du procédé LCH : 150 vs 73 \$_{de revenus} / m³_{de fermentation} (voir Tableau 5.5).

Tableau 5.5: Analyse des coûts opérationnels et des revenus du procédé MG, rapportés en \$/m³ de volume de fermentation.

Analyse des coûts et revenus du procédé MG

Substance	Commentaire	Consigne		Prix d'achat ou de vente		Coûts opérationnels ou revenus	
Levures	Consigne = 20 kg _{levures} / 1945 m ³ _{fermentation}	0.0103	kg _{levures} /m ³ _{ferm}	6.34	\$/kg	0.0652	\$/m ³ _{ferm}
Maïs-grain	Consigne = 32% maïs / m ³ de mout	320.0	kg _{maïs} /m ³ _{ferm}	380.00	\$/ton	121.6	\$/m ³ _{ferm}
Éthanol	Production d'une bière à 13.5% d'éthanol m/v	137.0	kg _{ethanol} /m ³ _{ferm}	0.70	\$/L	121.5	\$/m ³ _{ferm}
Drêches de distillerie (DDGS)	Mout composé de 32% de maïs et un taux de récupération des drêches de 29%. Donc 320 kg _{maïs} / m ³ _{ferm} * 29% = 92.8 kg _{DDGS} / m ³ _{fermentation}	92.8	kg _{DDGS} /m ³ _{ferm}	280.00	\$/ton	26.0	\$/m ³ _{ferm}
CO ₂	Production de CO ₂ approx. équivalente à la prd d'éthanol sur une base massique	135.0	kg _{CO2} /m ³ _{ferm}	16.00	\$/ton	2.2	\$/m ³ _{ferm}
Total des revenus du procédé MG (\$/m ³ _{ferm})		149.7					
Coûts du maïs en % des revenus totaux		81.2%					
Coûts des levures en % des revenus totaux		0.044%					

Tableau 5.6: Analyse des coûts opérationnels et revenus du procédé LCH, rapportés en \$/m³ de volume de fermentation.

Analyse des coûts et revenus du procédé LCH

Volume total de fermentation	Supposant 1.465 m ³ /h de <i>F-Broth</i> (Tableau 11.1 flux #19) et 8305 h d'opération par an	12167	m ³ _{ferm} /an
Revenus	Supposant un revenu annuel brut de 929,283 \$ (voir section 5.2)	929283	\$/an
Total des revenus du procédé LCH (\$/m ³ _{ferm})		76.4	

5.5. Analyse de mise à l'échelle 100x du procédé LCH

Il importe aussi d'analyser l'impact économique d'une potentielle mise à l'échelle du procédé LCH. En effet, l'échelle étudiée dans ce rapport est très petite en comparaison aux distilleries conventionnelles. Par exemple, le procédé MG d'ETG opère présentement en procédé semi-continu grâce à 4 fermenteurs de près de 2000 m³ chacun et un temps de fermentation de 60h. Ainsi, la distillerie d'ETG a un volume actif de 8000 m³, soit 32x plus que le procédé LCH décrit ici.

Par le fait même, si le volume de fermentation du procédé LCH est augmenté, il est maintenant recommandable d'opérer avec plus d'un fermenteur afin d'atteindre un mode d'opération semi-continu. Dans ce mode, tous les équipements connexes aux fermenteurs (cuves de rétention, colonne à distiller, pompes, etc.) gardent la même capacité nominale que s'il n'y avait qu'un seul fermenteur, puisque les multiples fermenteurs sont opérés un à la suite de l'autre, donnant une allure de procédé en continu. De plus, un autre facteur améliorant la rentabilité à une plus large échelle est le fait que le prix des équipements n'est pas directement proportionnel à la mise à l'échelle. Effectivement, une règle du pouce souvent empruntée en ingénierie est la suivante [Peters et al., 2003] (p.247) :

$$\text{\$}_{\text{Équipement } B} = \text{\$}_{\text{Équipement } A} * \left(\frac{\text{Capacité de } B}{\text{Capacité de } A} \right)^{0.6}$$

Dans cette optique, il est possible d'augmenter la capacité du procédé LCH en ajoutant simplement plus de fermenteurs. En supposant que l'on ajoute 3 fermenteurs au procédé LCH, la capacité s'en trouve quadruplée, mais l'impact sur le TCI n'est pas proportionnel. Le premier impact majeur sur la configuration des équipements est que la capacité de la colonne à distiller devra être augmentée afin de permettre aux 4 fermenteurs de travailler en mode semi-continu. Le deuxième impact majeur est qu'une nouvelle cuve de rétention massive devra être ajoutée entre les fermenteurs et la colonne à distiller afin de permettre aux fermenteurs de se vider sans dépasser la capacité de la colonne à distiller. D'autres subtilités pourraient être nécessaires afin de permettre une telle mise à l'échelle, mais il est supposé raisonnable, qu'aux fins de cette analyse, ces autres changements auront des impacts négligeables sur le TCI du procédé de mis à l'échelle.

Les coûts de production se comportent différemment face à une mise à l'échelle. En effet, les coûts des matières premières suivent de façon linéaire l'échelle du procédé, mais cela ne s'applique pas aux coûts de main-d'œuvre, de supervision, d'utilités et de maintenance. En ce qui concerne le procédé LCH, une augmentation de la capacité aura aussi comme effet d'augmenter drastiquement les coûts énergétiques et les coûts de main-d'œuvre. En effet, une des hypothèses majeures dans ce rapport était que l'énergie requise par la colonne à distiller provenait d'un trop plein d'énergie du procédé MG d'ETG. Or, lorsque la capacité du procédé LCH augmente, cette hypothèse ne tient plus et il est nécessaire d'ajouter les coûts énergétiques liés à l'achat de gaz naturel permettant de fournir en énergie la colonne à distiller. Une approximation pouvant être utilisée est que l'énergie de distillation requise dans une distillerie conventionnelle est d'environ 25 kBTU/Gal d'éthanol purifié [Ingledew et al., 2009]. Quant aux coûts de main-d'œuvre, il serait nécessaire d'estimer combien de personnes seraient requises afin d'opérer ce procédé. Or, ce chiffre dépend de la capacité du procédé et doit être déterminé en tenant compte du nombre d'équipements, de la capacité et du degré d'automatisation [Peters et al., 2003].

Afin d'estimer quel serait l'impact d'une mise à l'échelle du procédé LCH, un facteur de 100x est proposé. Cela amènerait la production annuelle d'éthanol du procédé LCH dans la même plage que celle des distilleries de maïs-grain conventionnelles en Amérique du Nord (approximativement 40 millions de gallons d'éthanol par années). À cette fin, les hypothèses suivantes sont posées :

1. Une mise à l'échelle de 100x de la capacité du procédé LCH, soit 63 450 m³/an (1269*50; voir section 4.6.1);
2. Une configuration du procédé LCH où 4 fermenteurs coopèrent afin d'obtenir un procédé semi-continu;
3. Une telle configuration demande une cuve de rétention additionnelle entre les fermenteurs et la colonne à distiller. Cette cuve a un volume et un coût d'achat identique aux 4 autres fermenteurs;
4. La colonne à distiller demande sa propre alimentation en vapeur vive car elle ne pourra plus compter sur l'apport en *Vapor Effect* du procédé MG d'ETG. La demande énergétique est prise comme étant 25 kBTU/Gal d'éthanol purifié [Ingledew et al., 2009];
5. Une équipe composée de 30 employés opérant en cédules de 12h est estimée, et le salaire est assumé être 40 \$/h (incluant tous les bénéfices) (section 5.1.1).
6. Tous les autres paramètres utilisés sont ceux de la configuration #8 (la plus rentable) et sont supposés suivre la mise à l'échelle de façon linéaire ou suivant la règle du 0.6.

Afin de calculer le nouveau TCI du procédé LCH 100x, la règle de mise à l'échelle utilisant un exposant de 0.6 est appliquée au coût d'achat des équipements (f.o.b.) :

$$f.o.b._{100x} = f.o.b._{1x} * \left(\frac{25}{1}\right)^{0.6}$$

Noter que le facteur de 25 provient du fait qu'il y a maintenant 4 fermenteurs dans le procédé au lieu d'un seul (100/4 = 25). Ainsi, en ajoutant 3 fermenteurs et 1 cuve de rétention au procédé LCH de la configuration #8, le f.o.b. des équipements augmente de 1 446 037 \$ à 3 208 152 \$. Cela permet maintenant de calculer le nouveau f.o.b. des équipements du procédé LCH 100x

$$f.o.b._{100x} = 3\,208\,152\$ * \left(\frac{25}{1}\right)^{0.6} = 22\,131\,912\$$$

Le f.o.b. du procédé LCH 100x est utilisé afin de calculer le TCI, suivant la méthodologie présentée dans la section 5.3.

Tableau 5.7: Détails du calcul du TCI du procédé LCH mise à l'échelle 100x.

Level	Total Capital Investment (TCI)	Chosen SP (% of f.o.b.)	Actual (\$CAD)
1.2.2	Direct Costs		
	Equipment (f.o.b.)	100.0%	\$22,131,912
	Sapres	3.3%	\$730,353
	Shipping	5.0%	\$1,106,596
	Installation	34.0%	\$7,524,850
	Piping	57.0%	\$12,615,190
	Electrical	20.0%	\$4,426,382
	Instrumentation & Control system	16.0%	\$3,541,106
	Service facilities	6.0%	\$1,327,915
	Site Preparation & Yard Improvements	3.0%	\$663,957
1.2.1	Indirect Costs		
	Engineering & Supervision	34.0%	\$7,524,850
	Construction expenses	35.0%	\$7,746,169
	Legal expenses	3.0%	\$663,957
	Contractor's fee	13.0%	\$2,877,149
	Health, Safety and Environnement functions	2.0%	\$442,638
	Contingency	35.0%	\$7,746,169
1.2	Fixed Capital Investment (FCI)		\$81,069,194
1.1	Working Capital Investment (WCI)	1/12*TCP	\$65,245
1	Total Capital Investment (TCI)		\$81,134,438

Les revenus du procédé LCH 100x sont simplement extrapolés de façon linéaire en appliquant un facteur de 100x.

Tableau 5.8: Détails des revenus du procédé LCH mis à l'échelle 100x.

Level	Revenues includes	Value	Unit	Production	Unit	Revenues (\$/yr)
1.2	Ethanol	0.70	\$/L	1299	m3/yr	\$90,908,810
1.1	CO2	16.00	\$/ton	972	tons/yr	\$1,555,162
1	Revenues					\$92,463,972

Par la suite, le TPC doit aussi être calculé, mais en plus d'ajuster linéairement les coûts de matières premières et des utilités, il faut ajouter les nouveaux coûts énergétiques de la colonne à distiller et de main-d'œuvre :

$$\begin{aligned}
 & \text{Coût énergétiques de la colonne à distiller } \left(\frac{\$}{\text{an}} \right) \\
 &= 25000 \frac{\text{BTU}}{\text{Gal}} * 264.172 \frac{\text{Gal}}{\text{m}^3} * \frac{1 \text{ GJ}}{947817.1 \text{ BTU}} * 1269 \frac{\text{m}^3}{\text{an}} * 100 * 6 \frac{\$}{\text{GJ}} * \frac{1}{0.85} \\
 &= 6\,241\,603 \frac{\$}{\text{an}}
 \end{aligned}$$

$$\text{Coûts de la main – d'oeuvre } \left(\frac{\$}{\text{an}} \right) = 15 \text{ employés} * \frac{40 \$}{\text{h} * \text{employé}} * 8736 \frac{\text{h}}{\text{an}} = 5\,241\,600 \frac{\$}{\text{an}}$$

Ces nouvelles valeurs sont utilisées afin de calculer le TPC du procédé LCH 100x suivant la méthodologie présentée dans la section 5.2.

Tableau 5.9: Détails d calcul d TPC du procédé LCH 100x.

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	As % of TPC	As % of Revenues
1.3.4.7 Raw Material				
Purchase cost of LCH		\$46,282,769	51.6%	50.1%
LCH transport		\$0	0.0%	0.0%
Yeasts (LOGM1)		\$21,155,987	23.6%	22.9%
Urea		\$357,036	0.4%	0.4%
Yeast Essential Nutrients (YEN)		\$1,001,738	1.1%	1.1%
Lactrol		\$131,570	0.1%	0.1%
Corn Mash		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.6 Operating Labor		\$5,241,600	5.8%	5.7%
1.3.4.5 Operating supervision		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4.4 Utilities				
Electricity		\$414,984	0.5%	0.4%
Steam		\$6,756,156	7.5%	7.3%
Vapor Effect		\$0	0.0%	0.0%
Waste Treatment and Disposal (Stillage)				
<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>		\$0	0.0%	0.0%
<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>		\$0	0.0%	0.0%
Water, Process (new)		\$37,345	0.0%	0.0%
Water, Cooling		\$12,456	0.0%	0.0%
1.3.4.3 Maintenance & Repairs		\$7,230,186	8.1%	7.8%
1.3.4.2 Operating supplies				
Acid/Base (pH control)		\$0	0.0%	0.0%
NaOH 50% (CIP)		\$1,155,000	1.3%	1.2%
1.3.4.1 Laboratory charges		\$0	0.0%	0.0%
1.3.4 Variable Production costs		\$89,776,828	100.0%	97.1%
1.3.3 Fixed Charges		\$0		
1.3.2 Depreciation (CCA)		ND		
1.3.1 Plant Overhead		\$0		
1.3 Manufacturing costs		\$89,776,828		
1.2 General Expenses		\$0		
1.1 Contingency		ND		
1 Total Product Costs (TPC)		\$89,776,828		

En analysant les résultats de la mise à l'échelle présentés dans le Tableau 5.9 (Détails du calcul des TPC du procédé LCH 100x)), il apparaît que la mise à l'échelle n'augmente pas la rentabilité du procédé LCH. En effet, la mise à l'échelle augmente le TPC de 84.7% à 97.1% des revenus. Cela est principalement dû au fait que l'augmentation de la capacité du procédé annule les synergies qui étaient possibles entre le procédé MG d'ETG et le procédé LCH. Néanmoins, ces résultats ne sont pas surprenants. En effet, il est connu que, pour une distillerie de MG conventionnelle, les ventes d'éthanol permettent approximativement de couvrir les coûts d'exploitation (TPC) et que la vente des co-produits (drêches, huile de maïs et CO₂) représente le réel profit de la distillerie. Or, c'est ce que l'on remarque ici en montrant que, dans un procédé LCH à échelle industrielle, le seul revenu est l'éthanol (le CO₂ étant

négligeable) et ce revenu peine à couvrir les coûts d'exploitation. Afin d'améliorer ce bilan financier, 2 points sont cruciaux :

- 1) Les performances et le coût d'achat des levures OGM doivent être revus. En effet, à 22.9% des revenus, le coût des levures est un point crucial d'optimisation. Cette optimisation peut se faire sur 3 plans : passant soit par la diminution du coût d'achat (\$/kg) et/ou par l'augmentation de la productivité des levures et/ou par l'augmentation du taux de croissance des levures.
- 2) La diminution du coût d'achat des LCH est aussi une avenue potentielle d'augmentation drastique de la rentabilité du procédé LCH. En effet, la biomasse lignocellulosique promet plusieurs co-produits à haute valeur ajoutée autre que l'éthanol. Des produits dérivés de la lignine ou encore des produits pharmaceutiques extraits des plantes avant leur utilisation comme matière première pour l'éthanol cellulosique sont deux avenues possibles qui permettraient potentiellement de baisser les coûts associés à l'achat des LCH.

5.6.Limites du modèle

La simulation développée et présentée dans cette section repose sur plusieurs hypothèses fournies dans les différents tableaux. Plusieurs limites de ce modèle peuvent être relevées et devraient être prises en compte afin de tirer des conclusions éclairées :

- ✓ Les détails entourant l'équipement et la technologie de filtration membranaire sont encore flous. Les coûts réels d'opération et d'entretien sont inconnus, et ils n'ont donc pas été inclus dans cette analyse;
- ✓ Une hypothèse importante est que le Vapor Effect est un résidu énergétique du procédé MG revalorisé dans le procédé LCH. Or, ceci est une condition unique à ETG, et normalement il peut être estimé que la vapeur alimentant la colonne à distiller ne sera pas sans coûts;
- ✓ Certains coûts considérés négligeables n'ont pas été estimés :
 - Coûts additionnels de gaz naturel dû à l'air envoyé à l'oxydateur thermique (T.O.) durant la propagation;
 - Coûts de pompage des eaux de refroidissement;
 - Coûts énergétiques des agitateurs des réservoirs tampons;
 - Coûts énergétiques du traçage électrique;
 - Coûts en eau du nouveau scrubber et coûts additionnels de distillation de l'effluent du nouveau scrubber.
- ✓ Les subventions gouvernementales n'ont pas été prises en compte mais elles auront un impact appréciable et positif sur les revenus du procédé LCH.

6. Conclusion et recommandations du projet de recherche

Ce rapport conclut le projet de recherche de maîtrise sur l'optimisation de la production d'éthanol lignocellulosique. Une revue de la littérature a été faite, rapportant l'état des connaissances dans les domaines de la structure de la lignocellulose, des microorganismes capables de fermenter les hydrolysats provenant de cette matière et les dernières avancées du génie génétique afin d'obtenir des biocatalyseurs plus efficaces. Le principal défi à relever par la communauté scientifique reste la création d'une souche microbienne capable d'une co-fermentation rapide et efficace des pentoses et des hexoses dérivés de la lignocellulose. Certains microorganismes génétiquement modifiés semblent avoir des performances adéquates pour les demandes d'un procédé de co-fermentation industrielle, telle que la souche LOGM1 utilisée durant ce projet de recherche. LOGM1 présente des performances supérieures à ce qui est retrouvé dans la littérature. Par contre, cette souche est grandement affectée par les inhibiteurs des LCH, tels que l'acide acétique et le 5-HMF. De plus, son taux de croissance est inférieur à ceux des levures conventionnelles, d'où l'importance d'opérer une étape de propagation bien optimisée augmentant la vitalité et la concentration cellulaire. Il a été montré que les hydrolysats lignocellulosiques produits par CRB via un procédé thermo-chimique contiennent jusqu'à ce jour une panoplie d'inhibiteurs cellulaires qui réduisent énormément les performances de LOGM1. Néanmoins, en supposant que CRB soit capable de réduire leur teneur en inhibiteurs dans le futur, les cinétiques métaboliques de LOGM1 dans des milieux synthétiques modèles ont aussi été investiguées dans cette étude afin de fournir les données de flux métaboliques de base pour la modélisation d'un futur procédé à l'échelle industrielle.

Une analyse technico-économique d'un procédé de fermentation de LCH ayant comme base un fermenteur d'un volume de 250 kL a été effectuée. Cela a été fait conjointement avec le partenaire industriel Éthanol Greenfield Varennes afin de lui fournir des informations préliminaires sur les coûts et les performances. En utilisant les données de cinétique réactionnelle obtenues durant la phase de tests en laboratoire, ainsi qu'un logiciel de simulation de procédés chimiques, le procédé à l'échelle industrielle a été simulé. Les résultats démontrent une rentabilité très faible suivant les hypothèses posées dans ce rapport : un ROI de plus de 20 ans, avec un rendement effectif de -6.5% sur la vie du projet. En effet, la difficulté d'un procédé de fermentation des LCH est qu'il n'y a qu'une source unique de revenus, soit l'éthanol, et que les coûts opérationnels sont très élevés. Les coûts d'achats des levures génétiquement modifiées et de la matière première représentent plus de 87% des revenus générés par la vente d'éthanol. Afin de rendre un tel procédé rentable, il est nécessaire de diminuer le coût de la matière première, soit les LCH, et d'augmenter la rapidité de LOGM1 à fermenter le xylose.

7. Bibliographie

- Agrawal, M., Mao, Z. et Chen, R. R. (2011). Adaptation yields a highly efficient xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain. *Biotechnology and bioengineering*, volume 108, numéro 4, p. 777-785.
- Alen, R. (2000). Structure and chemical composition of wood. Dans *Section Title: Cellulose, Lignin, Paper, and Other Wood Products*, volume 3p. 11-57.
- Almeida, J. R. M., Modig, T., Petersson, A., Haehn-Haegerdal, B., Liden, G. et Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, volume 82, numéro 4, p. 340-349.
- Alterthum, F. et Ingram, L. O. (1989). Efficient ethanol production from glucose, lactose, and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 55, numéro 8, p. 1943-1948.
- Attfield, P. V. et Bell, P. J. L. (2006). Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. *FEMS Yeast Research*, volume 6, numéro 6, p. 862-868.
- Axe, D. D. et Bailey, J. E. (1995). Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, volume 47, numéro 1, p. 8-19.
- Azhar, A. F., Bery, M. K., Colcord, A. R., Roberts, R. S. et Corbitt, G. V. (1981). Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolyzate. *Biotechnology and bioengineering symposium*, volume 11, numéro Symp. Biotechnol. Energy Prod. Conserv., 3rd., p. 293-300.
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, volume 52, numéro 2, p. 858-75.
- Banerjee, S., Archana, A. et Satyanarayana, T. (1994). Xylose metabolism in a thermophilic mold *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* TMD-8. *Current microbiology*, volume 29, numéro 6, p. 349-352.
- Berberi, V. (2013). *Estimation offerte par le département technique de CRB Inc.* CRB Inc., Montreal,
- Bertilsson, M., Olofsson, K. et Liden, G. (2009). Prefermentation improves xylose utilization in simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated spruce. *Biotechnology for Biofuels*, volume 2,
- Boulet, A. (2013). *Estimations offertes par le département d'ingénierie d'Éthanol Greenfield.* Éthanol Greenfield Varennes Inc., Varennes,
- Brillouet, J. M., Joseleau, J. P., Utille, J. P. et Lelievre, D. (1982). Isolation, purification and characterization of a complex heteroxyylan from industrial wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volume 30, numéro 3, p. 488-495.
- Brown, M. H. et Booth, I. R. (1991). *Food Preservatives*, 3 édition. Blackie and son, Glasgow/London,

- Bruinenberg, P. M., De Bot, P. H. M., Van Dijken, J. P. et Scheffers, W. A. (1983). The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 18, numéro 5, p. 287-292.
- Bruinenberg, P. M., De Bot, P. H. M., Van Dijken, J. P. et Scheffers, W. A. (1984). NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 19, numéro 4, p. 256-260.
- Bruinenberg, P. M., Van Dijken, J. P. et Scheffers, W. A. (1983). An enzymic analysis of NADPH production and consumption in *Candida utilis*. *Journal of general microbiology*, volume 129, numéro 4, p. 965-971.
- Buchholz, S. E., Dooley, M. M. et Eveleigh, D. E. (1987). *Zymomonas* - an alcoholic enigma. *Trends in biotechnology*, volume 5, numéro 7, p. 199-204.
- Cannizzaro, C., Valentinotti, S. et Von Stockar, U. (2004). Control of yeast fed-batch process through regulation of extracellular ethanol concentration. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, volume 26, numéro 6, p. 377-383.
- Cardona, C. A. et Sanchez, O. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource technology*, volume 98, numéro 12, p. 2415-2457.
- Carpita, N. C. et Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, volume 3, numéro 1, p. 1-30.
- Chan, P. S., Soucy, G. et Yargeau, V. (2009). *Analyse Économique en Ingénierie*, 2 édition. ERPI, Quebec, 1080 p.
- Chang, Y., Chang, K., Huang, C., Hsu, C. et Jang, H. (2012). Comparison of batch and fed-batch fermentations using corncob hydrolysate for bioethanol production. *Fuel*, volume 97, p. 166-173.
- Chemical Engineering Magazine (2013). Plant Cost Index. Dans <http://www.che.com/pci/> (page consultée le 05 2013).
- Chen, W. (1980). Glucose isomerase (a review). *Process Biochemistry (Rickmansworth, United Kingdom)*, volume 15, numéro 6, p. 36-41.
- Chiang, C. et Knight, S. G. (1959). D-Xylose metabolism by cell-free extracts of *Penicillium chrysogenum*. *Biochimica et biophysica acta*, volume 35, p. 454-463.
- Cirillo, V. P. (1968). Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Nonmetabolized sugars as substrates and inducers of the galactose transport system. *Journal of Bacteriology*, volume 95, numéro 5, p. 1727-1731.
- Clark, T. A. et Mackie, K. L. (1984). Fermentation inhibitors in wood hydrolyzates derived from the softwood *Pinus radiata*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Biotechnology*, volume 34B, numéro 2, p. 101-110.

- CNW TELBEC Inc. (2012-02-06 2012). Enerkem et Éthanol GreenField annoncent la première usine de production de biocarburants à partir de déchets du Québec. Dans <http://cnw.ca/273b> (page consultée le 04/24 2012).
- Corcus, P. (2013). *Résultats expérimentaux présentés dans ce rapport*. Université de Sherbrooke, Montreal,
- D'Aoust, F. (2013). *Estimations offertes par Lallemand Inc.* Lallemand Inc., Montreal,
- De Vries, R. P. et Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, volume 65, numéro 4, p. 497-522.
- Delgenes, J. P., Moletta, R. et Navarro, J. M. (1986). The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters*, volume 8, numéro 12, p. 897-900.
- Delgenes, J. P., Moletta, R. et Navarro, J. M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and microbial technology*, volume 19, numéro 3, p. 220-225.
- Deng, X. X. et Ho, N. W. Y. (1990). Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 24-25, p. 193-199.
- Diaz de Villegas, M. E., Villa, P., Guerra, M., Rodriguez, E., Redondo, D. et Martinez, A. (1992). Conversion of furfural into furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae* 354. *Acta Biotechnologica*, volume 12, numéro 4, p. 351-354.
- Dick, D. (2013-04-10). *Estimation offerte par Dennis Dick, Manager Methanator Services, ICM Inc.* Montreal,
- Dien, B. S., Nichols, N. N., O'Bryan, P. J. et Bothast, R. J. (2000). Development of new ethanologenic *Escherichia coli* strains for fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 84-86, p. 181-196.
- DiMarco, A. A. et Romano, A. H. (1985). D-Glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 49, numéro 1, p. 151-157.
- Does, A. L. et Bisson, L. F. (1989). Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 55, numéro 1, p. 159-164.
- du Preez, J. C. (1994). Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and microbial technology*, volume 16, numéro 11, p. 944-956.
- Du Preez, J. C., Van Driessel, B. et Prior, B. A. (1989). Fermentation of D-xylose by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels. *Yeast*, volume 5, numéro Spec. Issue, p. S129-S130.
- Dumon, C., Song, L., Bozonnet, S., Faure, R. et O'Donohue, M. J. (2012). Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. *Process Biochemistry*, volume 47, numéro 3, p. 346-357.

- Dunlop, A. P. (1948). Furfural formation and behavior. *Industrial and Engineering Chemistry*, volume 40, p. 204-209.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z. et Heinze, T. (2005). Hemicellulose. *Advances in Polymer Science*, volume 186, numéro Polysaccharides I, p. 1-67.
- Eliasson, A., Hofmeyr, J. -. S., Pedler, S. et Hahn-Hagerdal, B. (2001). The xylose reductase/xylytol dehydrogenase/xylokinase ratio affects product formation in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, volume 29, numéro 4-5, p. 288-297.
- Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F. et Hahn-Hagerdal, B. (2000). Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 66, numéro 8, p. 3381-3386.
- Feldmann, S. D., Sahm, H. et Sprenger, G. A. (1992). Pentose metabolism in *Zymomonas mobilis* wild-type and recombinant strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 38, numéro 3, p. 354-361.
- Fonseca, C., Romao, R., Rodrigues de Sousa, H., Hahn-Hagerdal, B. et Spencer-Martins, I. (2007). L-Arabinose transport and catabolism in yeast. *FEBS Journal*, volume 274, numéro 14, p. 3589-3600.
- Gardonyi, M. et Hahn-Hagerdal, B. (2003). The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, volume 32, numéro 2, p. 252-259.
- Gardonyi, M., Osterberg, M., Rodrigues, C., Spencer-Martins, I. et Hahn-Hagerdal, B. (2003). High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Research*, volume 3, numéro 1, p. 45-52.
- Girio, F. M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., Marques, S. et Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource technology*, volume 101, numéro 13, p. 4775-4800.
- Girio, F. M., Carlos Roseiro, J., Sa-Machado, P., Rita Duarte-Reis, A. et Amaral-Collaco, M. (1994). Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and microbial technology*, volume 16, numéro 12, p. 1074-1078.
- Gnansounou, E. et Dauriat, A. (2010). Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. *Bioresource technology*, volume 101, numéro 13, p. 4980-4991.
- Godin, B., Ghysel, F., Agneessens, R., Schmit, T., Gofflot, S., Lamaudiere, S., Sinnaeve, G., Goffart, J., Gerin, P. A., Stilmant, D. et Delcarte, J. (2010). Cellulose, hemicelluloses, lignin, and ash contents in various lignocellulosic crops for second generation bioethanol production. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement*, volume 14, numéro S2, p. 549-560.
- Hamacher, T., Becker, J., Gardonyi, M., Hahn-Hagerdal, B. et Boles, E. (2002). Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. *Microbiology (Reading, United Kingdom)*, volume 148, numéro 9, p. 2783-2788.

- Harhangi, H. R., Akhmanova, A. S., Emmens, R., van der Drift, C., de Laat, W. T. A. M., van Dijken, J. P., Jetten, M. S. M., Pronk, J. T. et Op den Camp, H. J. M. (2003). Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Archives of Microbiology*, volume 180, numéro 2, p. 134-141.
- Hayes, D. J., Fitzpatrick, S., Hayes, M. H. B. et Ross, J. R. H. (2006). The Biofine process - production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks. Dans *Section Title: Electrochemical, Radiational, and Thermal Energy Technology*, volume 1p. 139-164.
- Heipieper, H. J., Weber, F. J., Sikkema, J., Keweloh, H. et de Bont, J. A. M. (1994). Mechanisms of resistance of whole cell to toxic organic solvents. *Trends in biotechnology*, volume 12, numéro 10, p. 409-415.
- Ho, N. W. Y., Chen, Z. et Brainard, A. P. (1998). Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 64, numéro 5, p. 1852-1859.
- Holmes, B. (Dry Round Hay Bale Storage Costs. Dans Wisconsin Team Forage Vol. 6 No. 5, http://www.uwex.edu/ces/crops/uwforage/LRB_StorageCosts-FOF.htm (page consultée le 07-23 2013).
- Horvath, I. S., Franzen, C. J., Taherzadeh, M. J., Niklasson, C. et Liden, G. (2003). Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 69, numéro 7, p. 4076-4086.
- Ingledeu, W. M., Austin, G. D., Kluhspies, C. et Kelsall, D. R. (2009). *The Alcohol Textbook*, 5 édition. Nottingham University Press,
- Ingram, L. O., Aldrich, H. C., Borges, A. C. C., Causey, T. B., Martinez, A., Morales, F., Saleh, A., Underwood, S. A., Yomano, L. P., York, S. W., Zaldivar, J. et Zhou, S. (1999). Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnology progress*, volume 15, numéro 5, p. 855-866.
- Ingram, L. O. et Conway, T. (1988). Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 54, numéro 2, p. 397-404.
- Ingram, L. O., Eddy, C. K., Mackenzie, K. F., Conway, T. et Alterthum, F. (1989). Genetics of *Zymomonas mobilis* and ethanol production. *Developments in Industrial Microbiology Series*, volume 30, p. 53-69.
- Ishii, T. (1991). Acetylation at O-2 of arabinofuranose residues in feruloylated arabinoxylan from bamboo shoot cell-walls. *Phytochemistry*, volume 30, numéro 7, p. 2317-2320.
- Izidorczyk, M. S. et Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, volume 28, numéro 1, p. 33-33.
- Jeffries, T. W. (2008). Engineering the *Pichia stipitis* genome for fermentation of hemicellulose hydrolysates. Dans *Section Title: Fermentation and Bioindustrial Chemistry*.p. 37-47.
- Jeffries, T. W., Grigoriev, I. V., Grimwood, J., Laplaza, J. M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y., Passoth, V. et Richardson, P. M. (2007). Genome sequence of the

- lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature biotechnology*, volume 25, numéro 3, p. 319-326.
- Jeppsson, M., Bengtsson, O., Franke, K., Lee, H., Hahn-Haegerdal, B. et Gorwa-Grauslund, M. F. (2006). The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher KM for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, volume 93, numéro 4, p. 665-673.
- Jeppsson, M., Johansson, B., Hahn-Haegerdal, B. et Gorwa-Grauslund, M. (2002). Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 68, numéro 4, p. 1604-1609.
- Jeppsson, M., Traff, K., Johansson, B., Hahn-Haegerdal, B. et Gorwa-Grauslund, M. F. (2003). Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, volume 3, numéro 2, p. 167-175.
- Jin, S. et Chen, H. (2006). Structural properties and enzymatic hydrolysis of rice straw. *Process Biochemistry*, volume 41, numéro 6, p. 1261-1264.
- Joachimsthal, E., Haggett, K. D. et Rogers, P. L. (1999). Evaluation of recombinant strains of *Zymomonas mobilis* for ethanol production from glucose/xylose media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 77-79, numéro Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 1998, p. 147-157.
- Johansson, B. et Hahn-Haegerdal, B. (2002). The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Research*, volume 2, numéro 3, p. 277-282.
- Kadam, K. L., Forrest, L. H. et Jacobson, W. A. (2000). Rice straw as a lignocellulosic resource: Collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*, volume 18, numéro 5, p. 369-389.
- Karhumaa, K., Fromanger, R., Hahn-Haegerdal, B. et Gorwa-Grauslund, M. (2007). High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 73, numéro 5, p. 1039-1046.
- Karhumaa, K., Hahn-Haegerdal, B. et Gorwa-Grauslund, M. (2005). Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *Yeast*, volume 22, numéro 5, p. 359-368.
- Kilian, S. G. et Van Uden, N. (1988). Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 27, numéro 5-6, p. 545-548.
- Kim, Y., Ingram, L. O. et Shanmugam, K. T. (2007). Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanogenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 73, numéro 6, p. 1766-1771.

- Klinke, H. B., Thomsen, A. B. et Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 66, numéro 1, p. 10-26.
- Klinke, H. B., Ahring, B. K., Schmidt, A. S. et Thomsen, A. B. (2002). Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource technology*, volume 82, numéro 1, p. 15-26.
- Koetter, P. et Ciriacy, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 38, numéro 6, p. 776-783.
- Kolodrubetz, D. et Schleif, R. (1981). L-Arabinose transport systems in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, volume 148, numéro 2, p. 472-479.
- Kosinski, S. (2013) How Rain Affects Hay Quality - Frequently Asked Questions. Dans AgInfo Centre, Alberta Agriculture and Rural Development, [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/faq14011](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/faq14011) (page consultée le 07/23 2013).
- Kotyk, A. (1967). Mobility of the free and of the loaded monosaccharide carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes*, volume 135, numéro 1, p. 112-119.
- Kratky, Z. et Biely, P. (1980). Inducible β -xyloside permease as a constituent of the xylan-degrading enzyme system of the yeast *Cryptococcus albidus*. *European Journal of Biochemistry*, volume 112, numéro 2, p. 367-373.
- Kuhad, R. C. et Singh, A. (2007). *Lignocellulose Biotechnology Future Prospects*. I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, Inde, 390 p.
- Kuhn, A., van Zyl, C., van Tonder, A. et Prior, B. A. (1995). Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 61, numéro 4, p. 1580-1585.
- Kuyper, M., Harhangi, H. R., Stave, A. K., Winkler, A. A., Jetten, M. S. M., De Laat, W. T. A. M., Den Ridder, J. J. J., Op den Camp, H. J. M., Van Dijken, J. P. et Pronk, J. T. (2003). High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?. *FEMS Yeast Research*, volume 4, numéro 1, p. 69-78.
- Kuyper, M., Hartog, M. M. P., Toirkens, M. J., Almering, M. J. H., Winkler, A. A., van Dijken, J. P. et Pronk, J. T. (2005). Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, volume 5, numéro 4-5, p. 399-409.
- Kuyper, M., Winkler, A. A., van Dijken, J. P. et Pronk, J. T. (2004). Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research*, volume 4, numéro 6, p. 655-664.
- Lam, V. M. S., Daruwalla, K. R., Henderson, P. J. F. et Jones-Mortimer, M. C. (1980). Proton-linked D-xylose transport in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, volume 143, numéro 1, p. 396-402.

- Larouche, R. (1993). *Extraction, caractérisation et biotransformation de la lignine de Klason extraite de l'épinette blanche Picea glauca (Moench) voss*. Maîtrise en ressources renouvelables, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi,
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. et Nilvebrant, N. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and microbial technology*, volume 24, numéro 3/4, p. 151-159.
- Larsson, S., Quintana-Sainz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N. et Johnsson, L. J. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 84-86, p. 617-632.
- Larsson, S., Reimann, A., Nilvebrant, N. et Jonsson, L. J. (1999). Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 77-79, numéro Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 1998, p. 91-103.
- Lau, M. W., Gunawan, C., Balan, V. et Dale, B. E. (2010). Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, volume 3,
- Lawford, H. G. et Rousseau, J. D. (1999). The effect of glucose on high-level xylose fermentations by recombinant *Zymomonas* in batch and fed-batch fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 77-79, numéro Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 1998, p. 235-249.
- Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, volume 56, numéro 1, p. 1-24.
- Lee, K. Y., Park, J. M., Kim, T. Y., Yun, H. et Lee, S. Y. (2010). The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. *Microbial Cell Factories*, volume 9, p. 94.
- Lee, W. -, Kim, M. -, Ryu, Y. -, Bisson, L. F. et Seo, J. -. (2002). Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 60, numéro 1-2, p. 186-191.
- Lemieux, J. (2013). *Estimations offertes par Transport B&B Inc*. Transport B&B Inc., Montreal,
- Lequart, C., Nuzillard, J. -, Kurek, B. et Debeire, P. (1999). Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydrate research*, volume 319, numéro 1-4, p. 102-111.
- Lewis Liu, Z., Ma, M. et Song, M. (2009). Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, volume 282, numéro 3, p. 233-244.
- Ligthelm, M. E., Prior, B. A. et Du Preez, J. C. (1988). The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 28, numéro 1, p. 63-68.

- Liu, C. Q., Goodman, A. E. et Dunn, N. W. (1988). Expression of cloned Xanthomonas D-xylose catabolic genes in Zymomonas mobilis. *Journal of Biotechnology*, volume 7, numéro 1, p. 61-70.
- Liu, Z. L., Moon, J., Andersh, B. J., Slininger, P. J. et Weber, S. (2008). Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by Saccharomyces cerevisiae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 81, numéro 4, p. 743-753.
- Lubomir, K. et Peter, B. (1998). Disaccharides permeases: constituents of xylanolytic and mannanolytic systems of Aureobasidium pullulans. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, volume 1425, numéro 3, p. 560-566.
- Lucas, C. et Van Uden, N. (1986). Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast Candida shehatae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 23, numéro 6, p. 491-495.
- Lynd, L. R., Van Zyl, W. H., McBride, J. E. et Laser, M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. *Current opinion in biotechnology*, volume 16, numéro 5, p. 577-583.
- Ma, M., Liu, Z. L. et Moon, J. (2012). Genetic Engineering of Inhibitor-Tolerant Saccharomyces cerevisiae for Improved Xylose Utilization in Ethanol Production. p. 1-11.
- Madhavan, A., Tamalampudi, S., Ushida, K., Kanai, D., Katahira, S., Srivastava, A., Fukuda, H., Bisaria, V. S. et Kondo, A. (2009). Xylose isomerase from polycentric fungus Orpinomyces: Gene sequencing, cloning, and expression in Saccharomyces cerevisiae for bioconversion of xylose to ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 82, numéro 6, p. 1067-1078.
- Maruyama, K., Goto, C., Numata, M., Suzuki, T., Nakagawa, Y., Hoshino, T. et Uchiyama, T. (1996). O-acetylated xyloglucan in extracellular polysaccharides from cell-suspension cultures of Mentha. *Phytochemistry*, volume 41, numéro 5, p. 1309-1314.
- MDDEP (2006). Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP)
Plan d'action 2006-2012 sur les changements climatiques. Dans http://www.mddep.gouv.qc.ca/changements/plan_action/index-mesures.htm (page consultée le 04/24 2012).
- MDDEP (2011). Ministère du Développement Durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec (MDDEP)
Le Québec en action! Dans http://www.mddep.gouv.qc.ca/changements/plan_action/ (page consultée le 04/24 2012).
- Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y. et Zhang, M. (2002). Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of Zymomonas mobilis AX101. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 98-100, numéro Biotechnology for Fuels and Chemicals, p. 885-898.
- Moniruzzaman, M., Dien, B. S., Skory, C. D., Chen, Z. D., Hespell, R. B., Ho, N. W. Y., Dale, B. E. et Bothast, R. J. (1997). Fermentation of corn fiber sugars by an engineered xylose utilizing Saccharomyces yeast strain. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, volume 13, numéro 3, p. 341-346.

- Neale, A. D., Scopes, R. K. et Kelly, J. M. (1988). Alcohol production from glucose and xylose using *Escherichia coli* containing *Zymomonas mobilis* genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 29, numéro 2-3, p. 162-167.
- Nobre, A., Lucas, C. et Leao, C. (1999). Transport and utilization of hexoses and pentoses in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 65, numéro 8, p. 3594-3598.
- Novick, N. J. et Tyler, M. E. (1982). L-Arabinose metabolism in *Azospirillum brasiliense*. *Journal of Bacteriology*, volume 149, numéro 1, p. 364-367.
- Novotny, C. P. et Englesberg, E. (1966). The L-arabinose permease system in *Escherichia coli* B/r. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, volume 117, numéro 1, p. 217-230.
- Oezcan, S., Koetter, P. et Ciriacy, M. (1991). Xylan-hydrolyzing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 36, numéro 2, p. 190-195.
- Ohara, H., Owaki, M. et Sonomoto, K. (2006). Xylooligosaccharide fermentation with *Leuconostoc lactis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, volume 101, numéro 5, p. 415-420.
- Ohta, K., Alterthum, F. et Ingram, L. O. (1990). Effects of environmental conditions on xylose fermentation by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 56, numéro 2, p. 463-465.
- Ohta, K., Beall, D. S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T. et Ingram, L. O. (1991). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 57, numéro 4, p. 893-900.
- Op den Camp, H. J., Harhangi, H. R., van der Drift, C. et Pronk, J. T. (2003). *FERMENTATION OF PENTOSE SUGARS*. WO/2003/062430, Pays Bas,
- Ouimet, B. (2013). *Estimations offertes par Brian Ouimet chez Transport Jacques Augers Inc.* Transport Jacques Auger Inc., Montreal,
- Oura, E. (1977). Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry (Rickmansworth, United Kingdom)*, volume 12, numéro 3, p. 19-21, 35.
- Palmqvist, E., Galbe, M. et Hahn-Hagerdal, B. (1998). Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 50, numéro 5, p. 545-551.
- Palmqvist, E., Almeida, J. S. et Hahn-Hagerdal, B. (1999). Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and bioengineering*, volume 62, numéro 4, p. 447-454.
- Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N. Q. et Hahn-Hagerdal, B. (1999). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and bioengineering*, volume 63, numéro 1, p. 46-55.

- Palmqvist, E. et Hahn-Hagerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, volume 74, numéro 1, p. 25-33.
- Pampulha, M. E. et Loureiro-Dias, M. C. (1989). Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 31, numéro 5-6, p. 547-550.
- Peters, M. S., Timmerhaus, K. D. et West, R. E. (2003). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*, 5 édition. Mc Graw Hill, USA, 988 p.
- Qian, Y., Yomano, L. P., Preston, J. F., Aldrich, H. C. et Ingram, L. O. (2003). Cloning, Characterization, and Functional Expression of the Klebsiella oxytoca Xylodextrin Utilization Operon (xynTB) in Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 69, numéro 10, p. 5957-5967.
- Reifenberger, E., Boles, E. et Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of Saccharomyces cerevisiae and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, volume 245, numéro 2, p. 324-333.
- Richard, P., Toivari, M. H. et Penttila, M. (1999). Evidence that the gene YLR070c of Saccharomyces cerevisiae encodes a xylitol dehydrogenase. *FEBS letters*, volume 457, numéro 1, p. 135-138.
- Rizzi, M., Erlemann, P., Bui Thanh Ngoc Anh et Dellweg, H. (1988). Xylose fermentation by yeasts. 4. Purification and kinetic studies of xylose reductase from Pichia stipitis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 29, numéro 2-3, p. 148-154.
- Rubin, E. M. (2008). Genomics of cellulosic biofuels. *Nature (London, United Kingdom)*, volume 454, numéro 7206, p. 841-845.
- Sa-Nogueira, I., Nogueira, T. V., Soares, S. et De Lencastre, H. (1997). The Bacillus subtilis L-arabinose (ara) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression. *Microbiology (Reading, United Kingdom)*, volume 143, numéro 3, p. 957-969.
- Scheller, H. V. et Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, volume 61, p. 263-289.
- Sedlak, M. et Ho, N. W. Y. (2001). Expression of E. coli araBAD operon encoding enzymes for metabolizing L-arabinose in Saccharomyces cerevisiae. *Enzyme and microbial technology*, volume 28, numéro 1, p. 16-24.
- Seider, W. D., Seader, J. D., Lewin, D. R. et Widagdo, S. (2009). *Product And Process Design Principles, Synthesis, Analysis, and Evaluation*, 3 édition. John Wiley & Sons, Inc., USA, 727 p.
- Seo, H., Kim, S. S., Lee, H. et Jung, K. (2009). High-level production of ethanol during fed-batch ethanol fermentation with a controlled aeration rate and non-sterile glucose powder feeding of Saccharomyces cerevisiae. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, volume 14, numéro 5, p. 591-598.
- Seo, H., Yeon, J., Chung, M. H., Kang, D. H., Lee, H. et Jung, K. (2010). Long-term repeated fed-batch ethanol fermentation in aerated condition. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, volume 15, numéro 2, p. 324-328.

- Shibuya, N. et Iwasaki, T. (1985). Structural features of rice bran hemicellulose. *Phytochemistry (Elsevier)*, volume 24, numéro 2, p. 285-289.
- Sierra-Alvarez, R. et Lettinga, G. (1991). The methanogenic toxicity of wastewater lignins and lignin related compounds. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, volume 50, numéro 4, p. 443-455.
- Silva, S. S., Vitolo, M., Pessoa, A. J. et Felipe, M. G. A. (1996). Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, volume 36, numéro 3, p. 187-191.
- Singh, A., Kumar, P. K. R. et Schuegerl, K. (1992). Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, volume 45, numéro Enzymes Prod. Bact. Fungi Plant Cells, p. 29-55.
- Skoog, K. et Hahn-Haegerdal, B. (1990). Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 56, numéro 11, p. 3389-3394.
- Software-Factory Norbert Schmitz (2013). Pressure Drop Online-Calculator. Dans <http://www.pressure-drop.com/Online-Calculator/> (page consultée le 07/23 2013).
- Spencer-Martins, I. (1994). Transport of sugars in yeasts. Implications in the fermentation of lignocellulosic materials. *Bioresource technology*, volume 50, numéro 1, p. 51-51.
- Stambuk, B. U., Franden, M. A., Singh, A. et Zhang, M. (2003). D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, volume 105-108, p. 255-263.
- Statistique Canada (2009). *Statistique Canada Rapport préliminaire 2009 Report on Energy Supply and Demand in Canada* (Rapport gouvernemental)Canada, 7 p.
- Subtil, T. et Boles, E. (2012). Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, volume 5, p. 14.
- Sumiya, M., Davis, E. O., Packman, L. C., McDonald, T. P. et Henderson, P. J. F. (1995). Molecular genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene *xylF*, in *Escherichia coli*. *Receptors and Channels*, volume 3, numéro 2, p. 117-128.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C. et Liden, G. (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 53, numéro 6, p. 701-708.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C. et Liden, G. (1999). Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, volume 87, numéro 2, p. 169-174.
- Tantirungkij, M., Nakashima, N., Seki, T. et Yoshida, T. (1993). Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, volume 75, numéro 2, p. 83-88.

- Tomoeda, M. et Horitsu, H. (1964). Pentose metabolism by *Candida utilis*. I. Xylose isomerase. *Agricultural and Biological Chemistry*, volume 28, numéro 3, p. 139-143.
- Traff, K. L., Cordero, R. R. O., Van, Z., W.H. et Hahn-Hagerdal, B. (2001). Deletion of the GRE3 Aldose Reductase Gene and Its Influence on Xylose Metabolism in Recombinant Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Expressing the xylA and XKS1 Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 67, numéro 12, p. 5668-5674.
- Traff-Bjerre, K. L., Jeppsson, M., Hahn-Hagerdal, B. et Gorwa-Grauslund, M. -. (2004). Endogenous NADPH-dependent aldose reductase activity influences product formation during xylose consumption in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, volume 21, numéro 2, p. 141-150.
- Tsujibo, H., Kosaka, M., Ikenishi, S., Sato, T., Miyamoto, K. et Inamori, Y. (2004). Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. *Journal of Bacteriology*, volume 186, numéro 4, p. 1029-1037.
- Ulbricht, R. J., Northup, S. J. et Thomas, J. A. (1984). A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*, volume 4, numéro 5, p. 843-853.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. et Van Dijken, J. P. (1990). Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of general microbiology*, volume 136, numéro 3, p. 405-412.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. et Van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast*, volume 8, numéro 7, p. 501-517.
- Verduyn, C., Van Kleef, R., Frank, J., Schreuder, H., Van Dijken, J. P. et Scheffers, W. A. (1985). Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochemical Journal*, volume 226, numéro 3, p. 669-677.
- Verho, R., Londesborough, J., Penttila, M. et Richard, P. (2003). Engineering Redox Cofactor Regeneration for Improved Pentose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 69, numéro 10, p. 5892-5897.
- Verho, R., Putkonen, M., Londesborough, J., Penttila, M. et Richard, P. (2004). A Novel NADH-linked L-Xylulose Reductase in the L-Arabinose Catabolic Pathway of Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, volume 279, numéro 15, p. 14746-14751.
- Villa, G. P., Bartoli, R., Lopez, R., Guerra, M., Enrique, M., Penas, M., Rodriguez, E., Redondo, D., Iglesias, I. et Diaz, M. (1992). Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biotechnologica*, volume 12, numéro 6, p. 509-512.
- Vongsuvanlert, V. et Tani, Y. (1988). Purification and characterization of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose. *Agricultural and Biological Chemistry*, volume 52, numéro 7, p. 1817-1824.
- Walfridsson, M., Anderlund, M., Bao, X. et Hahn-Hagerdal, B. (1997). Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on

- product formation during xylose utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 48, numéro 2, p. 218-224.
- Warth, A. D. (1988). Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 54, numéro 8, p. 2091-2095.
- Watanabe, S., Kodaki, T. et Makino, K. (2006). Cloning, Expression, and Characterization of Bacterial L-Arabinose 1-Dehydrogenase Involved in an Alternative Pathway of L-Arabinose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, volume 281, numéro 15, p. 10652.
- Weast, R. C. (1975-1976). *Handbook of Chemistry and Physics*, 56 édition. CRC Press, Cleveland,
- Weierstall, T., Hollenberg, C. P. et Boles, E. (1999). Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Molecular microbiology*, volume 31, numéro 3, p. 871-883.
- Weigert, B., Klein, C., Rizzi, M., Lauterbach, C. et Dellweg, H. (1988). Xylose fermentation by yeasts. 8. Influence of furfural on the aerobic growth of the yeast *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, volume 10, numéro 12, p. 895-900.
- Weisser, P., Kraemer, R. et Sprenger, G. A. (1996). Expression of the *Escherichia coli* pmi Gene, Encoding Phosphomannose-Isomerase in *Zymomonas mobilis*, Leads to Utilization of Mannose as a Novel Growth Substrate, Which Can Be Used as a Selective Marker? *Applied and Environmental Microbiology*, volume 62, numéro 11, p. 4155-4155.
- Weisser, P., Kraemer, R., Sahm, H. et Sprenger, G. A. (1995). Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *Journal of Bacteriology*, volume 177, numéro 11, p. 3351-3354.
- Wende, G. et Fry, S. C. (1997). O-feruloylated, O-acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. *Phytochemistry*, volume 44, numéro 6, p. 1011-1018.
- Wilcke, B., Cuomo, G. et Fox, C. (1999). Preserving the Value of Dry Stored Hay. Dans University of Minnesota: College of Agricultural, Food, and Environmental Sciences, <http://www.extension.umn.edu/distribution/cropsystems/dc7404.html> (page consultée le 07-23 2013).
- Wisselink, H. W., Toirkens, M. J., Berriel, M. D., Winkler, A. A., Van Dijken, J. P., Pronk, J. T. et Van Maris, Antonius J. A. (2007). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 73, numéro 15, p. 4881-4891.
- Wouter Wisselink, H., Toirkens, M. J., Wu, Q., Pronk, J. T. et Van Maris, Antonius J. A. (2009). Novel evolutionary engineering approach for accelerated utilization of glucose, xylose, and arabinose mixtures by engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, volume 75, numéro 4, p. 907-914.
- Yablochkova, E. N., Bolotnikova, O. I., Mikhailova, N. P., Nemova, N. N. et Ginak, A. I. (2003). The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology (Moscow, Russian Federation)(Translation of Mikrobiologiya)*, volume 72, numéro 4, p. 414-417.

- Yomano, L. P., York, S. W. et Ingram, L. O. (1998). Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, volume 20, numéro 2, p. 132-138.
- Zaldivar, J., Martinez, A. et Ingram, L. O. (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, volume 65, numéro 1, p. 24-33.
- Zaldivar, J., Martinez, A. et Ingram, L. O. (2000). Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolyzate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, volume 68, numéro 5, p. 524-530.
- Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M. et Picataggio, S. (1995). Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, volume 267, numéro 5195, p. 240-240.
- Zhao, J. et Xia, L. (2010). Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochemical engineering journal*, volume 49, numéro 1, p. 28-32.

8. Annexe A : Tableau synthèses des biocatalyseurs

Tableau 8.1 : Synthèse des souches de biocatalyseurs les plus efficaces retrouvées dans la littérature, pour la fermentation des hydrolysats lignocellulosiques.

La capacité de ces recombinants à fermenter le xylose et, à un moindre degré, l'arabinose, est le principal critère jugeant de la valeur de ces nouvelles souches OGM pour ce projet de recherche. Seulement 3 espèces ont été retenues, affichant toutes les meilleures performances de fermentation des pentoses retrouvées dans la littérature et présentant aussi un historique d'implantation industrielle raisonnable. Les espèces, la souche et les parents de cette nouvelle souche sont énumérés. Les techniques d'ingénierie génétiques utilisées afin de créer ces nouvelles souches sont résumées. Le milieu de culture utilisé afin d'obtenir les performances ici citées est indiqué de par sa composition en glucose (GLU), xylose (XYL) et arabinose (ARA). Noter que les données rapportées sont principalement tirées de figures rapportant les courbes de fermentation dans les articles cités, puisque les données brutes ne sont que rarement disponibles. La concentration d'éthanol ([ETH]) finale obtenue en fin de fermentation est rapportée en g/L. Le temps requis afin d'atteindre cette concentration est indiqué en heures (h). Le rendement de fermentation tel que défini comme étant le ratio entre la masse d'éthanol produit par masse de sucres totaux (hexoses et pentoses) consommés durant l'expérience. Un « indicateur de performance » est fourni afin de pouvoir comparer plus objectivement les performances des différentes souches rapportées. Cet indicateur de performance indique la concentration en éthanol suite au point d'inflexion de la courbe de production d'éthanol où généralement, plus de 80% de l'éthanol qui sera produit lors de la fermentation est déjà produit. Le temps sur la courbe où cette concentration a été mesurée est indiqué (ex. : 42 gETH/L à 45h). Finalement, la source (l'article) d'où ces données sont tirées est donnée.

Espèce	Souche	Parents	Techniques d'ingénierie génétique utilisées	Milieu de culture	Performances				Source
				Mélange de sucres GLU-XYL-ARA (spécifications)	[ETH] finale (g/L)	Rendement de fermentation (gETH/g Sucres cons.)	Temps pour arriver à la [ETH] finale (h)	Indicateur de performance ([ETH] suite au point d'inflexion)	
<i>E. coli</i>	K011 (frd)	ATCC 1103	Vecteur intégratif portant les gènes <i>pdh</i> et <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> . Knockout du gène <i>pfl</i> .	0-80-0	41.6	0.53	45	42 gETH/L à 45h	[Ohta et al., 1991]
	K012 (recAfrd)			0-80-0	40.8	0.53	45	41 gETH/L à 45h	
	LY01	KO11	Ingénierie évolutive afin d'augmenter la tolérance à l'éthanol.	0-90-0	42.4	0.47	48	42 gETH/L à 48h	[Yomano et al., 1998]
	LY02			0-140-0	63.8	0.457	120	60 gETH/L à 72h	
	FBR5	NZN111	Vecteur non-intégratif portant les gènes <i>pdh</i> et <i>adhB</i> de <i>Z. mobilis</i> .	28-37-20 hydrolysats	37.4	0.46	100	37 gETH/L à 60h	[Dien et al., 2000]

	SE2378	ATCC 27325	Knockout des gènes <i>pflB</i> , <i>adhE</i> et <i>aceF</i> . Mutanogénèse du gène <i>ldhA</i> par transposon.	0-50-0	20.5	0.42	96	16 gETH/L à 48h	[Kim et al., 2007]
Z. mobilis	CP4 (pZB5)	<i>Z. mobilis</i> CP4	Vecteur portant les gènes du métabolisme du xylose d' <i>E. coli</i> (<i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tal</i> et <i>tktA</i>).	0-25-0	11	0.44	48h	11 gETH/L à 48h	[Zhang et al., 1995]
				25-25-0	24.5	0.49	30h	23 gETH/L à 23h	[Lawford et Rousseau, 1999]
				67-66-0	62	0.46	48	60 gETH/L à 30h	
				20-80-0	47.7	0.48	70	44 gETH/L à 48h	
	ZM4 (pZB5)	<i>Z. mobilis</i> ZM4	Vecteur portant les gènes du métabolisme du xylose d' <i>E. coli</i> (<i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tal</i> et <i>tktA</i>).	75-75-0	67	0.47	80	67 gETH/L à 80h	[Joachimsthal et al., 1999]
				65-65-0	62	0.46	48	62 gETH/L à 40h	
	AX101	-	Transgénèse de <i>Z. mobilis</i> par vecteurs multiples afin d'exprimer les voies métaboliques de la fermentation du xylose et de l'arabinose	40-40-20	42	0.43	100	41 gETH/Là 48h	[Mohagheghi et al., 2002]
				0-100-0	41.3	0.434	160	20.16 gETH/Là 48h	[Lau et al., 2010]
A3	<i>Z. mobilis</i> ZM4 (ATCC 31821)	Vecteur portant les gènes du métabolisme du xylose d' <i>E. coli</i> (<i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>tal</i> et <i>tktA</i>). Ingénierie évolutive afin d'augmenter l'efficacité des recombinants.	100-100-0	90	0.477	135	88 gETH/Là 80h	[Agrawal et al., 2011]	
			0-10-0	43.1	0.451	46	43.1 gETH/Là 46h		
S. cerevisiae	Saccharomyces 1400	Saccharomyces 1400 (Labatt)	Vecteur non-intégratif (pLNH132) portant les gènes de la XR et la XDH de	80-40-0	52.5	0.46	120	50 gETH/Là 70h	[Moniruzzaman et al., 1997]

(pLNH32)		<i>P. stipitis</i> , ainsi que la XK de <i>S. cerevisiae</i> .	0-50-0	22.5	0.45	48	22.5 gETH/Là 48h	[Ho et al., 1998]
424A(LN H-ST)	ATCC 4124	Vecteur intégratif portant de multiples copies des gènes codant pour la XR, la XDH et la XK.	0-100-0	46.9	0.469	168	41.8 gETH/L à 48h	[Lau et al., 2010]
TMB300 1	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 113-7A	Vecteur intégratif portant les gènes de <i>P. stipitis</i> codant pour XR, XDH, ainsi que le gène homologue codant pour la XK.	-	-	-	-	-	[A. Eliasson et al., 2000]
TMB325 5	TMB300 1	Knockout du gène <i>zwf1</i> , réprimant la synthèse de l'enzyme G6PDH.	0-50-0	-	0.41	-	-	[Jeppsson et al., 2002]
TMB305 7	TMB300 1	Vecteur intégratif permettant la surexpression du gène homologue XK et de certaines enzymes de la PPP.	20-50-0	20.3	0.29	150	20 gETH/L à 80h	[Karhuma et al., 2007]
TMB340 0	Saccharomyces USM21	Vecteur intégratif portant les gènes de <i>P. stipitis</i> codant pour XR, XDH, ainsi que le gène homologue codant pour la XK. Mutanogénèse par EMS.	6-4-0 hydrolysats - cuvée alimentée	45.2	0.43	96	40 gETH/L à 40h	[Bertilsson et al., 2009]
ZU-10	-	Vecteur intégratif portant les gènes de <i>P. stipitis</i> codant pour XR, XDH, ainsi que la surexpression gène homologue <i>xks1</i> codant pour la XK.	4.8-71.8-0 hydrolysats	31.1	0.406	72	31.1 gETH/L à 72h	[Zhao et Xia, 2010]
			69.1-110-0 hydrolysats	19.7	0.168	-	-	
			0-120-0	44.8	0.373	-	-	

ISM0010	ISM0002 venant de RBW217 venant de CEN.PK1 02-3A	<p>RWB217: Vecteur intégratif portant le gène de <i>Piromyces sp.</i> codant pour la XI, ainsi que la surexpression de certaines enzymes (RPE, RPI, TAL, TKL) de la voie des PPP.</p> <p>ISM0002: Transgénèse par vecteur afin d'exprimer la voie catabolique de l'arabinose de <i>L. plantarium</i> (gènes: <i>araA</i>, <i>araB</i>, <i>araD</i>). Ingénierie évolutive afin d'augmenter l'efficacité de cette voie.</p>	30-15-15	25.8	0.43	42	25 gETH/L à 30h	[Kuyper et al., 2004; Kuyper et al., 2005; Wisselink et al., 2007; Wouter Wisselink et al., 2009]
---------	---	--	----------	------	------	----	-----------------	---

9. Annexe B : Protocoles d'analyses et aide à la compréhension des figures pour les résultats expérimentaux

9.1.Méthode d'analyse des données brutes

Les données rapportées dans ce rapport proviennent majoritairement de trois types de méthodes d'analyses. Ces trois types d'analyse sont détaillés ici, avec les données leur étant rattachées.

9.1.1. Gravimétrie

L'utilisation de balances, de pipettes et de verrerie graduée sont utilisés pour générer les données de concentration de certaines substances : extrait de levure, urée, Lactrol et concentration massique initiale en levure.

9.1.2. HPLC

La quantification des substances en fermentation s'est fait grâce à l'utilisation d'un HPLC suivant le protocole ci-dessous :

« Glucose, xylose, ethanol, acetic acid, glycerol, levulinic acid, formic acid and 5-HMF concentration of samples from fermentation media were analyzed by an Agilent HPLC 1290 Infinity system with an analytical Aminex HPX-87H organic acid analysis ion exclusion column (300 mm x 7.8 mm) and a BIO-RAD Micro-Guard Cation H+ pre-column (30x4.6 mm). The mobile phase was 0.01 N H₂SO₄ with elution flow rate of 0.6 ml/min. Column and RI detector temperature were 60 and 35 C, respectively. Note that galactose, mannose and xylose can't be clearly separated by this column. Thus the reported xylose concentration was actually an unknown combination of those three sugars. »

9.1.3. Concentration cellulaire

La concentration cellulaire est évaluée grâce à un hémacytomètre et un microscope. Il s'agit donc d'un compte manuel par l'expérimentateur. Lors du compte cellulaire, les cellules en bourgeonnement et les cellules mortes peuvent être identifiées séparément des cellules vivantes. Il est donc possible de calculer le taux de bourgeonnement et la vitalité des cellules en faisant le ratio des cellules en bourgeonnement sur les cellules vivantes et le ratio des cellules vivantes sur le total des cellules comptées respectivement.

9.2.Explication des tableaux et figures standardisés

Les résultats compilés dans ce rapport sont fournis sous forme standardisée. La totalité des données est compilée à l'Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20. Les résultats fournis dans ce rapport sont complets et permettent d'avoir une vue précise sur l'état actuel de ce projet de recherche.

9.2.1. Explication des tableaux détaillant les protocoles expérimentaux

Tableau 9.1: Exemple du premier tableau détaillant le protocole expérimental. Tableau détaillant les paramètres communs des différents milieux de fermentation testés durant la série d'essais analysée.

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	10	g/L
Urée	1	g/L
pH	6	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	1.2	g/L
Propagation avec diff. source de carbone		
Fermenteur	Erlenmeyer 150 ml	

Le Tableau 9.1 est un exemple du premier tableau standardisé retrouvé dans la section « Protocole » de toutes les séries d'essais présentées dans ce rapport. Ce premier tableau regroupe essentiellement tous les paramètres communs à tous les milieux de fermentation testés. Noter que le pH indiqué est toujours le pH initial, sauf si spécifié autrement. Noter que si les types de fermenteurs utilisés sont des Erlenmeyers, alors la température et l'agitation sont celles de l'incubateur. Dans le cas où il s'agit d'un bioréacteur autre, alors il s'agit de la consigne d'agitation de l'agitateur du bioréacteur et la consigne du système de contrôle de température du bioréacteur.

Tableau 9.2: Exemple du deuxième tableau détaillant le protocole expérimental. Tableau détaillant les paramètres propres à chacun des milieux de fermentation testés durant la série d'essais analysée.

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E08-1	MS - Glu Inoc - 100% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	87	g/L sucres
			Source de carbone dans la propagation	0:100	ratio Glu:Xyl
E08-2	MS - Xyl Inoc - 100% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	94.5	g/L sucres
			Source de carbone dans la propagation	0:100	ratio Glu:Xyl
E08-3	MS - Glu Inoc - 75% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	12.5:87.5	ratio Glu:Xyl
			Source de carbone dans la propagation	96	g/L sucres
E08-4	MS - Xyl Inoc - 75% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	25:75	ratio Glu:Xyl
			Source de carbone dans la propagation	100:0	ratio Glu:Xyl
E08-5	HH - Glu Inoc	3	Milieu de fermentation (HH)	64.5	g/L sucres
			Source de carbone dans la propagation	25:75	ratio Glu:Xyl
E08-6	HH - Xyl Inoc	3	Milieu de fermentation (HH)	12.5:87.5	ratio Glu:Xyl
			Source de carbone dans la propagation	76	g/L sucres
				27:73	ratio Glu:Xyl
				100:0	ratio Glu:Xyl
				82.5	g/L sucres
				27:73	ratio Glu:Xyl
				12.5:87.5	ratio Glu:Xyl

Le Tableau 9.2 est un exemple du deuxième tableau standardisé retrouvé dans la section « Protocole » de toutes les séries d'essais présentés dans ce rapport. Ce 2^e tableau regroupe essentiellement tous les paramètres uniques à chacun des milieux de fermentation testés. Le #ID (numéro d'identification), le nom spécifique de ce milieu et le nombre de répliques réalisés pour ce milieu y sont rapportés. La composition en sucres est fournie, ainsi que les autres paramètres investigués différents entre les milieux testés. Par exemple, le Tableau 9.2 rapporte la composition initiale en sucres du milieu, le type de milieu (soit un milieu synthétique « MS » ou un milieu à base d'hydrolysats hémicellulosique « HH ») et la composition en sucres du milieu de propagation ayant servi à générer l'inoculum pour ce milieu.

9.2.2. Explication des figures de suivi de fermentation

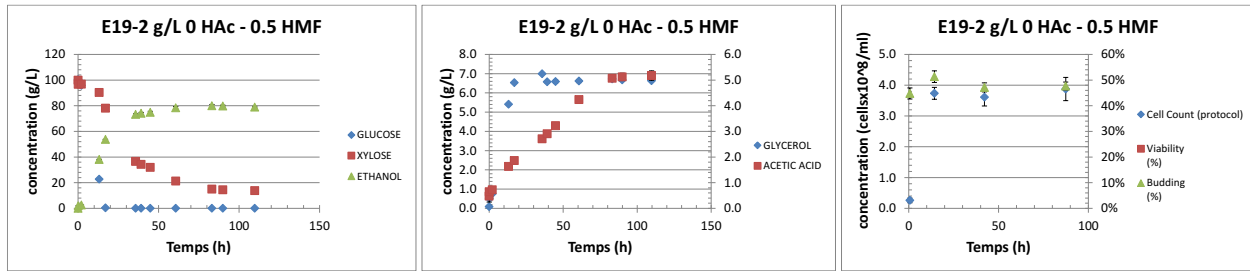


Figure 9.1: Exemple de figure détaillant le suivi des substances importantes durant la fermentation.
 Axes de gauche : glucose, éthanol, xylose, glycérol et concentration cellulaire. Axe de droite : acide acétique, viabilité et bourgeonnement.

La Figure 9.1 montre un exemple des figures de suivi des substances dans les fermentations testées. Ces figures sont présentées pour tous les milieux testés au début de la section « Résultats » de chacune des séries d'essais abordées dans ce rapport. La première figure à gauche détaille le suivi du glucose, du xylose et de l'éthanol. La figure du centre détaille le suivi du glycérol (axe de gauche) et de l'acide acétique (axe de droite). La figure de droite détaille le suivi de la concentration cellulaire, si disponible. La concentration cellulaire est rapportée sur l'axe de gauche, tandis que le taux de bourgeonnement (« budding »; si disponible) et le taux vitalité des cellules (« vitality »; si disponible) sont rapportés sur l'axe de droite.

9.2.3. Explication du tableau des performances

Tableau 9.3: Exemple d'un tableau standardisé compilant des performances de fermentation d'une série d'essais.

#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y_{max}	Q_{Eth} @24h (g/L-h)	Q_{Eth} @48h (g/L-h)	Q_{Eth} @72h (g/L-h)	Q_{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q_{Eth_Glu} (g/L-h)	Y_{max}	Q_{Eth} @24h	Q_{Eth} @48h	Q_{Eth} @72h	Q_{Eth_Xyl}	Q_{Eth_Glu}
E01-1	0% Xyl	89.0%	1.67	NA	NA	NA	1.59	1.5%	0.03	NA	NA	NA	0.05
E01-2	20% Xyl	91.0%	1.46	0.85	NA	0.28	1.58	1.8%	0.01	0.01	NA	NA	0.02
E01-3	40% Xyl	91.3%	1.15	0.78	0.56	0.41	1.43	1.3%	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02
E01-4	50% Xyl	90.5%	1.02	0.69	0.55	0.33	1.25	1.2%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E01-5	60% Xyl	87.4%	0.85	0.62	0.51	0.34	ND	1.6%	0.00	0.00	0.00	0.01	ND
E01-6	80% Xyl	88.0%	0.58	0.47	0.43	0.36	ND	4.2%	0.02	0.02	0.01	0.02	ND

Le Tableau 9.3 montre un tableau standardisé rapportant les performances de fermentation jugées pertinentes à des fins d'analyse et de comparaison d'expériences. Ce tableau est rencontré dans toutes les séries d'expériences suite à la présentation des figures de suivi de fermentation. Ce tableau rapporte la mesure du rendement de fermentation (« Y_{max} ») et de la productivité éthylique de la fermentation calculée à 24h, 48h et 72h (« Q_{Eth} @24h », « Q_{Eth} @48h » et « Q_{Eth} @72h », respectivement). Lorsqu'il y a du glucose et du xylose dans le milieu de fermentation, la souche de levure GM LOMG1 consomme le glucose initialement et seulement lorsque tout le glucose est consommé, la levure commence à consommer le xylose. Bien entendu, ce phénomène ne se produit pas toujours de façon parfaite, mais il s'agit d'une approximation satisfaisante. Conséquemment, le tableau des performances rapporte aussi la productivité éthylique de la fermentation durant la phase où seulement le glucose est consommé

(« Q_{Eth_Glu} ») et la productivité éthylique durant la phase où seulement le xylose est consommé (« Q_{Eth_Xyl} »). La partie droite du tableau rapporte les incertitudes absolues sur les mesures correspondantes dans la partie gauche du tableau.

Voici la justification pour les données et sigles présentés dans les tableaux des performances :

- « #ID »
 - Est le numéro d'identification du milieu de fermentation testé. Si ce milieu a été testé en réplica, alors les données qui seront fournies seront les moyennes et les incertitudes calculées sur ces réplicas.
- « Nom »
 - Est un nom descriptif donné au milieu de fermentation testé. Généralement il tentera de résumer les spécificités de ce milieu; ce qui le distingue des autres milieux testés. Souvent des acronymes sont utilisés, pour plus de détails voir la liste des acronymes de ce rapport.
- « Y_{max} »
 - Est le rendement maximal de la fermentation. Cette donnée est calculée en prenant la concentration en éthanol la plus haute rencontrée durant la fermentation en question et en la divisant par la quantité de sucres totaux consommés jusqu'à ce moment.
 - L'incertitude sur le rendement est calculée en utilisant les règles de propagation d'erreurs.
- « Q_{Eth} @24h »
 - Est la productivité éthylique évaluée à 24h. Cette donnée est interpolée graphiquement si la fermentation n'est pas déjà terminée à 24h.
 - L'incertitude sur la cette donnée est calculée en faisant l'hypothèse que la productivité à 24h aurait été calculée comme étant la moyenne entre la productivité des deux points ayant servis à l'interpolation. Autrement dit, l'incertitude est calculée en utilisant les règles de propagation d'erreurs sur le calcul de la moyenne entre la productivité de la donnée existante juste avant 24h et la donnée existante juste après 24h (soit les deux points graphiques ayant servis à l'interpolation).
 - Il en va de même pour les productivités à 48h et à 72h.
- « Q_{Eth_Xyl} »
 - Est la productivité éthylique en catabolisme du xylose, ou encore productivité éthylique xylolytique. Est calculé comme étant la productivité d'éthanol du moment où le glucose a été complètement consommé jusqu'au moment où le xylose a été complètement consommé. Noter que dans les cas où il est apparent que tout le xylose ne sera pas consommé durant la fermentation, alors la productivité est calculée du moment où il n'y a plus de glucose jusqu'au moment où il est apparent que le xylose n'est plus consommé.
 - Cette donnée est calculée directement des données de fermentation, il ne s'agit pas d'une analyse graphique comme dans le cas de la « Q_{Eth} @24h ».
 - L'incertitude sur la donnée est donc calculée en utilisant les règles de propagation d'erreurs.
- « Q_{Eth_Glu} »

- Est la productivité éthylique en catabolisme du glucose, ou encore productivité éthylique glucolytique. Est calculée comme étant la productivité d'éthanol à partir du début de la fermentation jusqu'à l'épuisement du glucose.
- Cette donnée est calculée directement des données de fermentation, il ne s'agit pas d'une analyse graphique comme dans le cas de la « $Q_{Eth} @24h$ ».
- L'incertitude sur la donnée est donc calculée en utilisant les règles de propagation d'erreurs.
- Sigle « NA »
 - Il s'agit de champs qui ne sont pas applicables dans le contexte présent. Par exemple, si la fermentation est complétée avant 48h, alors il n'y aura pas de productivité éthylique à 48h et 72h.
- Sigle « ND »
 - Il s'agit d'une donnée qui n'a pas pu être calculée dû à un manque de données, ou encore dû à une erreur dans les données sources les rendant non valides.

10. Annexe C : Résultats expérimentaux, analyse et discussion des séries d'essais #1 à #20

Cette section présente les tests effectués jusqu'à présent dans le cadre de ce projet de recherche. Les rationnelles, protocoles, résultats et conclusions seront détaillés pour chaque série d'essais. Une série d'essais consiste en un lot de tests dans lequel plusieurs conditions de fermentation sont testées afin d'investiguer l'impact de certains facteurs sur les performances de fermentation. Bien que les séries d'essais soient numérotées en ordre chronologique de leur réalisation (#1 à #19), la présente section est divisée en 4 parties regroupant les séries d'essais selon leur logique de réalisation :

- 1) **Regroupement #1** – Influence de la composition du milieu de culture sur les performances de fermentation;
- 2) **Regroupement #2** – Influence des paramètres environnementaux sur les performances de fermentation;
- 3) **Regroupement #3** – Impacte des inhibiteurs sur les performances de fermentation;
- 4) **Regroupement #4** – Impacte des méthodes de détoxifications des hydrolysats sur les performances de fermentation.

Chaque série d'essais est présentée selon un format standardisé. La première section explique la rationnelle ayant conduit à la réalisation de ces expériences; il s'agit d'une justification de la pertinence des tests effectués et du but visé. La deuxième section détaille le protocole utilisé sous forme de tableaux standardisés et de courtes explications contenant tous les détails permettant de répéter les expériences. La troisième section compile les résultats sous forme de tableaux détaillant les performances de chacune des conditions testées et les graphiques rapportant les substances les plus pertinentes à suivre lors d'une fermentation éthylique : glucose, xylose, éthanol, glycérol, acide acétique et la concentration cellulaire lorsque disponible. La quatrième section comporte une courte discussion des résultats, les conclusions pouvant être tirées des résultats et les recommandations.

10.1. Regroupement#1 : Essais portant sur la composition du milieu de fermentation

10.1.1. Série d'essais #1 : Effet du ratio glucose/xylose sur les performances de fermentation

Rationnelle

La fermentation éthylique des LCH focus principalement sur la conversion du glucose et du xylose en éthanol. De plus, sachant que LOMG1 a été conçue spécifiquement pour métaboliser ces deux saccharides, les cinétiques cataboliques de base doivent être investiguées. Comme il est connu que la concentration et la nature des sucres en solution influence l'expression de gènes chez les levures [Subtil et Boles, 2012], il est important d'investiguer ce phénomène chez LOMG1. De plus, sachant que LOMG1 ne peut pas croître en utilisant seulement le xylose comme source de carbone (résultats non montrés), une certaine concentration en glucose est nécessaire afin de permettre d'atteindre une biomasse appréciable, ainsi que pour maintenir la vitalité de cette biomasse.

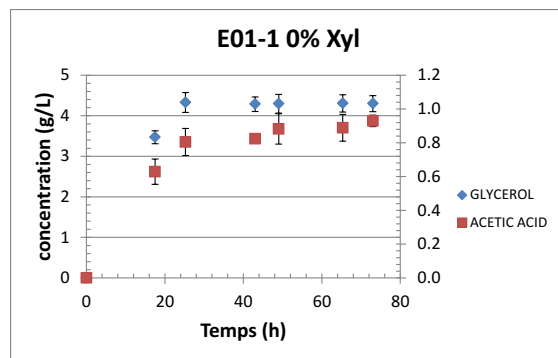
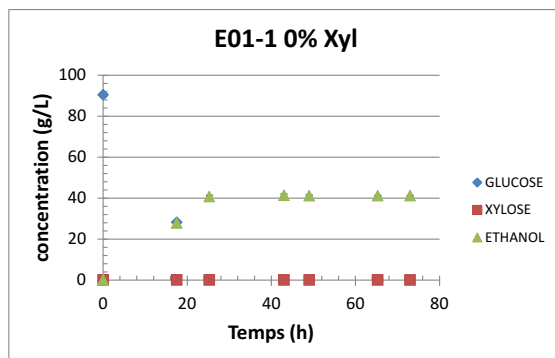
Dans cette optique, la série d'expériences Essais#01 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu synthétique (en opposition aux milieux composés exclusivement d'LCH), dont le ratio glucose :xylose varie. Il est important de savoir s'il existe un ratio permettant un rendement et une productivité maximale.

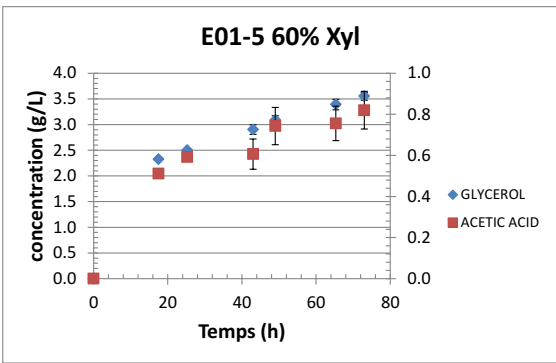
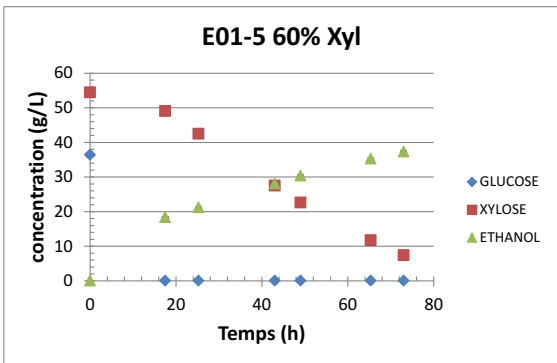
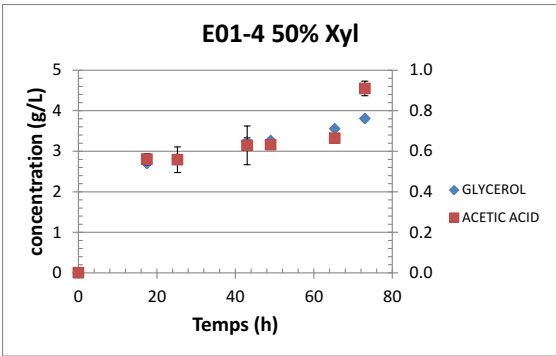
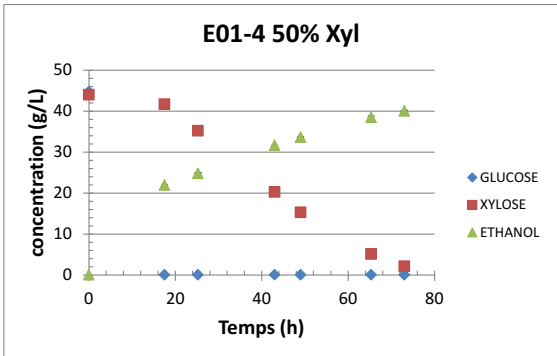
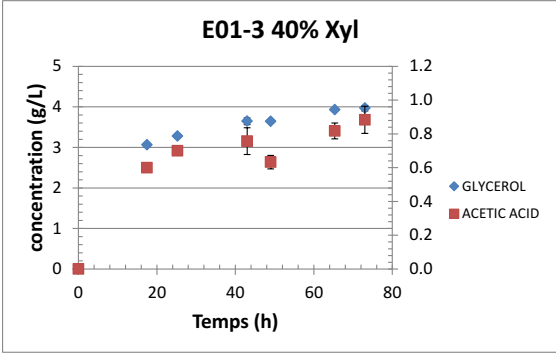
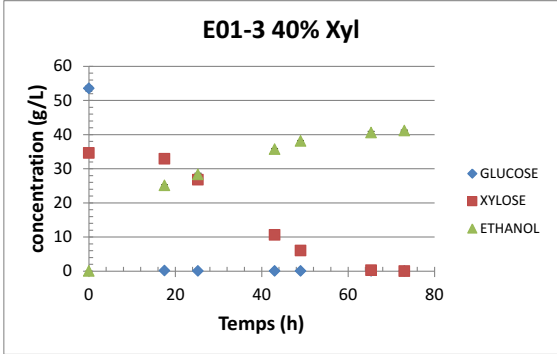
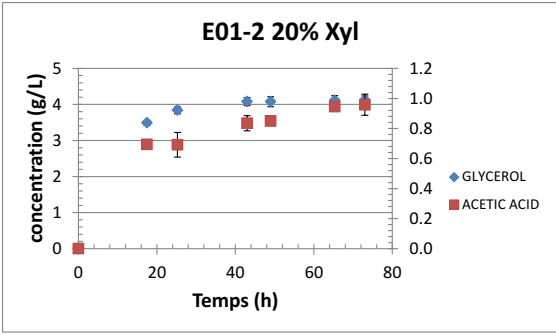
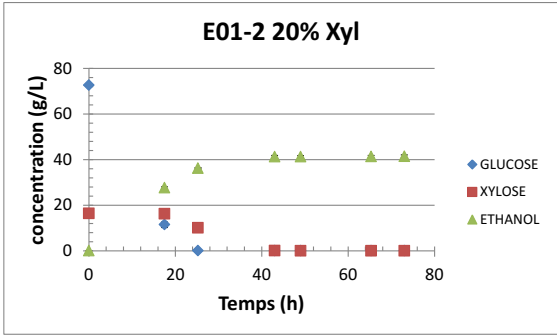
Protocole

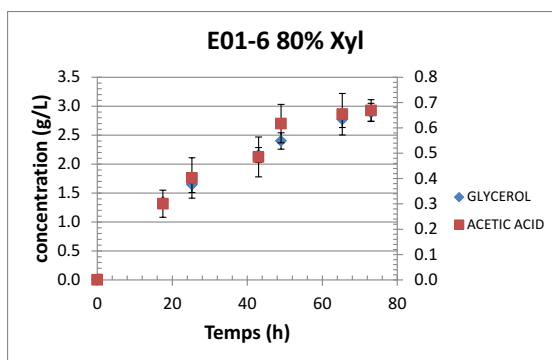
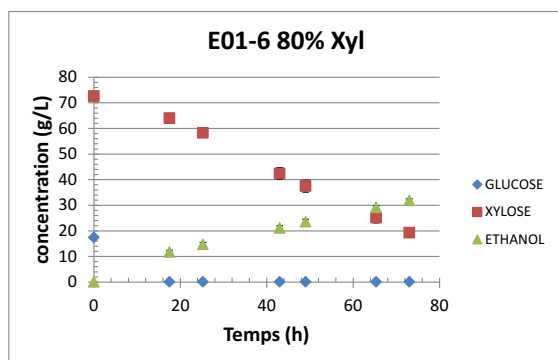
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	10	g/L
Urée	0.48	g/L
pH	5.5	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.44	$\times 10^8$ cell/ml
	0.84	g/L
Fermenteur	Erlenmeyer 250 ml	

#ID	Nom	Réplikas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E01-1	0% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	90.5	g/L sucres
				100:0	ratio Glu:Xyl
E01-2	20% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	89	g/L sucres
				82:18	ratio Glu:Xyl
E01-3	40% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	88	g/L sucres
				59:39	ratio Glu:Xyl
E01-4	50% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	88.5	g/L sucres
				50:50	ratio Glu:Xyl
E01-5	60% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	91	g/L sucres
				40:60	ratio Glu:Xyl
E01-6	80% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	90	g/L sucres
				19:81	ratio Glu:Xyl

Résultats







#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E01-1	0% Xyl	89.0%	1.67	NA	NA	NA	1.59	1.5%	0.03	NA	NA	NA	0.05
E01-2	20% Xyl	91.0%	1.46	0.85	NA	0.28	1.58	1.8%	0.01	0.01	NA	NA	0.02
E01-3	40% Xyl	91.3%	1.15	0.78	0.56	0.41	1.43	1.3%	0.01	0.00	0.00	0.01	0.02
E01-4	50% Xyl	90.5%	1.02	0.69	0.55	0.33	1.25	1.2%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E01-5	60% Xyl	87.4%	0.85	0.62	0.51	0.34	ND	1.6%	0.00	0.00	0.00	0.01	ND
E01-6	80% Xyl	88.0%	0.58	0.47	0.43	0.36	ND	4.2%	0.02	0.02	0.01	0.02	ND

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Le rendement éthylique des différents milieux testés est semblable jusqu'à un ratio en xylose : glucose de 50% (milieu E01-4), puis diminue légèrement jusqu'à un ratio de 80%. Par contre, cette observation est mitigée par le fait qu'il n'y a aucune différence significative entre les rendements éthyliques (les incertitudes s'entrecoupent toutes). De plus, la production de co-produits (HAc et glycérol) n'est pas plus importante dans les milieux contenant plus de xylose.
2. Les productivités à 24-48-72h suivent une tendance à laquelle on peut s'attendre sachant que la conversion xylose-éthanol est nettement moins rapide que la conversion glucose-éthanol. On observe que plus le ratio de xylose est élevé, plus la productivité éthylique diminue, car une plus grande partie de l'éthanol provient du xylose.
3. Les mesures des productivités éthyliques lors du catabolisme du glucose et du xylose sont estimées. Par contre, il faut mettre en garde qu'il est difficile de bien séparer les deux phases cataboliques, car il ne s'agit pas d'une diauxie classique et que le temps entre chaque échantillonnage est trop long pour donner une bonne précision de lecture. Ceci dit, en prenant les extrêmes (E01-1 et E01-6) il est possible d'estimer qu'en suivant ce protocole, la productivité est 4.4x (1.59/0.36) plus rapide pour la réaction glucose-éthanol que pour xylose-éthanol.
4. Malgré la méthode approximative du calcul des productivités lors des catabolismes du glucose ou du xylose, on peut corroborer ces résultats avec ceux de la série d'essais #3. Ce faisant, une tendance se dessine : un plus haut ratio de xylose diminue la productivité éthylique glycolytique.

10.1.2. Série d'essais #2 : Effet du Thin Stillage sur les performances de fermentation

Rationnelle

Il est anticipé que la fermentation d'LCH requerra un ajout de nutriments essentiels aux levures contenant principalement une source d'azote, du phosphore, des cofacteurs, des protéines essentielles et des minéraux essentiels. La source de carbone (les sucres) provenant des LCH, on envisage que ces suppléments représenteront un coût additionnel au procédé de fermentation des LCH. Conséquemment, une alternative moins coûteuse, telle qu'un rejet provenant d'un autre procédé, peut s'avérer intéressante. Le Thin Stillage est un effluent des procédés de fermentation MG. Il s'agit du surnageant de la bière, moins l'éthanol ayant été distillée. Ce résidu est connu pour ses valeurs nutritives, car il contient tous les solides dissous d'une fermentation de MG. Cet effluent pourrait conséquemment servir d'ajout nutritionnel au procédé de fermentation des LCH. Il serait optimal que cet ajout démontre des performances similaires à l'extrait de levure : un ajout nutritionnel complet traditionnellement utilisé dans les milieux de fermentation en laboratoire, mais une substance coûteuse à l'échelle industrielle. De plus, de bons résultats pourraient aussi pointer vers la possibilité de recycler directement le Thin Stillage provenant des fermentations d'LCH (au lieu de celui des MG) et ainsi permettre de réduire les effluents d'un procédé de fermentation des LCH.

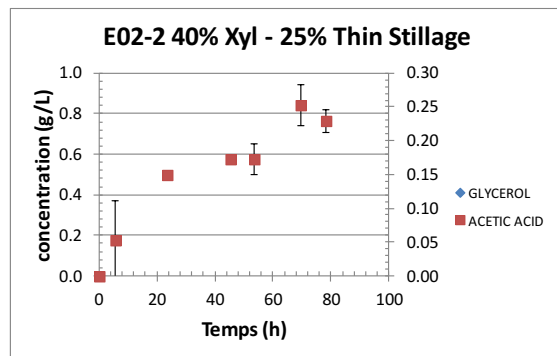
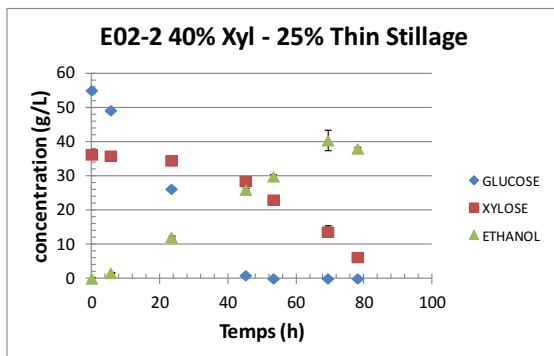
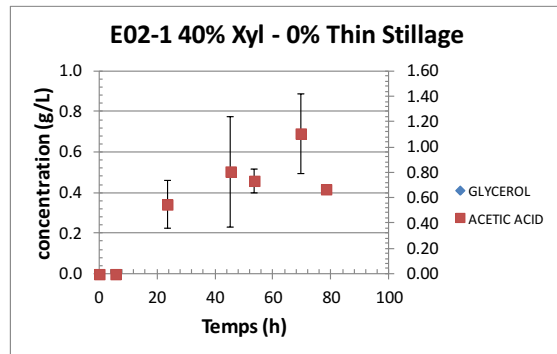
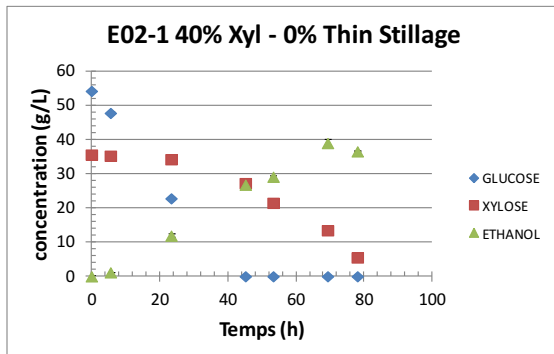
Dans cette optique, la série d'expériences Essais#02 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu synthétique, lequel est supplémenté en Thin Stillage. Il est important de savoir si cette substance est un ajout nutritionnel adéquat vu les répercussions économiques positives que cela aurait sur le procédé de fermentation des LCH.

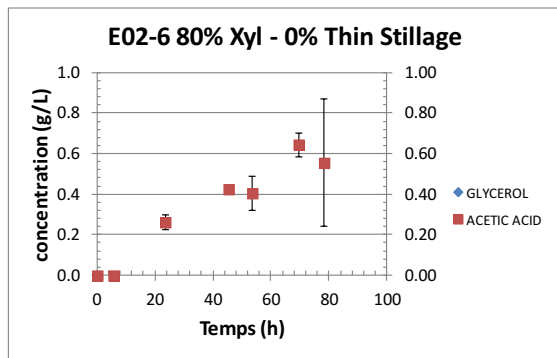
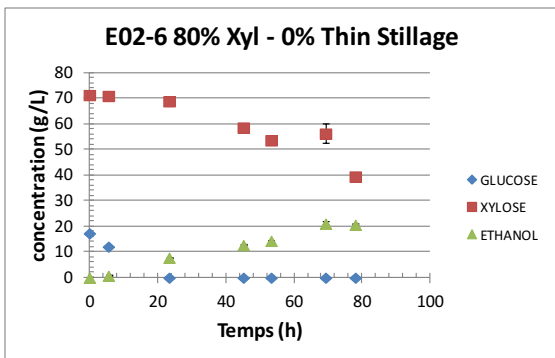
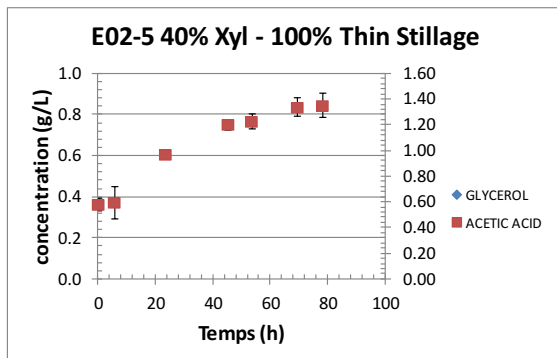
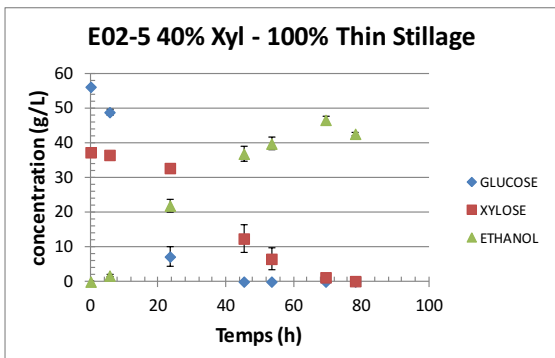
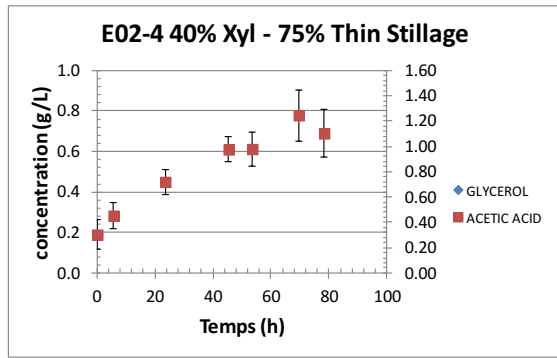
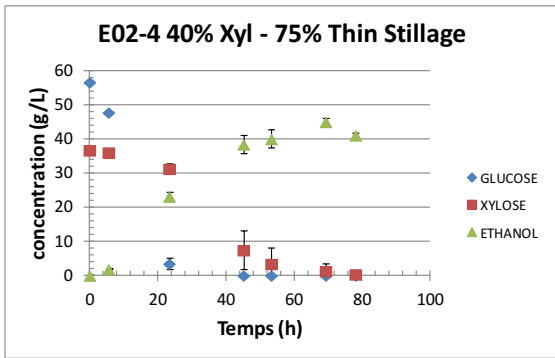
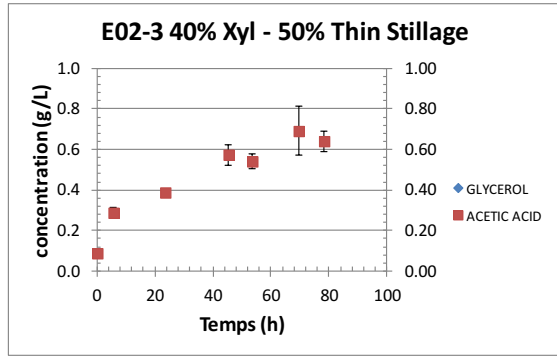
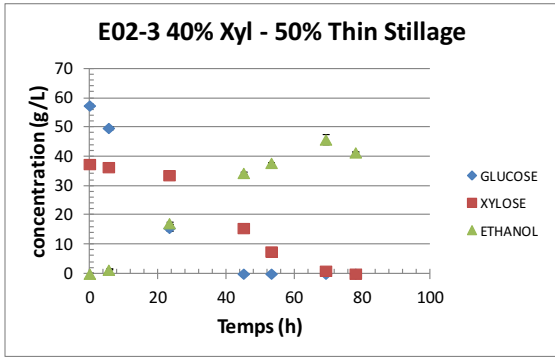
Protocole

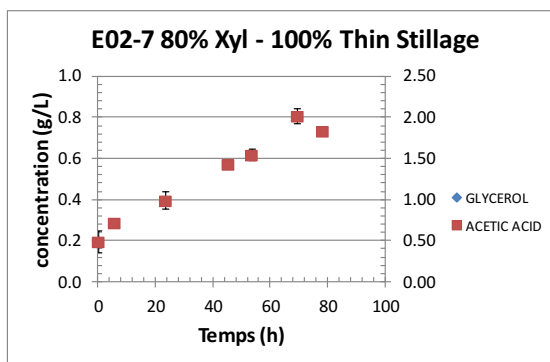
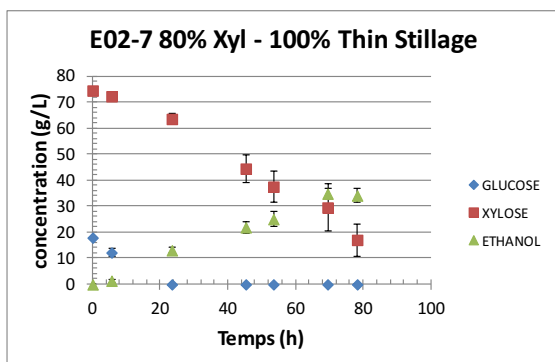
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	10	g/L
Urée	0.48	g/L
pH	5.5	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] cellulaire initiale (RN1016)	0.15	$\times 10^8$ cell/ml
Fermenteur	Erlenmeyer 250 ml	

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E02-1	40% Xyl - 0% Thin Stillage	3	Milieu de fermentation (MS)	90	<i>g/L sucres</i>
			Thin Stillage	60:40	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E02-2	40% Xyl - 25% Thin Stillage	3	Milieu de fermentation (MS)	91.5	<i>g/L sucres</i>
			Thin Stillage	60:40	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E02-3	40% Xyl - 50% Thin Stillage	3	Milieu de fermentation (MS)	95	<i>g/L sucres</i>
			Thin Stillage	61:39	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E02-4	40% Xyl - 75% Thin Stillage	3	Milieu de fermentation (MS)	93.5	<i>g/L sucres</i>
			Thin Stillage	61:39	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E02-5	40% Xyl - 100% Thin Stillage	3	Milieu de fermentation (MS)	93.5	<i>g/L sucres</i>
			Thin Stillage	60:40	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E02-6	80% Xyl - 0% Thin Stillage	3	Milieu de fermentation (MS)	89	<i>g/L sucres</i>
			Thin Stillage	20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E02-7	80% Xyl - 100% Thin Stillage	3	Milieu de fermentation (MS)	92	<i>g/L sucres</i>
			Thin Stillage	19:81	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Thin Stillage	100	<i>%v/v</i>

Résultats







#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E02-1	40% Xyl - 0% Thin Stillage	84.8%	0.50	0.57	0.48	0.30	0.51	1.27%	0.013	0.004	0.006	0.017	0.018
E02-2	40% Xyl - 25% Thin Stillage	87.4%	0.51	0.56	0.51	0.33	0.52	1.51%	0.028	0.005	0.021	0.029	0.011
E02-3	40% Xyl - 50% Thin Stillage	85.4%	0.65	0.73	0.57	0.47	0.74	0.70%	0.031	0.004	0.011	0.082	0.020
E02-4	40% Xyl - 75% Thin Stillage	86.4%	1.00	0.81	0.58	0.48	0.99	2.29%	0.052	0.039	0.009	0.052	0.058
E02-5	40% Xyl - 100% Thin Stillage	89.3%	0.94	0.78	0.59	0.40	0.94	1.28%	0.086	0.029	0.007	0.128	0.076
E02-6	80% Xyl - 0% Thin Stillage	82.3%	0.33	0.27	0.27	0.24	ND	2.31%	0.013	0.002	0.005	0.007	ND
E02-7	80% Xyl - 100% Thin Stillage	88.6%	0.55	0.48	0.48	0.39	ND	14.19%	0.087	0.036	0.023	0.069	ND

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. La concentration en Thin Stillage semble avoir un impact mineur sur le rendement éthylique de fermentation. En effet, en comptant l'incertitude sur les résultats, il est difficile de conclure sur l'impact de la concentration du Thin Stillage entre 25% et 100%. Par contre, les deux milieux n'ayant pas reçu d'ajout de Thin Stillage (E02-1 et E02-6) affichent systématiquement les rendements les plus bas. Le ratio des sucres ne semble pas avoir un impact significatif sur les rendements des milieux E02-1 et E02-6 ou E02-5 et E02-7, ce qui est supporté par d'autres séries d'essais (#1 et #3) démontrant que le ratio glucose :xylose n'affecte pas le rendement de fermentation.
2. Les productivités à 24-48-72h suivent une tendance claire. Noter que les productivités de 72h des milieux E02-3, 4 et 5 comptent cette phase de la fermentation où il ne reste quasiment plus de sucres (<5g/L) et où il est connu que la productivité plonge. Ainsi, un portrait plus représentatif est obtenu en analysant seulement les productivités 24h et 48h. On observe alors qu'une concentration en Thin Stillage de 75% est optimale.
3. Il est possible que la hausse en rendement et la relativement faible baisse en productivité du milieu E02-5 (100% Thin Stillage) par rapport au milieu E02-4 (75% Thin Stillage) soient expliquées par la plus haute concentration initiale en HAc. En effet, la littérature rapporte ce phénomène où une faible concentration initiale en HAc augmenterait le rendement et diminuerait faiblement la productivité.

4. Les mesures des productivités éthyliques glucolytique et xylolytique, bien qu'étant des valeurs approximatives, démontrent la même tendance.

10.1.3. Série d'essais #3 : Effet de la concentration initiale en sucres sur les performances de fermentation

Rationnelle

Lors de la fermentation d'LCH, il est trivial qu'une teneur initiale en sucres fermentables plus élevée amène une teneur finale en éthanol plus élevée dans la bière. Cela se traduit directement par un coût énergétique de distillation plus faible. Par contre, cela se traduit aussi par un coût de concentration des sucres plus élevé. Quant à l'impact de la teneur en sucres sur les performances de fermentation, cela doit aussi être déterminé. En effet, il est connu qu'une teneur en sucre trop élevée peut être nuisible aux levures. Ainsi, il est primordial d'investiguer la limite tolérable par LOMG1.

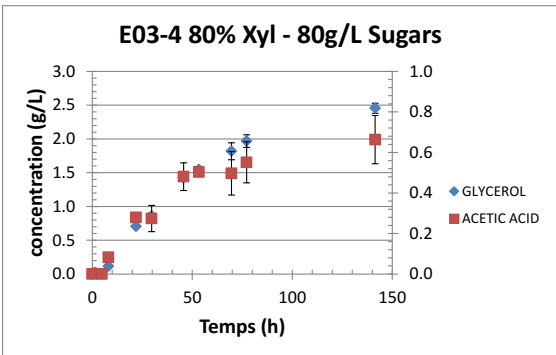
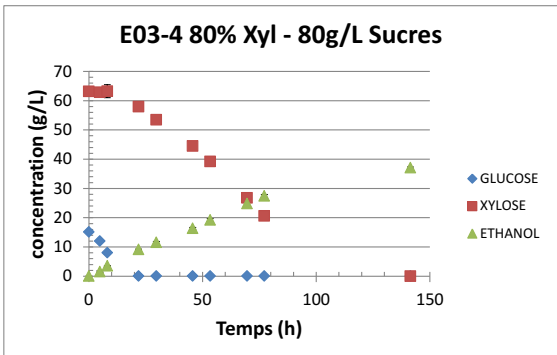
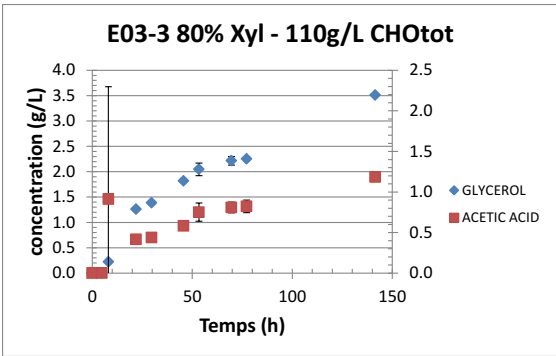
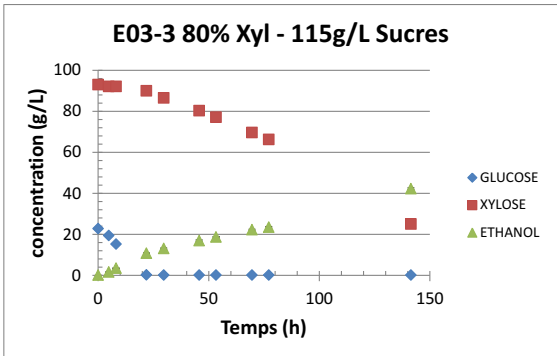
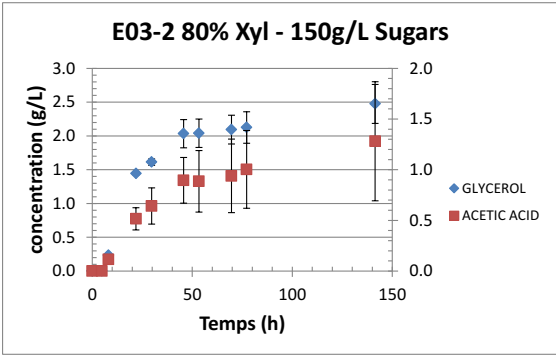
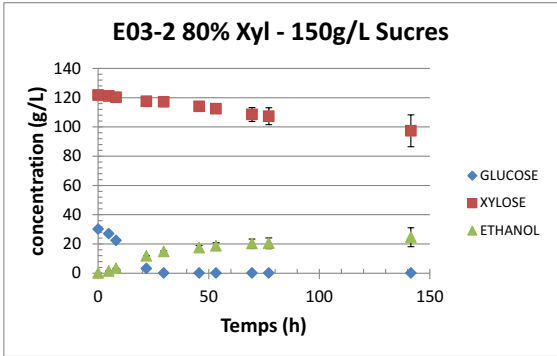
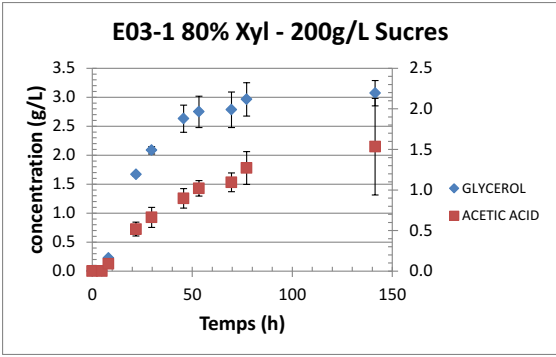
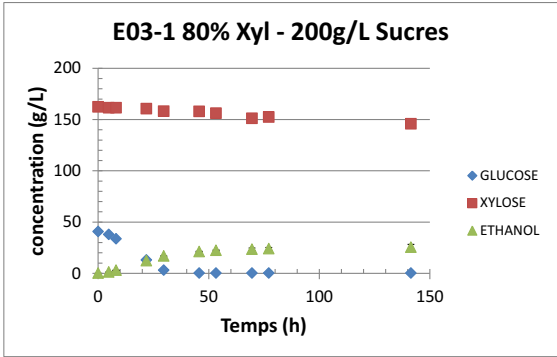
Dans cette optique, la série d'expériences Essais#03 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu synthétique, lequel contient une gamme de teneur initiale en sucres et différents ratio glucose :xylose. Il est important de connaître l'impact de la concentration initiale en sucres sur les performances de fermentation afin de permettre de trouver l'optimal économique à l'échelle industrielle.

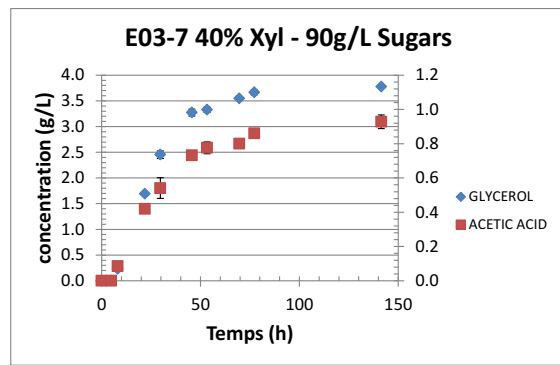
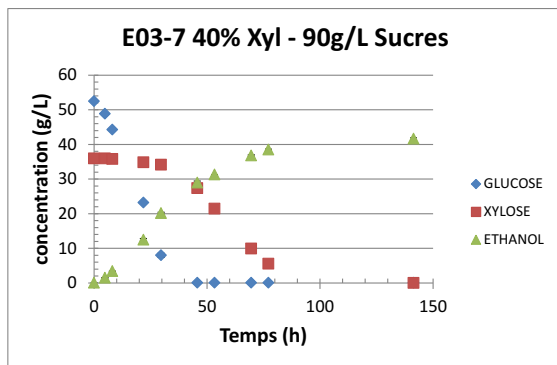
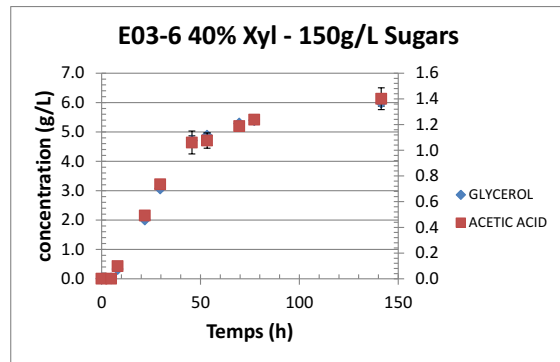
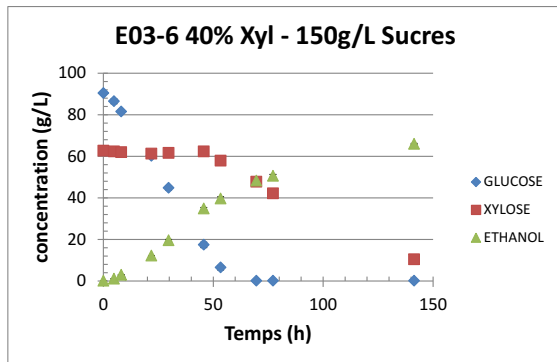
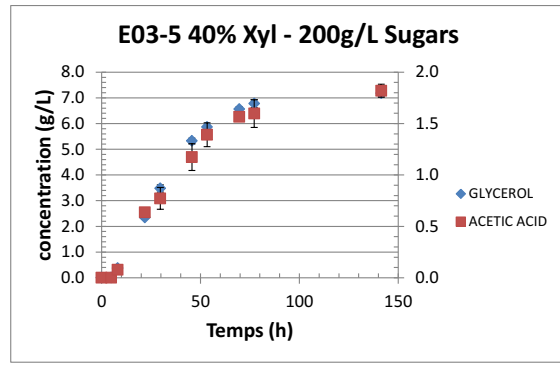
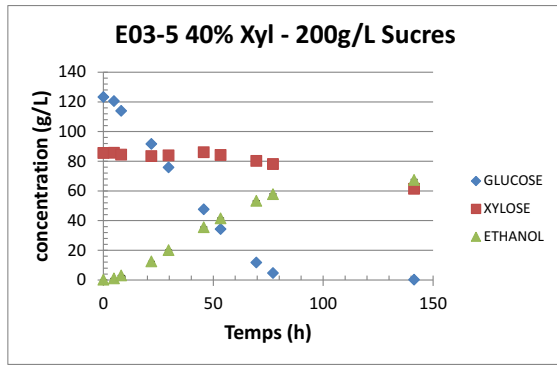
Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	10	g/L
Urée	0.48	g/L
pH	5.5	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.12	$\times 10^8$ cell/ml
Fermenteur	Erlenmeyer 250 ml	

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E03-1	80% Xyl - 200g/L Sucres	3	Milieu de fermentation (MS)	203	g/L sucres
				20:80	ratio Glu:Xyl
E03-2	80% Xyl - 150g/L Sucres	3	Milieu de fermentation (MS)	152	g/L sucres
				20:80	ratio Glu:Xyl
E03-3	80% Xyl - 115g/L Sucres	3	Milieu de fermentation (MS)	115.5	g/L sucres
				19:81	ratio Glu:Xyl
E03-4	80% Xyl - 80g/L Sucres	3	Milieu de fermentation (MS)	78.5	g/L sucres
				19:81	ratio Glu:Xyl
E03-5	40% Xyl - 200g/L Sucres	3	Milieu de fermentation (MS)	208.5	g/L sucres
				59:41	ratio Glu:Xyl
E03-6	40% Xyl - 150g/L Sucres	3	Milieu de fermentation (MS)	153	g/L sucres
				59:41	ratio Glu:Xyl
E03-7	40% Xyl - 90g/L Sucres	3	Milieu de fermentation (MS)	88.5	g/L sucres
				59:41	ratio Glu:Xyl

Résultats





#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E03-1	80% Xyl - 200g/L Sucres	87.0%	0.65	0.44	0.32	0.04	0.56	16.44%	0.005	0.007	0.013	0.035	0.001
E03-2	80% Xyl - 150g/L Sucres	88.4%	0.52	0.34	0.28	0.09	0.54	41.05%	0.010	0.026	0.033	0.063	0.005
E03-3	80% Xyl - 115g/L Sucres	91.0%	0.46	0.36	0.31	0.26	0.49	2.10%	0.007	0.006	0.003	0.007	0.029
E03-4	80% Xyl - 80g/L Sucres	92.6%	0.40	0.35	0.35	0.33	0.43	0.93%	0.007	0.006	0.005	0.013	0.018
E03-5	40% Xyl - 200g/L Sucres	89.4%	1.00	0.76	0.75	0.15	0.76	1.91%	0.012	0.005	0.003	0.016	0.002
E03-6	40% Xyl - 150g/L Sucres	90.4%	0.58	0.74	0.67	0.25	0.74	1.13%	0.008	0.010	0.008	0.016	0.017
E03-7	40% Xyl - 90g/L Sucres	92.0%	0.60	0.61	0.65	0.30	0.68	0.95%	0.009	0.005	0.003	0.021	0.010

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Les incertitudes sur les rendements éthyliques des milieux E03-1 et E03-2 sont très élevées; il faut donc analyser ces résultats en conséquence. Suivant cette mise en garde, il semble qu'une plus faible quantité en sucres génère un meilleur rendement et que le ratio de xylose ne l'influence pas. Cela corrobore les résultats de la série d'essais #1 et #2 quant à l'impact du ratio glucose :xylose sur les rendements de fermentation.
2. La productivité éthylique xylolytique augmente inversement à la teneur initiale en sucre. Quant à l'impact du ratio xylose :glucose sur cette mesure, les résultats sont mitigés, car il faut aussi prendre en compte les résultats des séries d'essais #1 et #2. Il est difficile de conclure, mais si effet il y a, il semble faible.
3. La productivité éthylique glucolytique diminue proportionnellement à la teneur initiale en sucre; bien que cette diminution soit légère. La hausse en productivité amenée par une plus grande concentration en glucose pourrait venir d'une plus grande croissance cellulaire ou encore du fait qu'une plus grande quantité de glucose permet une meilleure activité cellulaire en augmentant la durée d'exposition des cellules à leur source de carbone favorite.
4. En comparant la série de milieux à 80% de xylose vs celle à 40%, les données indiquent qu'un plus haut ratio de xylose diminue la productivité glucolytique (ex : E03-1 vs E02-5). Cela est corroboré par la série d'essais #1. Cela pourrait venir du fait que le xylose rivalise avec le glucose pour les transporteurs transmembranaires. Cependant, cela semble difficile à concevoir, vu la grande préférence de ces transporteurs pour le glucose. La section 3.2 de ce rapport présente une théorie alternative se basant sur la régulation des voies métaboliques chez la levure, qui en changeant durant les différentes phases de croissance, pourrait affecter les voies cataboliques du xylose.

10.1.4. Série d'essais #6 : Effet de la taille de l'inoculum sur les performances de fermentation

Rationnelle

Les performances de LOMG1 dans les séries d'essais précédentes se sont avérées être assez bonnes en comparaison à ce que l'on retrouve dans la littérature pour les différentes souches de *S. cerevisiae* GM. Par contre, en comparaison à la productivité éthylique des levures conventionnelles, la productivité de LOMG1 est très réduite; particulièrement pour la réaction xylose-éthanol. En effet, la productivité éthylique dans une distillerie de MG conventionnelle est d'environ 4.5 g/L-h [Boulet, 2013]. Plusieurs stratégies afin d'augmenter ces performances peuvent être employées : l'une d'elles étant l'augmentation de la taille de l'inoculum.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#06 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu synthétique et un milieu d'HH de Triticale, lesquels sont inoculés à différentes concentrations cellulaires initiales. Il est important de comprendre le lien entre la concentration cellulaire initiale et la productivité éthylique puisque cela a des répercussions économiques directes sur le procédé de fermentation d'LCH : une plus haute concentration initiale requérant un volume de propagation plus grand, mais permettant d'atteindre des concentrations élevées en éthanol plus rapidement.

Protocole

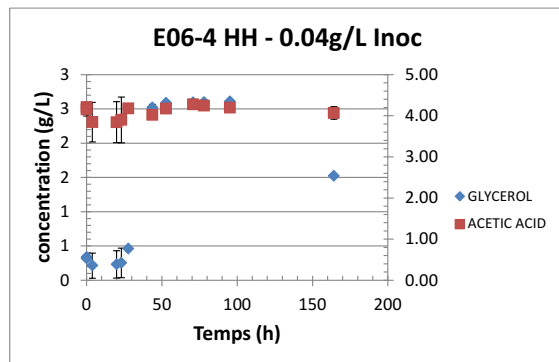
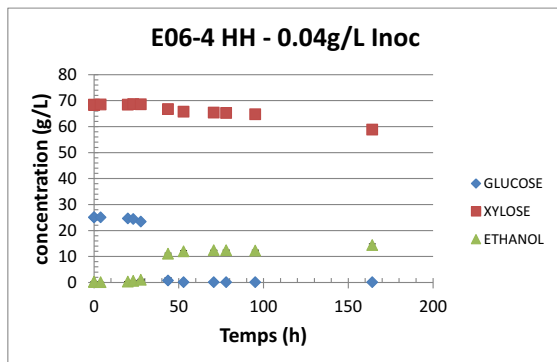
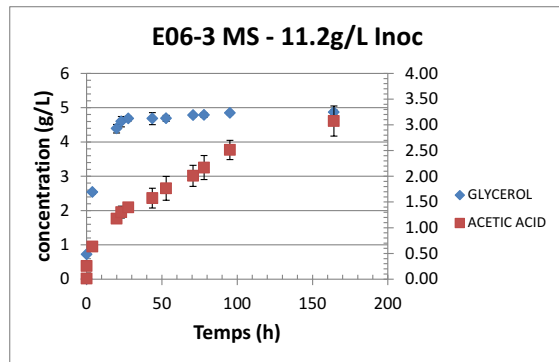
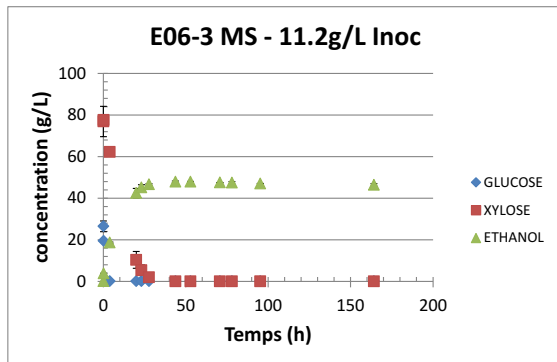
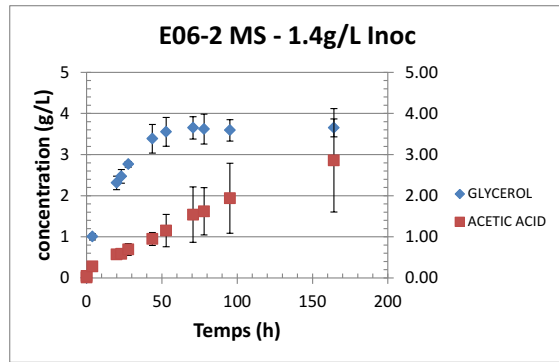
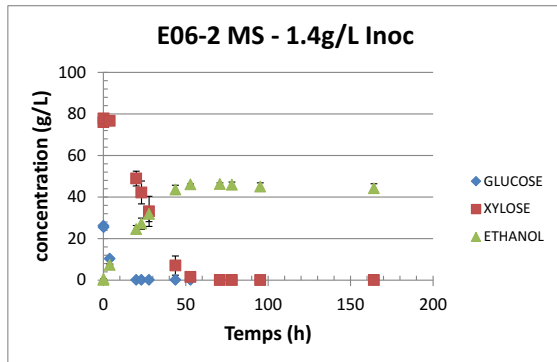
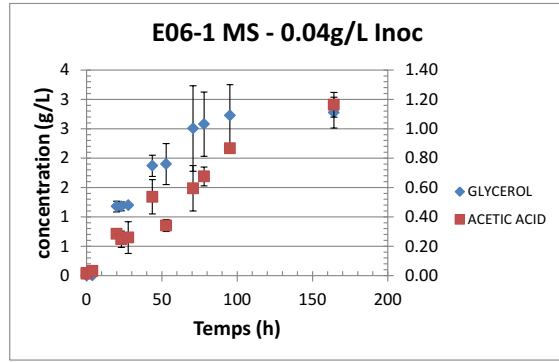
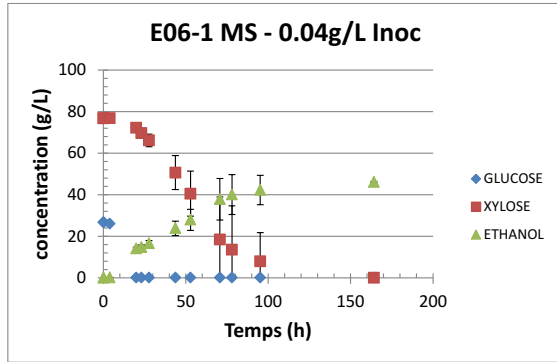
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
pH	6	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
Fermenteur	Erlenmeyer 150 ml	

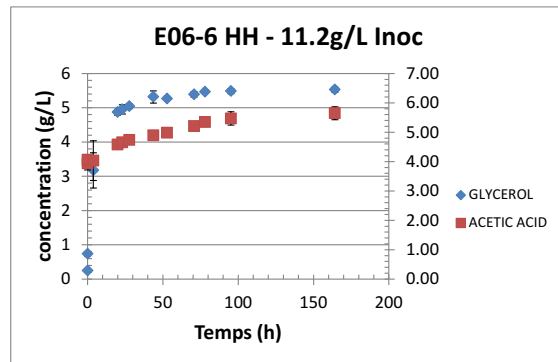
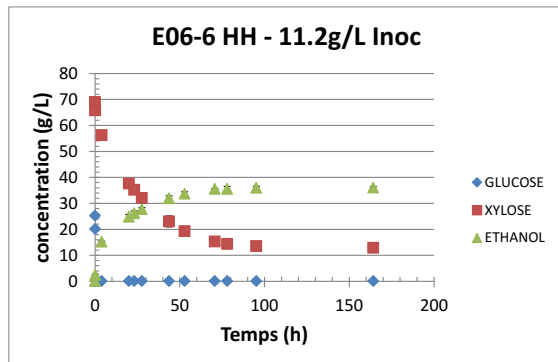
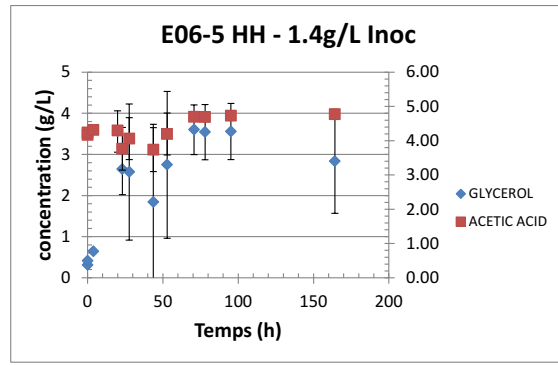
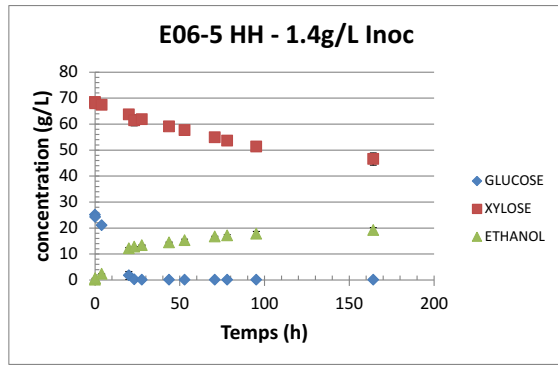
#ID	Nom	Répliquas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E06-1	MS - 0.04g/L Inoc	3	Milieu de fermentation (MS)	103.5	g/L
				26:74	ratio Glu:Xyl
			Extrait de Levures	10	g/L
			Urée	0.48	g/L
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.042	g/L
E06-2	MS - 1.4g/L Inoc	3	Milieu de fermentation (MS)	102	g/L
				26:74	ratio Glu:Xyl
			Extrait de Levures	10	g/L
			Urée	0.48	g/L
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	1.4	g/L
E06-3	MS - 11.2g/L Inoc	3	Milieu de fermentation (MS)	103.5	g/L
				26:74	ratio Glu:Xyl
			Extrait de Levures	10	g/L
			Urée	0.48	g/L
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	11.2	g/L
E06-4	HH - 0.04g/L Inoc	3	Milieu de fermentation (HH)	93.5	g/L
				27:73	ratio Glu:Xyl
			Extrait de Levures	-	g/L
			Urée	-	g/L
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.042	g/L
E06-5	HH - 1.4g/L Inoc	3	Milieu de fermentation (HH)	93.5	g/L
				27:73	ratio Glu:Xyl
			Extrait de Levures	-	g/L
			Urée	-	g/L
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	1.4	g/L
E06-6	HH - 11.2g/L Inoc	3	Milieu de fermentation (HH)	94	g/L
				27:73	ratio Glu:Xyl
			Extrait de Levures	-	g/L
			Urée	-	g/L
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	11.2	g/L

Fabrication des hydrolysats hémicellulosiques

1. Broyage de la biomasse (*Phalaris canariensis*; Alpsite);
2. Imprégnation à l'acide à basse concentration (1.8% H₂SO₄);
3. Étape d'explosion à la vapeur (haute pression / haute température);
4. Récupération de la fraction liquide et lavage;
5. Mélange des eaux de lavage et de la fraction liquide;
6. Neutralisation au CaCO₃;
7. Filtration et concentration au rotavapeur.

Résultats





#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E06-1	MS - 0.04g/L Inoc	87.0%	0.21	0.53	0.67	0.38	ND	0.89%	0.012	0.062	0.119	0.102	ND
E06-2	MS - 1.4g/L Inoc	84.4%	1.17	0.93	NA	0.27	1.87	6.41%	0.087	0.025	NA	0.049	0.186
E06-3	MS - 11.2g/L Inoc	87.7%	1.88	NA	NA	1.18	ND	7.74%	0.032	NA	NA	0.031	ND
E06-4	HH - 0.04g/L Inoc	80.0%	0.03	0.23	0.17	0.02	0.25	3.78%	0.005	0.005	0.002	0.008	0.011
E06-5	HH - 1.4g/L Inoc	79.8%	0.54	0.30	0.23	0.04	0.61	8.48%	0.004	0.005	0.003	0.009	0.019
E06-6	HH - 11.2g/L Inoc	86.7%	1.13	0.68	0.49	0.38	ND	1.74%	0.025	0.014	0.007	0.024	ND

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Le rendement éthylique est très similaire entre tous les milieux synthétiques. Il est réduit pour les milieux d'HH E06-4 et E06-5. Par contre, cela doit être évalué en tenant compte de la haute incertitude sur ces données. Les inhibiteurs des HH comptent principalement l'HAc et le furfural. Lors de ces essais, le furfural n'a pas été quantifié. La concentration initiale en HAc dans les milieux d'HH est d'environ 3.5 g/L, ce qui est reconnu comme suffisant pour causer une inhibition sérieuse de la croissance cellulaire.
2. Dans les milieux synthétiques, les productivités à 24-48-72h suivent une tendance à laquelle on peut s'attendre : augmentation de la productivité suivant une relation non linéaire avec la quantité initiale de cellules. En effet, la relation n'est pas linéaire puisque le taux de croissance et

la concentration finale en levures sont directement influencés par la quantité initiale en microorganismes. Ce phénomène est explicitement démontré dans la série d'essais #16.

3. Il est intéressant de remarquer que dans les milieux HH, il y a une période de latence marquée pour la fermentation avec inoculum de 0.04 g/L, mais cette période s'estompe à mesure que l'inoculum augmente. Il est souvent rapporté que les levures entrent en phase de latence lors de la fermentation d'LCH; cela afin de convertir les inhibiteurs comme le furfural et le 5-HMF en molécules moins toxiques pour les levures. Un autre facteur peut être le fait que le milieu de propagation et les milieux de fermentations d'LCH aient des compositions assez différentes, ce qui engendre une période d'adaptation chez les microorganismes.
4. Les mesures des productivités éthyliques glucolytique et du xylolytique sont estimées, mais ne fournissent pas vraiment de renseignement intéressant puisqu'elles ne peuvent pas toutes être calculées.
5. Les milieux E06-5 et E06-6 démontrent clairement un épuisement de la capacité des levures à pouvoir fermenter les HH. Cela indique soit que les hydrolysats sont toxiques aux levures et qu'elles ne peuvent y survivre très longtemps; ou encore un signe qu'après un certain temps de fermentation sans glucose, les levures perdent leur vitalité et arrêtent la fermentation. La réalité est probablement un mélange de ces deux phénomènes. En effet, les milieux E06-1 et E19-1 témoignent de ce phénomène. Le fait que dans plusieurs autres milieux testés il y a consommation complète des sucres s'explique probablement par le fait qu'il n'y avait pas assez de xylose initialement dans les milieux pour atteindre ce point d'épuisement. Néanmoins, cette remarque est très importante pour des fermentations à l'échelle industrielle afin de ne pas gaspiller de matière première.

10.1.5. Série d'essais #7 : Effet de la concentration en urée sur les performances de fermentation

Rationnelle

Les micro-nutriments essentiels à une bonne fermentation sont principalement : source de phosphore, source d'azote, source de cofacteurs essentiels et source d'acides aminés essentiels. D'un point de vue industriel, il est primordial de trouver une source de micro-nutriments bon marché. Par exemple, dans les distilleries de MG, seule une source d'azote excédentaire est ajoutée au milieu de fermentation; généralement sous forme d'ammoniac ou/et d'urée. Cela est possible puisque le maïs lui-même contient tous les autres micros et macros nutriments essentiels au bon métabolisme microbien. Dans un scénario optimal, il est possible d'imaginer la même chose pour un procédé de fermentation d'LCH; que le mélange des LCH et du recyclage des nutriments des fermentations précédentes (ex : Thin Stillage) permette d'éviter tous ajouts additionnels de nutriments. Les séries d'essais #2, #9 et #10 ont démontré l'effet bénéfique d'ajout de Thin Stillage ou de LIQ comme source de nutriments aux fermentations d'LCH. Si une telle stratégie est employée, seule l'addition d'une source d'azote (ex : urée) serait requise.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#07 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu synthétique et un milieu d'HH de Triticale; lesquels sont supplémentés à différentes concentrations d'urée. Le but est de trouver la concentration optimale en azote que requiert la fermentation d'LCH par LOMG1.

Protocole

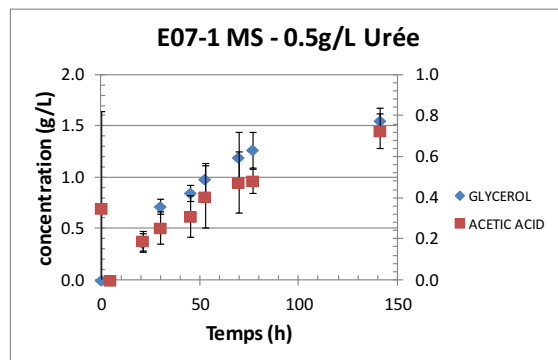
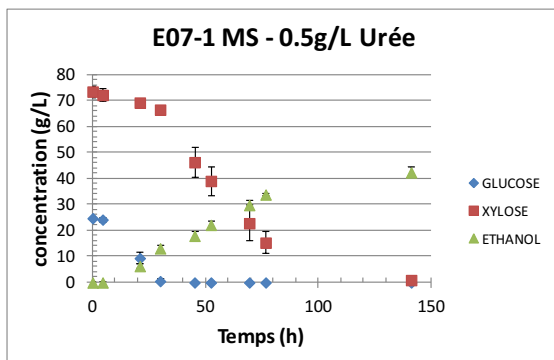
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de levure	10	g/L
pH	6	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	ND - protocole idem à E04 ~0.12x10 ⁸ cell/ml	
Fermenteur	Erlenmeyer 150 ml	

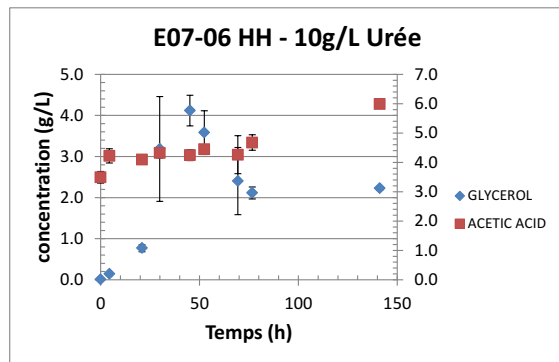
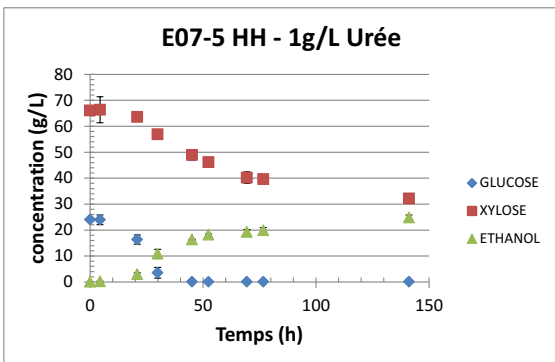
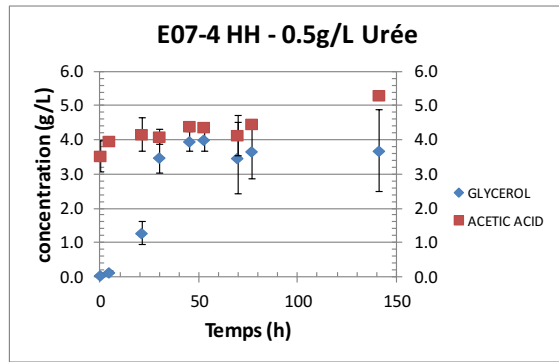
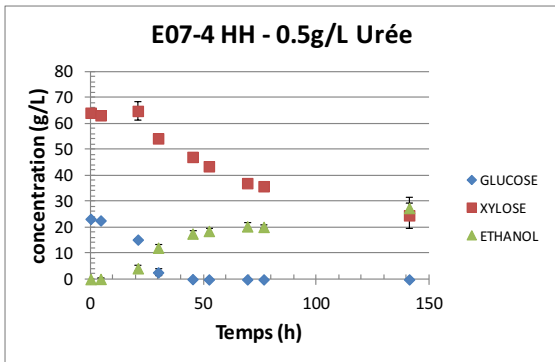
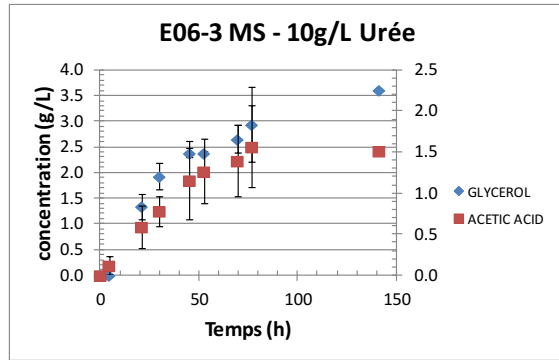
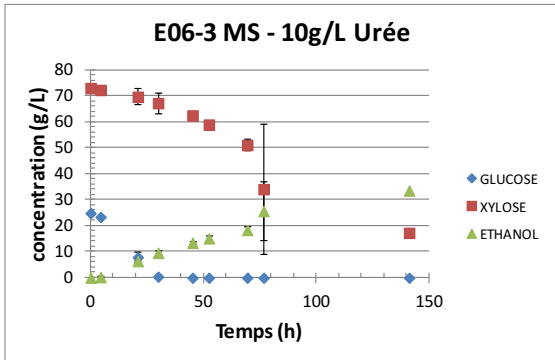
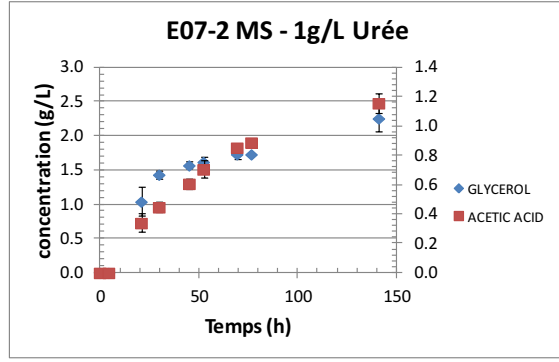
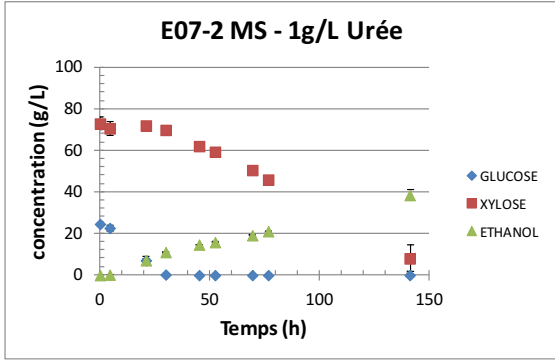
#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E07-1	MS - 0.5g/L Urée	3	Milieu de fermentation (MS)	98.5	g/L sucres
			Urée	0.5	g/L
E07-2	MS - 1g/L Urée	3	Milieu de fermentation (MS)	98	g/L sucres
			Urée	1	g/L
E07-3	MS - 10g/L Urée	3	Milieu de fermentation (MS)	98	g/L sucres
			Urée	5	g/L
E07-4	HH - 0.5g/L Urée	3	Milieu de fermentation (HH)	87.5	g/L sucres
			Urée	0.5	g/L
E07-5	HH - 1g/L Urée	3	Milieu de fermentation (HH)	87.5	g/L sucres
			Urée	1	g/L
E07-6	HH - 10g/L Urée	3	Milieu de fermentation (HH)	90	g/L sucres
			Urée	5	g/L

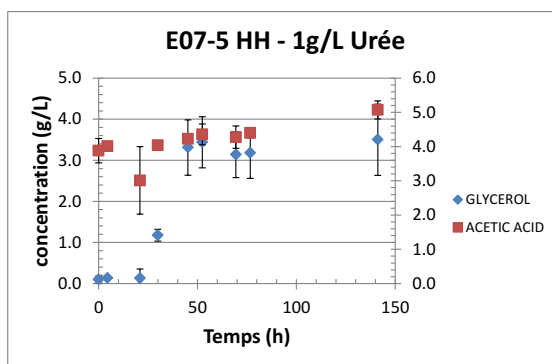
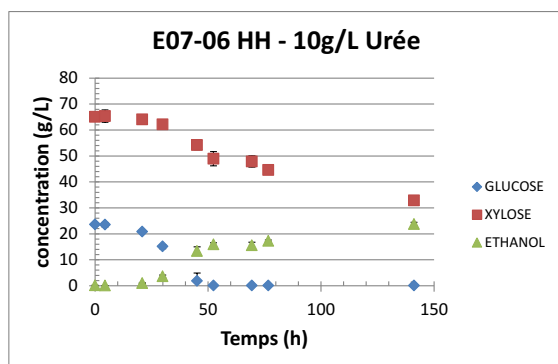
Fabrication des hydrolysats

Idem à la série d'essais #06.

Résultats







#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E07-1	MS - 0.5g/L Urée	85.2%	0.34	0.40	0.43	0.51	0.44	6.37%	0.027	0.023	0.012	0.073	0.042
E07-2	MS - 1g/L Urée	84.1%	0.34	0.31	0.28	0.25	0.37	12.29%	0.021	0.002	0.002	0.027	0.013
E07-3	MS - 10g/L Urée	81.4%	0.31	0.29	0.26	0.21	0.32	ND	0.014	0.011	0.066	ND	0.024
E07-4	HH - 0.5g/L Urée	85.2%	0.29	0.38	0.28	0.10	0.40	20.52%	0.029	0.015	0.011	0.056	0.049
E07-5	HH - 1g/L Urée	83.6%	0.22	0.35	0.27	0.09	0.36	6.48%	0.028	0.005	0.010	0.013	0.058
E07-6	HH - 10g/L Urée	82.7%	0.06	0.29	0.23	0.09	0.12	4.43%	0.008	0.019	0.010	0.016	0.023

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Afin de déterminer l'effet de l'urée sur le rendement éthylique, il est nécessaire de se baser sur les valeurs moyennes de rendement et sur la production de co-produits. En effet, l'incertitude élevée sur les mesures de rendements ne permet pas de conclure directement qu'il y a une relation inverse entre le rendement et la concentration en azote. Par contre, si l'on ajoute à cela le fait que les milieux ayant plus d'urée produisent une plus grande quantité de co-produits (glycérol et HAc), cela implique nécessairement un rendement inférieur.
2. Les rendements des milieux d'HH ne sont pas significativement inférieurs à celui des MS correspondants. Ce fait supporte ce qui est retrouvé dans la littérature; que l'HAc et le furfural agissent principalement sur la productivité, et que seul le furfural diminue significativement le rendement.
3. Les productivités à 24-48-72h ont tendance à diminuer lorsque la quantité d'urée augmente. Encore une fois, l'incertitude sur ces mesures est grande et l'analyse doit en tenir compte.
4. Les mesures des productivités éthyliques lors du catabolisme du glucose et du xylose sont estimées. Il est intéressant de noter que l'augmentation d'urée semble affecter de façon plus sévère la consommation de xylose que celle de glucose. Cela est une observation s'appliquant à plusieurs séries d'essais : la présence de stress, sous forme d'inhibiteurs ou de paramètre environnemental, affectera de façon beaucoup plus sévère le métabolisme du xylose que celui du glucose.
5. La productivité éthylique xylolytique pour les milieux synthétiques est nettement plus élevée en comparaison à celle du glucose que dans la majorité des autres séries d'essais comparables. En

analysant les figures de suivi de fermentation, on retrouve deux phénomènes expliquant cela : une courte phase de latence en début de fermentation qui diminue nécessairement la productivité éthylique glucolytique et une consommation non négligeable de xylose avant l'épuisement du glucose. Ces deux phénomènes diminuent le résultat du calcul de la productivité lors du catabolisme du glucose et augmentent celui du xylose.

6. Malgré toutes les imperfections de ces résultats, il est possible de conclure qu'une concentration en urée de ≤ 0.5 g/L est optimale pour une fermentation avec LOMG1.

10.1.6. Série d'essais #8 : Effet de la source de carbone (glucose vs xylose) lors de la propagation sur les performances de fermentation

Rationnelle

Il est reconnu que des microorganismes ayant été propagés (étape de croissance de la biomasse servant d'inoculum) dans des milieux de culture semblables à ceux dans lesquels ils seront utilisés lors de l'étape de la fermentation peuvent démontrer de meilleures performances. Cet effet est principalement attribué à une diminution du stress que subissent les microorganismes, lorsqu'exposés à de nouveaux environnements; période durant laquelle la machinerie métabolique est réorganisée en fonction du nouvel environnement. Cela se traduit par une phase de latence accrue et une diminution du taux de croissance. Sachant que LOMG1 est un OGM dont le métabolisme a été dirigé afin de permettre la consommation de xylose, il serait possible que ses performances de fermentation soient accrues, si son milieu de propagation contenait du xylose, et non seulement du glucose. Par contre, il est important de garder en tête que cette souche de levure est incapable de croître seulement sur le xylose.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#08 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu synthétique et un milieu d'HH de Triticale; lesquels sont inoculés avec des levures ayant été propagées soit dans un milieu exclusivement de glucose, ou un milieu contenant du xylose en plus du glucose. Le but est de trouver si la présence de xylose lors de la propagation affecte les performances de fermentation.

Protocole

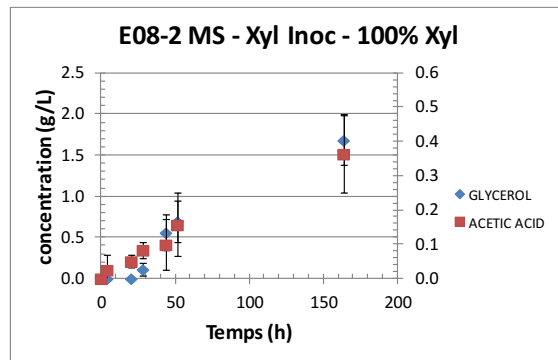
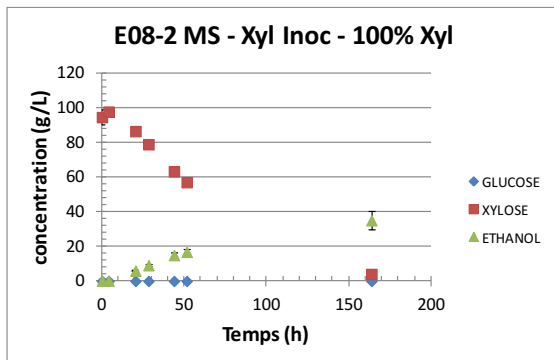
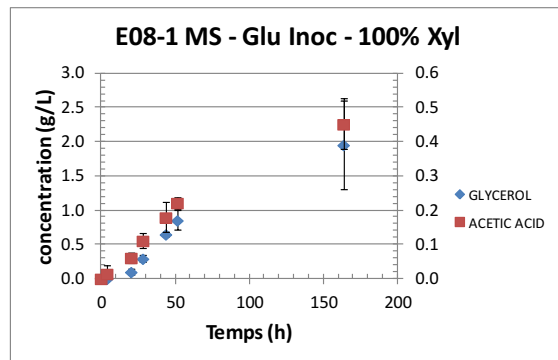
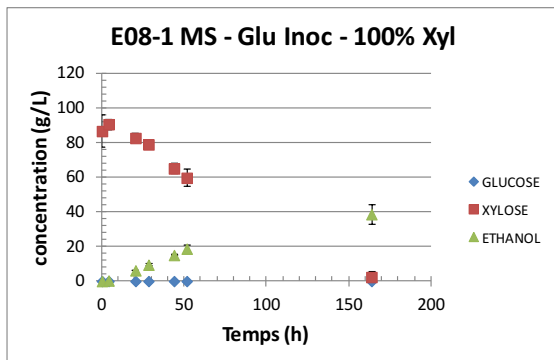
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	10	g/L
Urée	1	g/L
pH	6	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	1.2	g/L
Propagation avec diff. source de carbone		
Fermenteur	Erlenmeyer 150 ml	

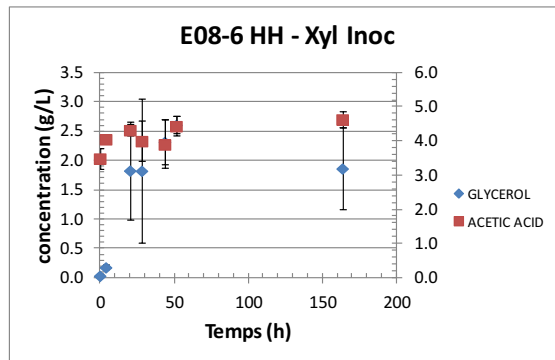
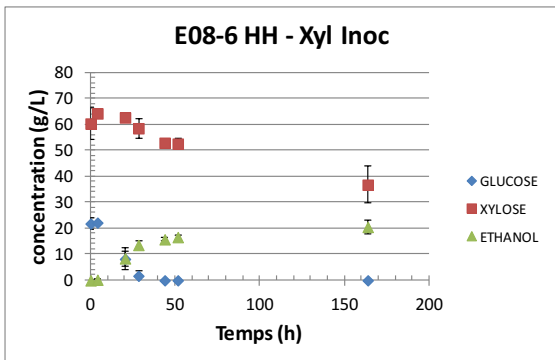
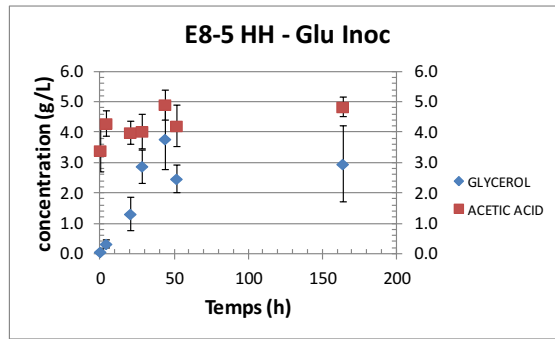
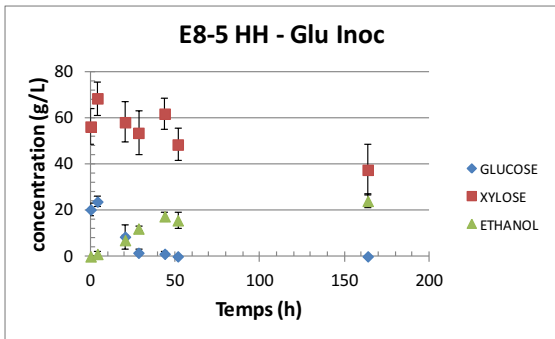
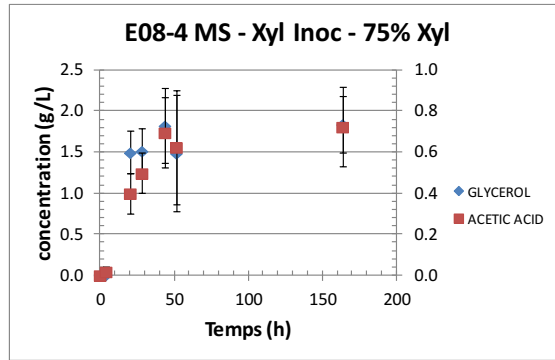
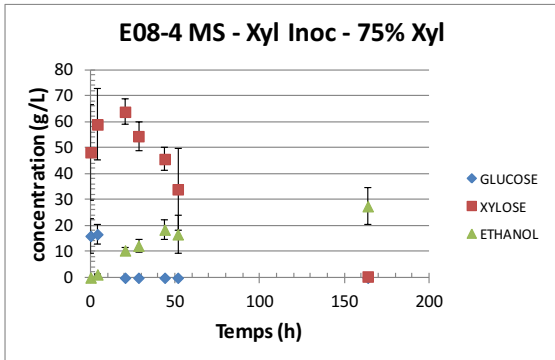
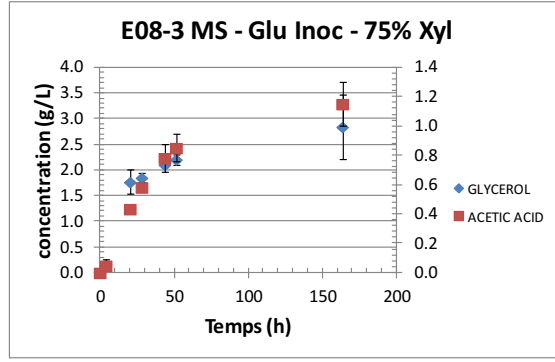
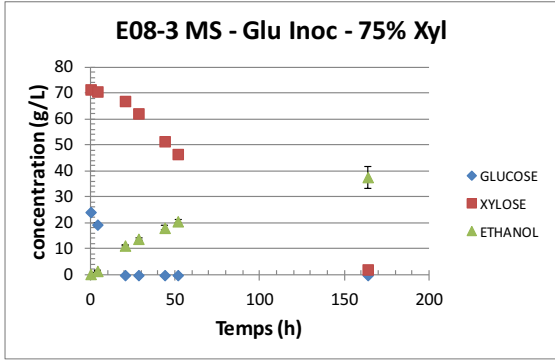
#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E08-1	MS - Glu Inoc - 100% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	87	<i>g/L sucres</i>
			Source de carbone dans la propagation	0:100	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E08-2	MS - Xyl Inoc - 100% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	94.5	<i>g/L sucres</i>
			Source de carbone dans la propagation	0:100	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E08-3	MS - Glu Inoc - 75% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	12.5:87.5	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Source de carbone dans la propagation	25:75	<i>ratio Glu:Xyl</i>
E08-4	MS - Xyl Inoc - 75% Xyl	3	Milieu de fermentation (MS)	100:0	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Source de carbone dans la propagation	64.5	<i>g/L sucres</i>
E08-5	HH - Glu Inoc	3	Milieu de fermentation (HH)	25:75	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Source de carbone dans la propagation	76	<i>g/L sucres</i>
E08-6	HH - Xyl Inoc	3	Milieu de fermentation (HH)	27:73	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Source de carbone dans la propagation	82.5	<i>g/L sucres</i>
			Source de carbone dans la propagation	100:0	<i>ratio Glu:Xyl</i>
				27:73	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Source de carbone dans la propagation	12.5:87.5	<i>ratio Glu:Xyl</i>

Fabrication des hydrolysats

Idem à la série d'essais #06.

Résultats





#ID	Nom	Performances					Erreur Absolue						
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E08-1	MS - Glu Inoc - 100% Xyl	89.6%	0.31	0.35	0.31	0.39	NA	24.02%	0.010	0.020	0.027	0.044	NA
E08-2	MS - Xyl Inoc - 100% Xyl	75.2%	0.29	0.33	0.28	0.35	NA	15.25%	0.016	0.018	0.023	0.035	NA
E08-3	MS - Glu Inoc - 75% Xyl	77.9%	0.51	0.41	0.33	0.30	0.54	10.02%	0.008	0.011	0.015	0.026	0.032
E08-4	MS - Xyl Inoc - 75% Xyl	83.9%	0.46	0.39	0.28	ND	ND	47.34%	0.047	0.084	0.084	ND	ND
E08-5	HH - Glu Inoc	120.6%	0.40	0.36	0.26	ND	0.43	57.83%	0.052	0.042	0.041	ND	0.038
E08-6	HH - Xyl Inoc	88.5%	0.44	0.33	0.24	0.04	0.48	30.65%	0.073	0.012	0.014	0.029	0.053

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Il est difficile de justifier les incertitudes observées sur les mesures des milieux E08-4, 5 et 6. Cela ne peut être expliqué que par des erreurs de manipulations expérimentales. Ceci dit, les milieux E08-1, 2 et 3 offrent des résultats intéressants et seront analysés ici.
2. La nature des sucres présents dans l'inoculum ne semble pas affecter les rendements ou les cinétiques de fermentation. Un argument pourrait être fait disant que la présence de xylose dans le milieu de propagation pourrait diminuer la quantité de biomasses produite ou diminuer la vitalité des cellules en réplication. Ainsi, si le xylose n'apporte rien lors de l'étape de propagation, il ne semble pas y avoir de raison valable de l'ajouter s'il n'est pas déjà présent. Par contre, cela indique aussi que si on n'a pas le choix d'avoir du xylose dans le milieu de propagation, alors cela ne devrait pas avoir de répercussions majeures sur la fermentation, aussi longtemps que la biomasse et la vitalité voulue sont atteintes.

10.1.7. Série d'essais #9 : Effet du Thin Stillage sur les performances de fermentation d'hydrolysats celluloseux

Rationnelle

La production d'éthanol lignocellulosique peut se faire en fermentant les hydrolysats hémicellulosiques et celluloseux ensemble ou séparément. La fraction celluloseuse est généralement considérée plus facilement fermentable, puisqu'elle est composée en quasi-totalité de glucose, en plus du fait qu'elle contient une teneur plus faible en inhibiteurs (principalement 5-HMF et acide lévulinique). Par contre, tout comme la fraction hémicellulosique, elle ne contient pas tous les nutriments essentiels au bon fonctionnement des levures. Le Thin Stillage est proposé comme un supplément nutritionnel intéressant pour la fermentation éthylique des hydrolysats celluloseux, tout comme pour la fraction hémicellulosiques (voir série d'essais #2).

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#09 investigate les performances de LOMG1 et de GOLD (levure commerciale pour la fermentation de MG) dans un milieu d'HC de Triticale; lesquels sont supplémentés avec différente concentration de Thin Stillage. Il est important de connaître les cinétiques de fermentation des HC, car un procédé de fermentation d'LCH à l'échelle industrielle pourrait se faire en fermentant séparément les HC et les HH.

Protocole

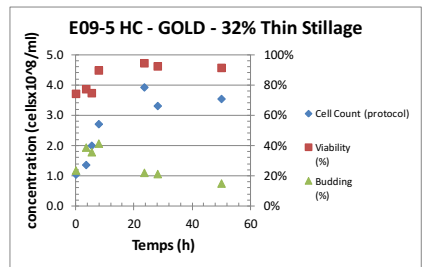
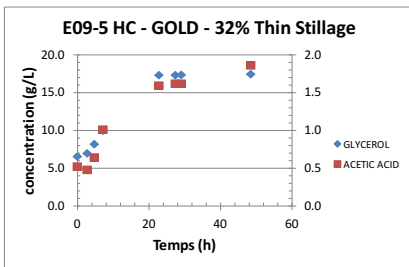
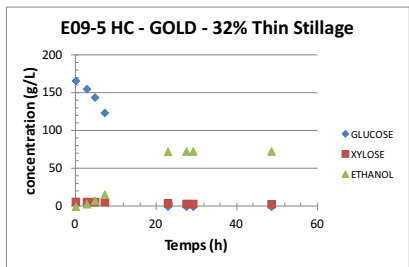
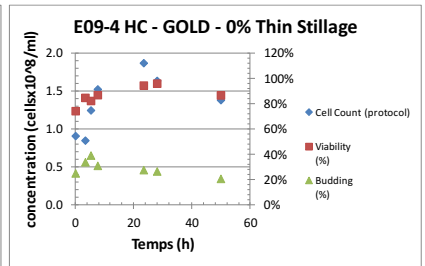
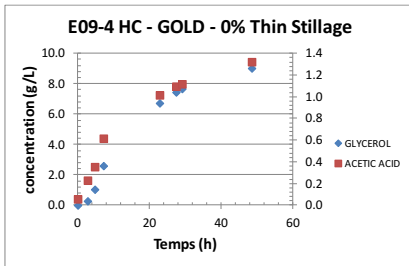
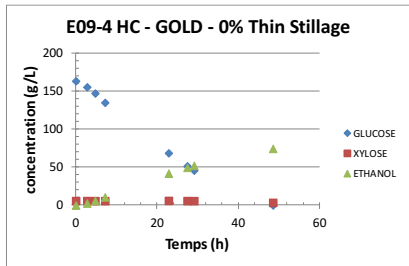
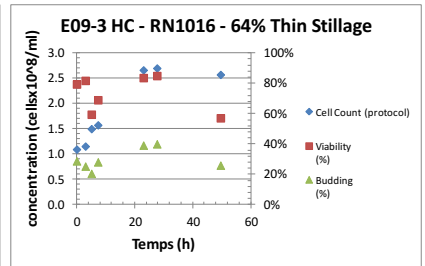
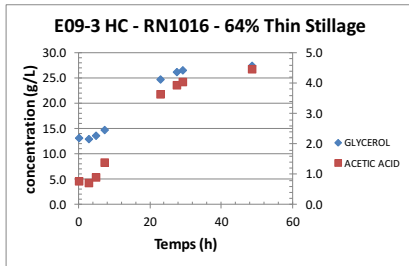
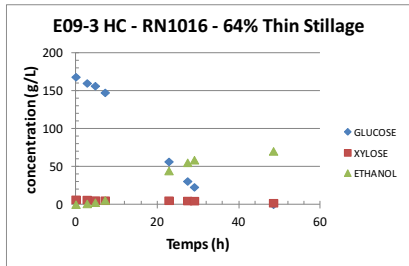
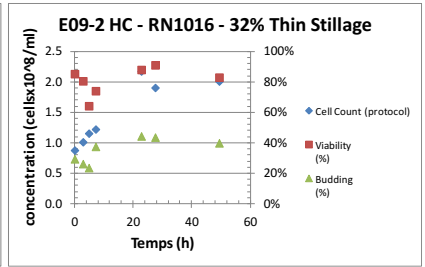
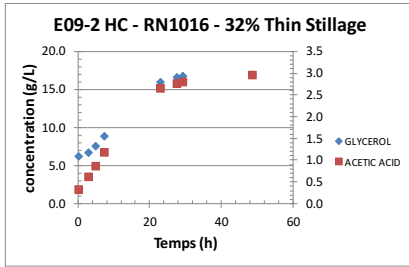
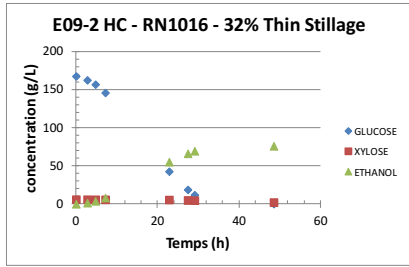
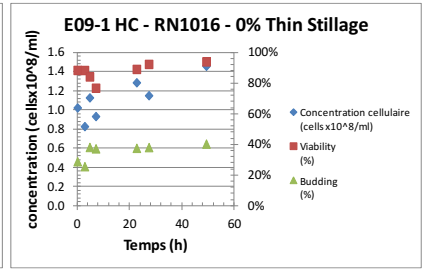
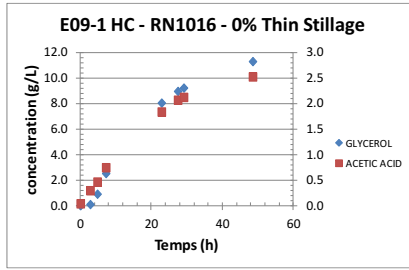
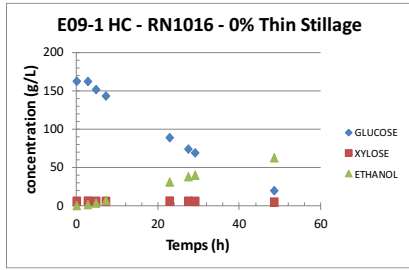
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Urée	0.5	g/L
Lactrol	0.1	g/L
pH	5.5	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale	2.1	g/L
Fermenteur	150ml Erlen	

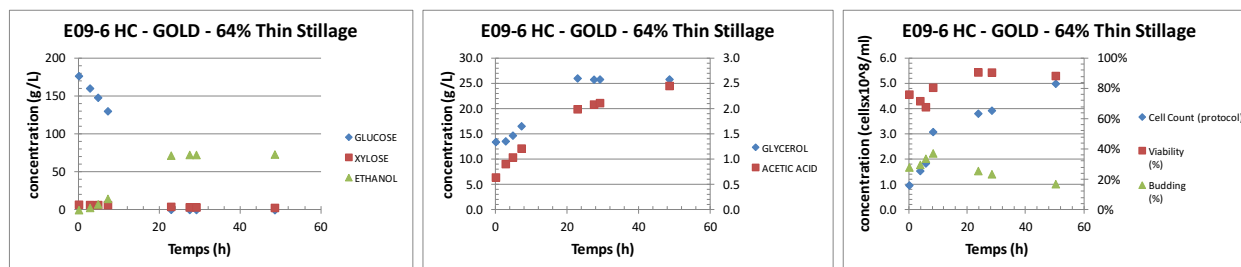
#ID	Nom	Répliques	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E09-1	HC - RN1016 - 0% Thin Stillage	1	Milieu de fermentation (HC)	168	g/L sucres
			Thin Stillage	97:3	ratio Glu:Xyl
			Souche de levure	0	% m/m
E09-2	HC - RN1016 - 32% Thin Stillage	1	Milieu de fermentation (HC)	174	g/L sucres
			Thin Stillage	97:3	ratio Glu:Xyl
			Souche de levure	32	% m/m
E09-3	HC - RN1016 - 64% Thin Stillage	1	Milieu de fermentation (HC)	175	g/L sucres
			Thin Stillage	97:3	ratio Glu:Xyl
			Souche de levure	64	% m/m
E09-4	HC - GOLD - 0% Thin Stillage	1	Milieu de fermentation (HC)	169.5	g/L sucres
			Thin Stillage	97:3	ratio Glu:Xyl
			Souche de levure	0	% m/m
E09-5	HC - GOLD - 32% Thin Stillage	1	Milieu de fermentation (HC)	172.5	g/L sucres
			Thin Stillage	97:3	ratio Glu:Xyl
			Souche de levure	32	% m/m
E09-6	HC - GOLD - 64% Thin Stillage	1	Milieu de fermentation (HC)	184.5	g/L sucres
			Thin Stillage	97:3	ratio Glu:Xyl
			Souche de levure	64	% m/m

Fabrication des hydrolysats cellulosiques

1. Séparation des hémicelluloses (voir section 10.1.4 « Fabrication des hydrolysats hémicellulosiques »);
2. Imprégnation de la fraction solide résiduelle (lignine + cellulose) au NaOH;
3. Explosion à la vapeur (190C, 3min);
4. Séparation L/S et lavage, ce qui retire la lignine;
5. Hydrolyse de la fraction solide restante (cellulose) dans un bain d'acide concentré;
6. Filtration et neutralisation de la fraction liquide contenant la cellulose hydrolysée;
7. Concentration des sucres.

Résultats





#ID	Nom	Performances					Erreur Absolue						
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E09-1	HC - RN1016 - 0% Thin Stillage	84.8%	1.35	1.30	NA	NA	1.29	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E09-2	HC - RN1016 - 32% Thin Stillage	86.8%	2.40	NA	NA	NA	2.40	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E09-3	HC - RN1016 - 64% Thin Stillage	79.5%	1.96	NA	NA	NA	2.02	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E09-4	HC - GOLD - 0% Thin Stillage	87.9%	1.79	NA	NA	NA	1.80	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E09-5	HC - GOLD - 32% Thin Stillage	84.3%	3.04	NA	NA	NA	3.18	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E09-6	HC - GOLD - 64% Thin Stillage	79.2%	3.08	NA	NA	NA	3.15	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. L'analyse des données doit être faite en prenant en compte que ces tests ont été réalisés en un seul répliqua.
2. Le rendement éthylique est semblable pour des concentrations de Thin Stillage de 0% à 32%, mais semble diminuer à une concentration de 64%. Cela va à l'encontre des résultats de la série d'essais #2, où l'ajout de Thin Stillage avait un impact neutre sur les rendements de fermentations. Cela pourrait être expliqué par le fait que dans les milieux de fermentations testés ici, il n'y avait pas d'extrait de levure, contrairement à la série d'essais #2. L'extrait de levure pourrait avoir un effet tampon ou protecteur d'une certaine façon, ce qui diminuerait l'impact néfaste que peut avoir l'HAc ou le glycérol apporté par une trop grande quantité de Thin Stillage.
3. En ce qui a trait à la productivité, que ce soit celle évaluée à 24h ou celle calculée sur la totalité de la fermentation (Q_{Eth_Glu}); il est clair que l'ajout de Thin Stillage est bénéfique. Il semble aussi qu'il y a une concentration optimale, puisque la productivité des milieux ayant 64% de Thin Stillage est un peu moins haute que celle des milieux à 32%. Cela se comprend en prenant en compte la croissance cellulaire, qui lorsque trop forte, compétitionne avec la production d'éthanol.
4. La levure conventionnelle (GOLD) semble être beaucoup moins influencée par la présence ou l'absence de Thin Stillage. En effet, que ce soit en analysant le gain de productivité entre 0% et 32% (gain de 186% LOMG1 vs 176% GOLD) ou encore la perte de productivité entre les milieux contenant 32% et 64% de Thin Stillage (perte de 18% LOMG1 vs 1% GOLD), il apparaît que la souche OGM est plus sensible aux changements de milieux de culture. Cela a des impacts majeurs sur le procédé de fermentation, car il faut mettre beaucoup d'effort à diminuer le stress qu'encourent les levures entre les différentes opérations unitaires menant à la fermentation.

10.1.8. Série d'essais #10 : Effet d'ajout de LIQ aux hydrolysats hémicellulosiques sur les performances de fermentation

Rationnelle

L'utilisation du Thin Stillage comme ajout nutritionnel aux fermentations d'hydrolysats a été investiguée (série d'essais #2 et #9). Par contre, un inconvénient du Thin Stillage est qu'il est composé à 93% d'eau, diluant ainsi beaucoup les sucres des hydrolysats. Qui plus aie, vouloir concentrer le Thin Stillage ou les hydrolysats aurait des coûts énergétiques importants. C'est pourquoi l'utilisation de mout de maïs hydrolysé (LIQ) pourrait combler cette lacune. En effet, sachant que le mout de maïs présentement utilisé dans les distilleries de MG contient un apport complet en nutriments pour les levures [Boulet, 2013], il est un bon candidat comme ajout nutritionnel aux fermentations d'hydrolysats. Il est à noter qu'un mout conventionnel (ex : celui d'ETG Varennes) contient près de 260 g/L de glucose.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#10 investigue les performances de LOMG1 dans un milieu d'HH de Triticale; lequel est supplémenté avec différentes concentrations de LIQ.

Protocole

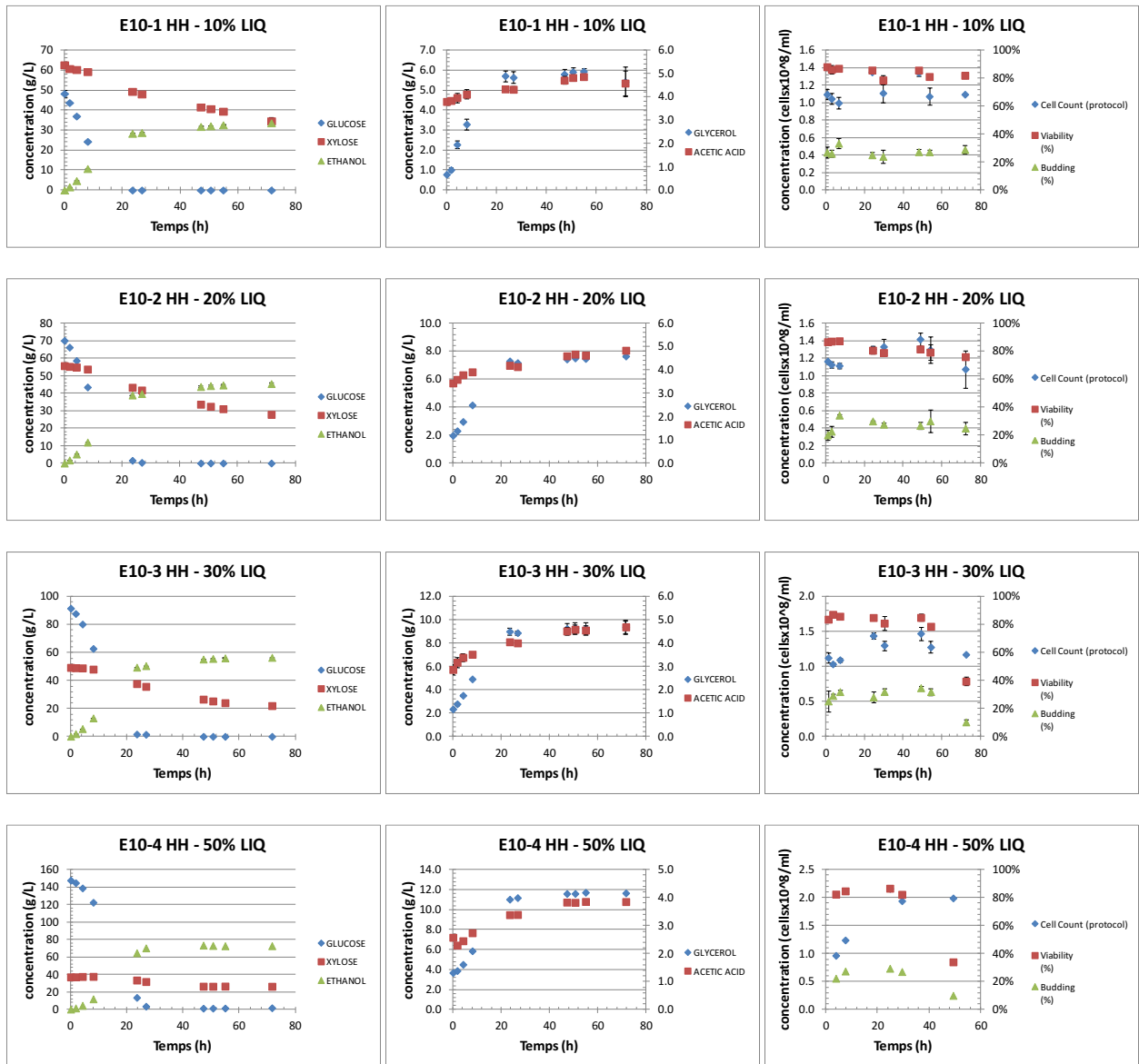
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Urée	0.53	g/L
Lactrol	0.1	g/L
pH	5.5	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
Fermenteur	150ml Erlen	

#ID	Nom	Répliques	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E10-1	HH - 10% LIQ	2	Milieu de fermentation (HH)	111	g/L sucres
			LIQ	44:56	ratio Glu:Xyl
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	10	% m/m
E10-2	HH - 20% LIQ	2	Milieu de fermentation (HH)	125.774	g/L sucres
			LIQ	56:44	ratio Glu:Xyl
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	20	% m/m
E10-3	HH - 30% LIQ	2	Milieu de fermentation (HH)	140.866	g/L sucres
			LIQ	65:35	ratio Glu:Xyl
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	30	% m/m
E10-4	HH - 50% LIQ	1	Milieu de fermentation (HH)	184.824	g/L sucres
			LIQ	80:20	ratio Glu:Xyl
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	50	% m/m
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	ND	g/L

Fabrication des hydrolysats

Idem à la série d'essais #06.

Résultats



#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E10-1	HH - 10% LIQ	86.1%	1.19	0.66	0.47	0.11	1.34	4.22%	0.008	0.002	0.003	0.015	0.027
E10-2	HH - 20% LIQ	90.7%	1.63	0.91	0.63	0.07	1.66	1.99%	0.005	0.007	0.005	0.008	0.006
E10-3	HH - 30% LIQ	92.7%	2.06	1.15	0.78	0.05	2.10	0.56%	0.002	0.004	0.002	0.002	0.014
E10-4	HH - 50% LIQ	90.5%	2.71	1.53	1.01	-0.03	2.62	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Le rendement éthylique est similaire pour tous les milieux de fermentation, bien qu'il semble que le rendement de E10-1 soit légèrement plus bas que celui des autres milieux.
2. Afin de pouvoir comparer la productivité, il faut se pencher sur les productivités éthyliques xylolytique et glucoxytique. Les productivités à 24-48-72h étant non comparables, du fait qu'il est impossible de discerner si la hausse en productivité vient simplement de la hausse en concentration du glucose ou d'ailleurs. Les figures de suivi de fermentation montrent bien que lors de ces tests ci, l'échantillonnage fréquent permet se fier aux productivités métaboliques calculées.
3. Conséquemment, on observe 2 tendances évidentes : la productivité lors du catabolisme du xylose diminue avec l'augmentation de la quantité de LIQ, alors que la productivité sur le glucose augmente. Cela peut être attribuable à 3 phénomènes :
 - a. Il a déjà été observé qu'une haute concentration en sucres inhibait la consommation du xylose (essais #3). Ainsi, plus le % de LIQ est important, plus la concentration initiale en glucose est élevée et cela semble affecter de façon néfaste le métabolisme du xylose.
 - b. L'augmentation du ratio glucose :xylose dû à l'augmentation de la teneur en LIQ peut aussi expliquer le fait que la consommation du glucose augmente. En effet, cela a été observé lors de tests précédents (essais #1 et #2). De plus, ces tests ci permettent d'observer clairement une hausse de la biomasse suivant une hausse en teneur en LIQ, ce qui est directement lié à une hausse en productivité. Alors que le milieu E10-1 n'affiche aucune croissance cellulaire, celle-ci augmente graduellement plus il y a de LIQ dans le milieu de culture.
 - c. L'augmentation de la teneur en LIQ amène aussi une augmentation en nutriments essentiels aux levures, ce qui peut entraîner une plus haute vitalité et un plus haut taux de croissance cellulaire.
4. Les données de concentrations cellulaires montrent un phénomène préalablement observé : lorsqu'on a un ratio glucose :xylose élevé (ici : => 65 :35), le xylose n'est quasiment pas consommé, la vitalité et le taux de réplication chute drastiquement après l'épuisement du glucose dans le milieu. Cela est particulier et semble indiquer que les cellules ont perdu la capacité à métaboliser le xylose.

10.1.9. Série d'essais #20 : Détermination des cinétiques de propagation

Tous les résultats et conclusions de cette série d'essais sont présentés à la section 3.4.

10.2. Regroupement#2 – Influence des paramètres de fermentation sur les performances

10.2.1. Série d'essais #15 : Comparaison du mode de fermentation : cuvée-alimenté vs cuvée

Rationnelle

Il existe 3 grands types d'unité de fermentation : la cuvée, la cuvée-alimenté et la fermentation en continu. La cuvée est bien sûr la plus simple, mais peut comporter des désavantages selon l'application. Dans le cas de la cuvée-alimentée, la littérature rapporte plusieurs avantages dans le cadre de fermentation d'LCH

[Cannizzaro et al., 2004; Chang et al., 2012; Seo et al., 2010; Seo et al., 2009]. Certaines séries d'essais ont pointé vers la possibilité que la souche LOMG1 performe mieux à basse concentration en sucres (série #3 et #10), surtout en ce qui concerne la consommation du xylose. De plus, il pourrait y avoir un bénéfice quant à la diminution du stress encouru par la levure dans un milieu dont la concentration en sucres est stable.

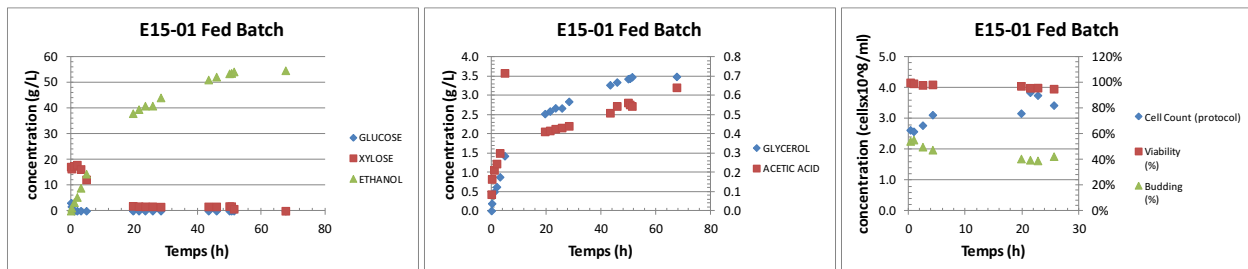
Dans cette optique, la série d'expériences Essais#15 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu de fermentation synthétique; soit en mode cuvée, soit en mode cuvée-alimentée. Il est important de quantifier les gains en performances que pourrait engendrer l'utilisation d'un procédé en cuvée-alimentée à l'échelle industrielle, car les coûts de TCI et de TPC d'un tel procédé peuvent être supérieurs à celui d'un procédé en cuvée.

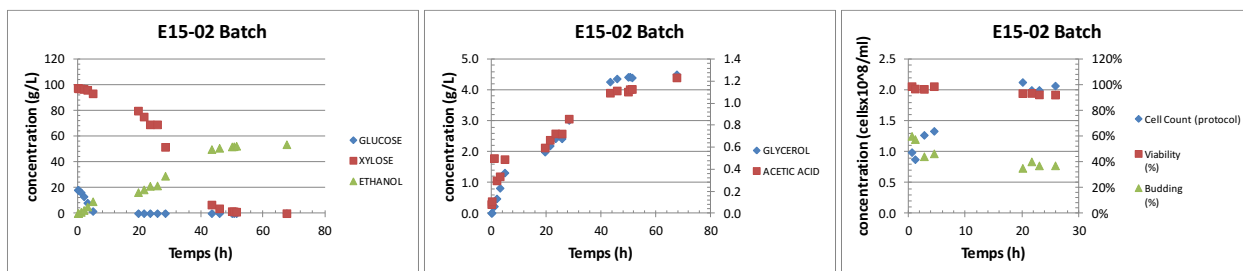
Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	17.5	g/L
Urée	ND	g/L
Lactrol	0.1	g/L
pH	5.2	
Température	32	C
Agitation	200	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.89	$\times 10^8$ cell/ml
	2.1	g/L
Fermenteur	Bioréacteur 2L	

#ID	Nom	Répliques	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E15-1	Fed-Batch	1	Composition Milieu de fermentation @ régime perm. (MS)	1.72	g/L sucres
			Alimentation (MS)	159.5	g/L sucres
				21:79	ratio Glu:Xyl
			Débit d'alimentation	0.3833	mL/min
			Type de fermentation	Fed-Batch	
E15-2	Batch	1	Milieu de fermentation (MS)	115	g/L sucres
				16:84	ratio Glu:Xyl
			Type de fermentation	Batch	

Résultats





#ID	Nom	Y _{max}	Performances					Y _{max}	Erreur Absolue					
			Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)		Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}	
E15-1	Fed-Batch	91.0%	1.71	1.10	NA	1.02	ND	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E15-2	Batch	90.6%	0.88	1.07	NA	1.02	1.91	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Vue l'absence d'incertitude sur les résultats, il reste difficile d'émettre des conclusions et cela est accru dû à la similarité des résultats. De plus, bien que le procédé en cuvée peut sembler avoir quelque peu moins bien performé que le type cuvée-alimentée, il faut mentionner que durant la fermentation en cuvée, le bioréacteur est tombé en panne à 2 reprise pour quelques heures. Cela a causé une chute de température et un arrêt de l'agitation. Ainsi, la légère baisse de performances pourrait être attribuée à cela.
2. Les rendements éthyliques sont virtuellement les mêmes.
3. Afin de comparer les productivités, la mesure à 48h est la plus valide, puisqu'à 24h le volume final du fermenteur fed-batch n'était pas encore atteints.
4. Un phénomène intéressant observé dans le procédé batch est la proximité de la productivité lors des métabolismes du xylose et du glucose. En effet, tel que discuté dans la section 3.3.2 de ce rapport, un protocole attentif à la vitalité des cellules permet d'augmenter de façon appréciable la vitesse de consommation des sucres, mais particulièrement du xylose. Cependant, la différence entre 1.91 g/L-h et 1.02 g/L-h est assez faible. Cela est attribuable à la faible concentration initiale en glucose. Effectivement, le glucose ayant été complètement consommé en moins de 5h, la mesure de la productivité lors du catabolisme de glucose comprend la phase de latence des levures après leur transfert du propagateur au fermenteur et la phase de croissance des levures dans le fermenteur. Or, le ralentissement de la productivité éthylique lors de ces deux phases est considérable.

10.3. Regroupement#3 – Impact des inhibiteurs sur les performances de fermentation

10.3.1. Série d'essais #4 et #5 : Effet de l'acide acétique sur les performances de fermentation

Rationnelle

L'hydrolyse de la lignocellulose libère une panoplie d'inhibiteurs de fermentation. Le plus important en terme de concentration est habituellement l'HAc, se retrouvant en quasi-totalité dans la fraction hémicellulosique. Sa concentration dépend du degré d'acétylation de la biomasse hydrolysée. Sa concentration dans les hydrolysats est aussi fonction de la méthode d'hydrolyse, la méthode de concentration et le degré de concentration des hydrolysats. Il est important d'investiguer la sensibilité de LOMG1 face à cet inhibiteur afin de connaître la concentration maximale qui est considérée comme acceptable dans les hydrolysats. La littérature rapporte aussi que l'effet néfaste de l'HAc pourrait être mitigé en augmentant le pH de la fermentation. Ceci fournirait un moyen simple et peu coûteux d'augmenter les performances de fermentation contenant de l'HAc.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#4 et 5 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu de fermentation synthétique; lequel est supplémenté de différentes concentrations d'acide acétique. De plus, chacune des concentrations en HAc est testée à un pH initial différent (entre 5 et 8) afin d'investiguer l'effet réel du pH sur le pouvoir inhibiteur de l'HAc. Il est important de connaître la relation entre la concentration initiale en HAc, le pH et les performances de fermentation afin d'évaluer la rentabilité, non seulement du procédé de fermentation, mais aussi d'une possible étape de détoxification des hydrolysats.

Protocole

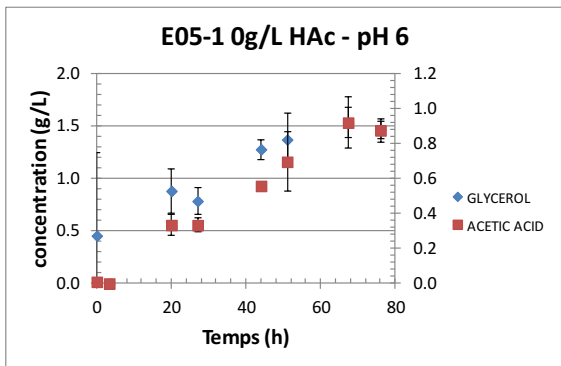
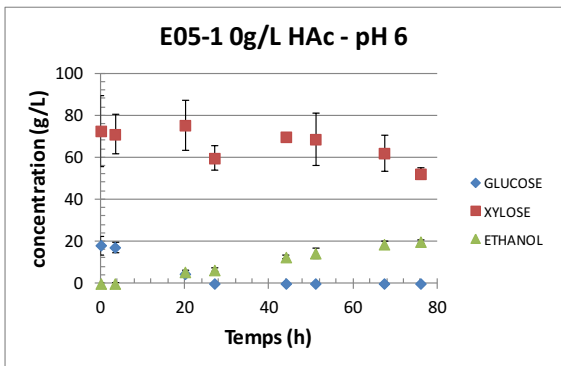
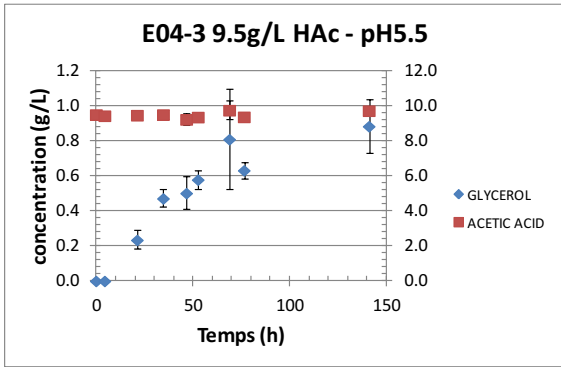
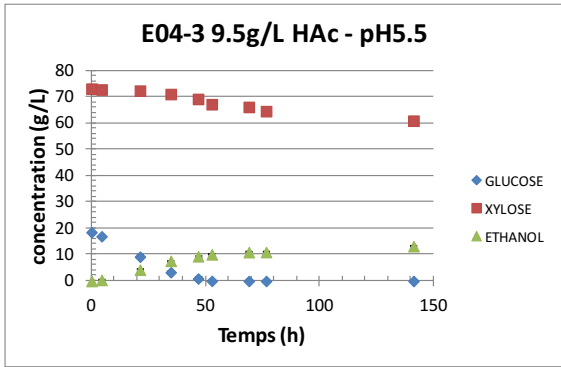
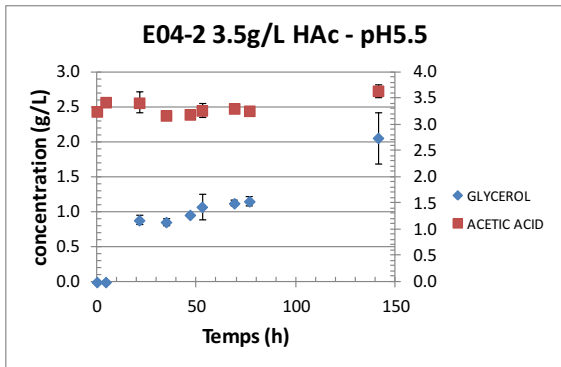
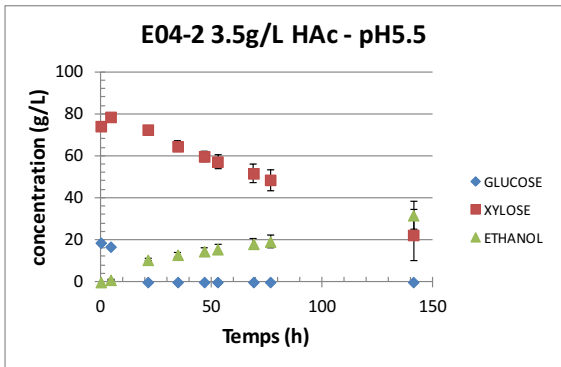
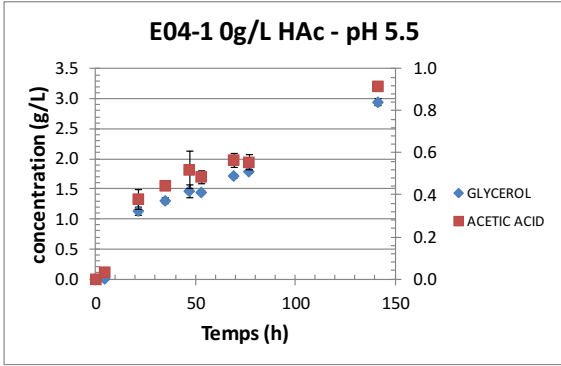
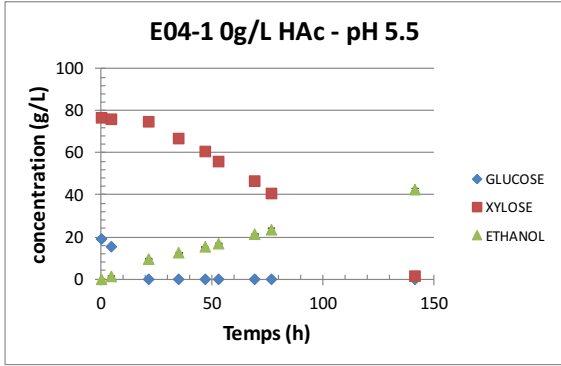
Série d'essais #4 et #5

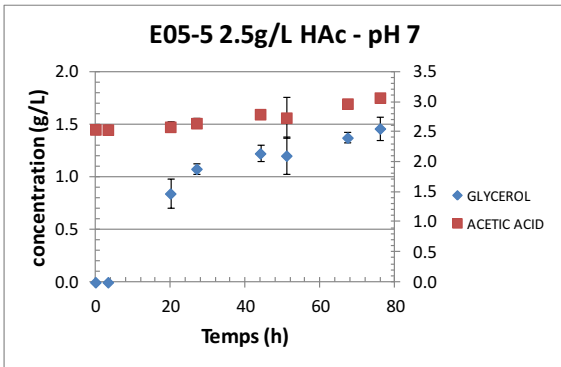
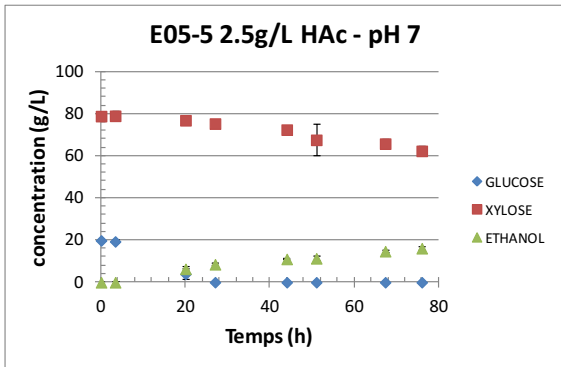
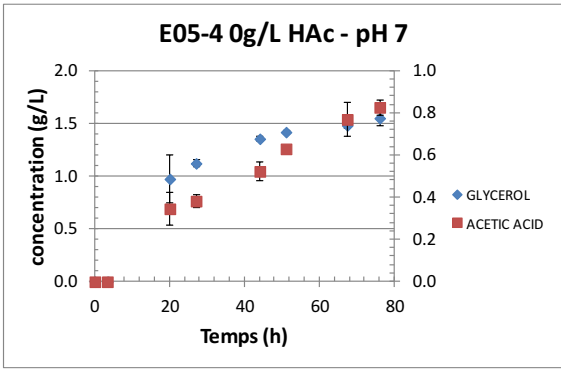
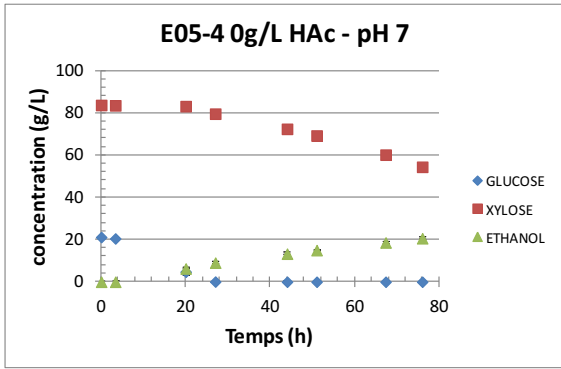
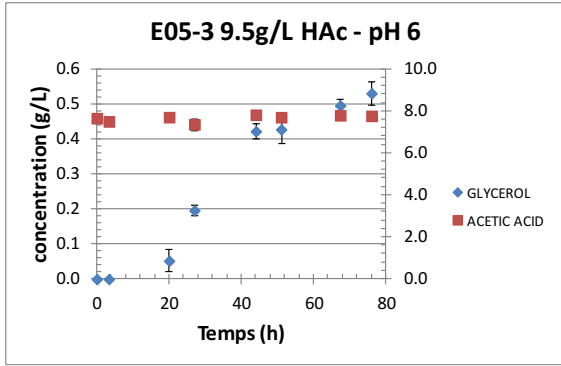
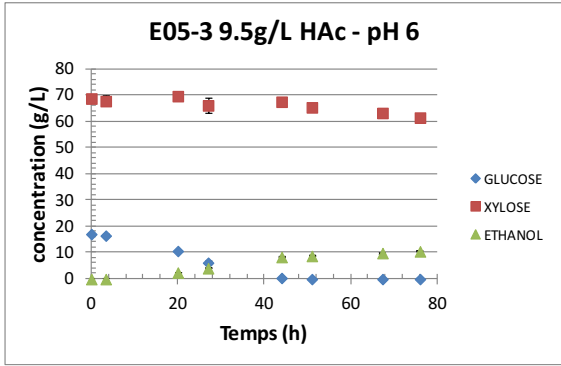
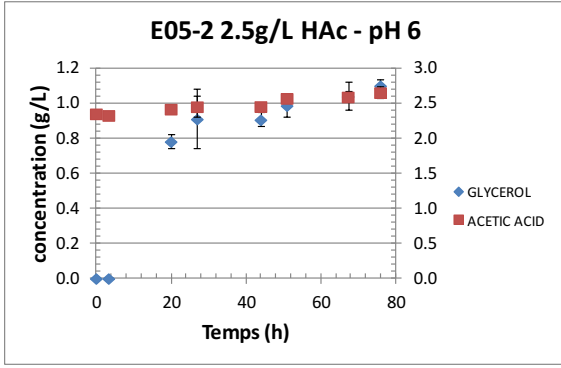
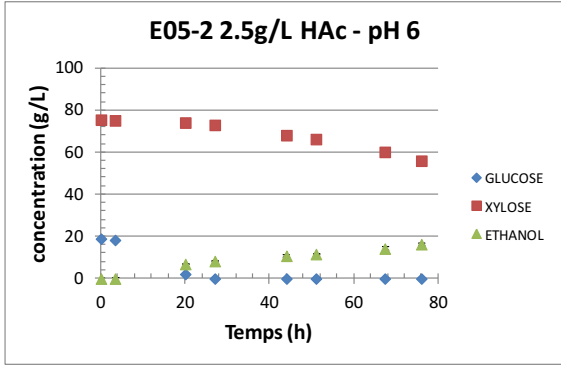
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	10	g/L
Urée	0.48	g/L
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.12	$\times 10^8$ cell/ml
Fermenteur	Erlenmeyer 250 ml	

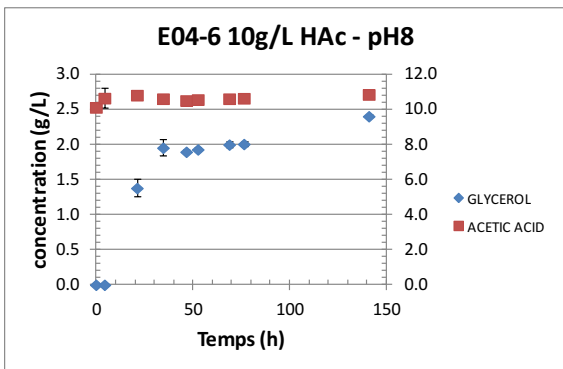
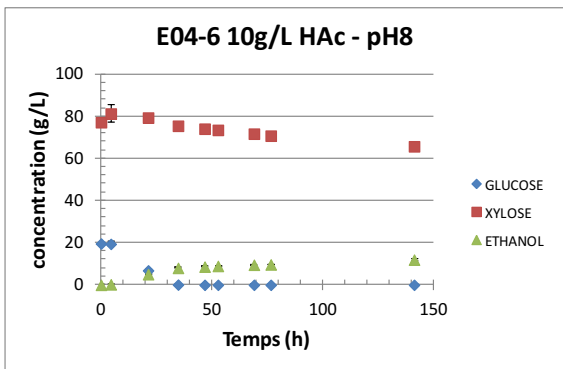
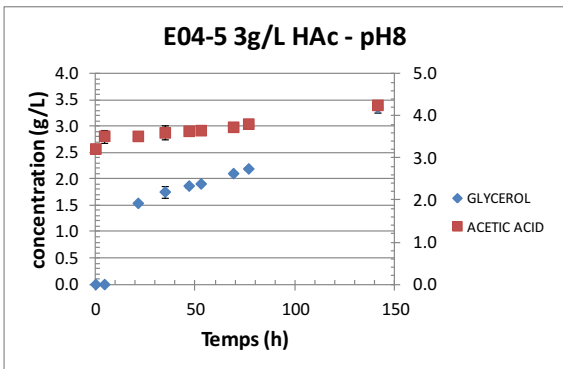
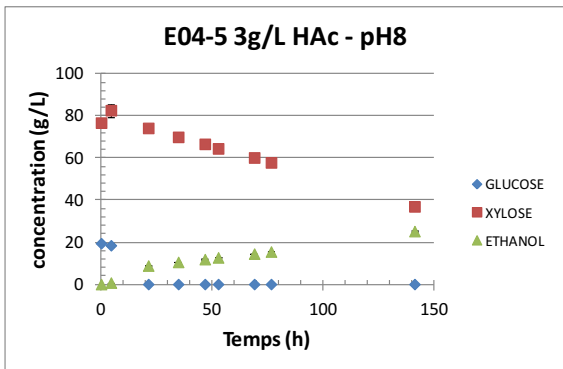
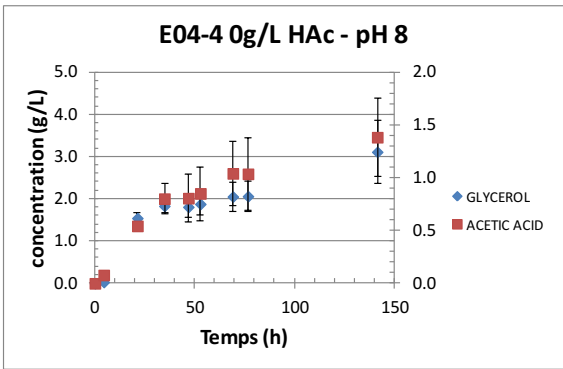
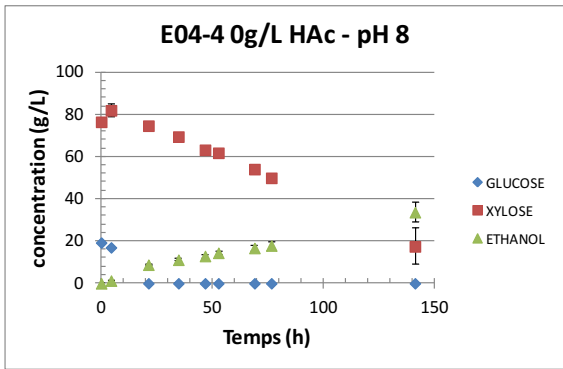
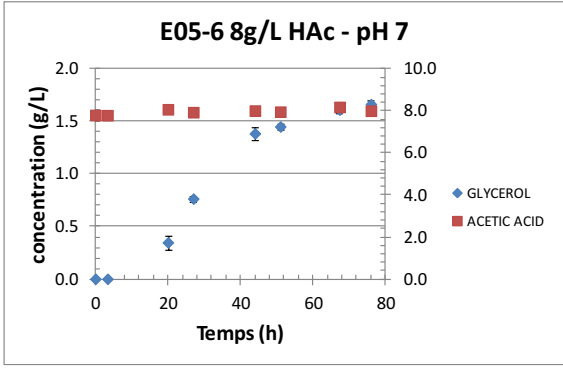
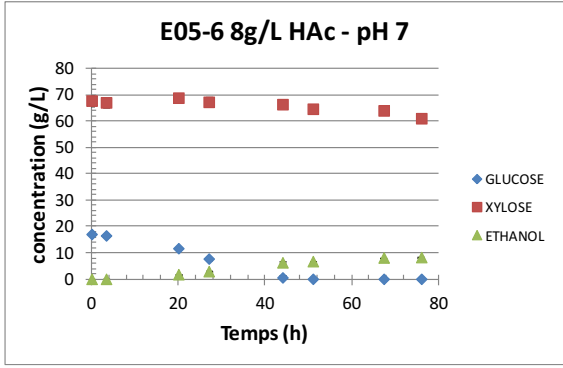
#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E04-1	0 HAc - pH 5.5	3	Milieu de fermentation (MS)	96	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0	<i>g/L</i>
			pH	5.5	
E04-2	3 .5HAc - pH5.5	3	Milieu de fermentation (MS)	93	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	3.5	<i>g/L</i>
			pH	5.5	
E04-3	9.5 HAc - pH5.5	3	Milieu de fermentation (MS)	92	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	9.5	<i>g/L</i>
			pH	5.5	
E04-4	0 HAc - pH 8	3	Milieu de fermentation (MS)	96	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0	<i>g/L</i>
			pH	8	
E04-5	3 HAc - pH8	3	Milieu de fermentation (MS)	96	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	3	<i>g/L</i>
			pH	8	
E04-6	10 HAc - pH8	3	Milieu de fermentation (MS)	97	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	10	<i>g/L</i>
			pH	8	

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E05-1	0g/L HAc - pH 6	3	Milieu de fermentation (MS)	91	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0	<i>g/L</i>
			pH	6	
E05-2	2.5g/L HAc - pH 6	3	Milieu de fermentation (MS)	94.5	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	2.5	<i>g/L</i>
			pH	6	
E05-3	9.5g/L HAc - pH 6	3	Milieu de fermentation (MS)	86	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	7.5	<i>g/L</i>
			pH	6	
E05-4	0g/L HAc - pH 7	3	Milieu de fermentation (MS)	105	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0	<i>g/L</i>
			pH	7	
E05-5	2.5g/L HAc - pH 7	3	Milieu de fermentation (MS)	99	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	2.5	<i>g/L</i>
			pH	7	
E05-6	8g/L HAc - pH 7	3	Milieu de fermentation (MS)	85	<i>g/L sucres</i>
				20:80	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	8	<i>g/L</i>
			pH	7	

Résultats







#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E04-1	0g/L HAc - pH 5.5	88.3%	0.42	0.33	0.31	0.28	ND	1.47%	0.007	0.004	0.006	0.006	ND
E04-2	3.5g/L HAc - pH5.5	83.0%	0.46	0.30	0.26	0.18	ND	32.04%	0.022	0.027	0.028	0.061	ND
E04-3	9.5g/L HAc - pH5.5	85.2%	0.21	0.20	0.15	0.03	0.22	5.46%	0.007	0.003	0.002	0.007	0.006
E05-1	0g/L HAc - pH 6	100.8%	0.28	0.28	0.26	0.28	0.28	51.04%	0.174	0.357	0.219	0.027	0.046
E05-2	2.5g/L HAc - pH 6	83.1%	0.31	0.23	0.21	0.16	0.35	6.46%	0.056	0.092	0.109	0.013	0.007
E05-3	9.5g/L HAc - pH 6	84.6%	0.13	0.18	0.14	0.07	0.15	7.51%	0.021	0.023	0.041	0.013	0.001
E05-4	0g/L HAc - pH 7	79.9%	0.33	0.29	0.27	0.23	0.34	3.91%	0.146	0.084	0.075	0.023	0.019
E05-5	2.5g/L HAc - pH 7	86.9%	0.31	0.23	0.22	0.16	0.32	10.22%	0.153	0.146	0.106	0.026	0.018
E05-6	8g/L HAc - pH 7	68.2%	0.09	0.14	0.11	0.06	0.14	6.65%	0.035	0.061	0.009	0.003	0.010
E04-4	0g/L HAc - pH 8	78.6%	0.38	0.27	0.24	0.21	ND	20.19%	0.009	0.012	0.015	0.042	ND
E04-5	3g/L HAc - pH8	75.6%	0.38	0.27	0.20	0.14	ND	1.65%	0.004	0.001	0.001	0.004	ND
E04-6	10g/L HAc - pH8	66.5%	0.23	0.18	0.13	0.04	0.23	5.13%	0.011	0.004	0.002	0.008	0.008

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Les résultats du milieu E05-1 sont difficilement interprétables vu la très grande incertitude qu'ils affichent.
2. De façon générale, pour chaque pH testé il semble que l'HAc n'a pas un effet très néfaste sur le rendement de la fermentation. Cela est en prenant en compte de l'incertitude sur les données, mais est aussi appuyé par la littérature. Néanmoins, pour chacun des pH testés, le rendement des milieux contenant environ 10 g/L d'HAc est systématiquement inférieur à ceux en contenant moins. De plus, chacun des milieux contenant environ 3 g/L d'HAc n'a pas un rendement significativement différent des milieux sans HAc.
3. Il faut souligner qu'il est reconnu que le pH optimal chez *S. cerevisiae* est d'environ 5.5 [Boulet, 2013]. On observe potentiellement qu'une augmentation du pH est liée à une baisse de productivité, principalement dans les milieux sans HAc. Fait notable, il y a eu une consommation complète des sucres seulement dans le milieu E04-1, ce qui indique qu'un pH inadéquat peut diminuer les performances de façon importante (supporté par essais #18). Par contre, ceci est en prenant en compte que le pH du milieu de propagation des levures était de pH 6. Le changement brusque de pH entre le propagateur et le fermenteur pourrait aussi expliquer en partie la baisse de performance des milieux à pH 7 et 8.
4. La productivité à 72h est probablement le meilleur comparable, puisque que toutes les fermentations contenaient encore du xylose à 72h, mis à part E04-1. On remarque réellement l'impact de l'HAc sur cette mesure avec une perte en productivité en moyenne de 18% et de 50% par rapport aux milieux sans HAc, pour une teneur en HAc de 3 et 10 g/L respectivement.
5. Finalement, les figures de suivi de fermentation et les productivités éthyliques xylolytiques montrent que le métabolisme du xylose est très fortement réprimé par la présence de l'HAc en comparaison au glucose. En effet, à des concentrations entre 8 et 10 g/L, il apparaît que la consommation du xylose s'estompe rapidement.

10.3.2. Série d'essais #11 : Effet d' NH_4SO_4 excessif sur les performances de fermentation

Rationnelle

Suite au procédé d'hydrolyse de la lignocellulose, les fractions hémicellulosiques et celluloses doivent être neutralisées avant d'être concentrées en une solution fermentable. Or, l'étape de l'hydrolyse requérant un acide, en l'occurrence H_2SO_4 , nécessitera une base pour permettre la neutralisation. Cette base pourrait être de l'ammoniac; en quel cas, une solution contenant du NH_4SO_4 résultera de la réaction de neutralisation. Il est donc important d'investiguer l'effet d'une forte concentration en NH_4SO_4 dans le milieu de fermentation.

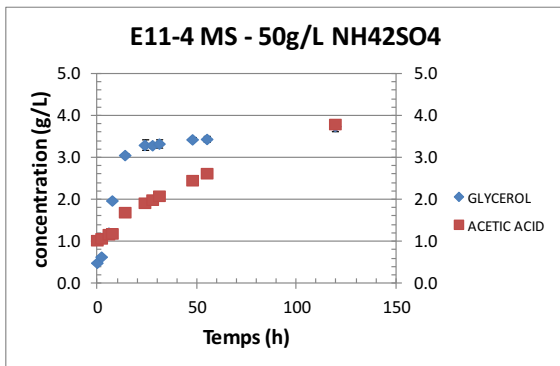
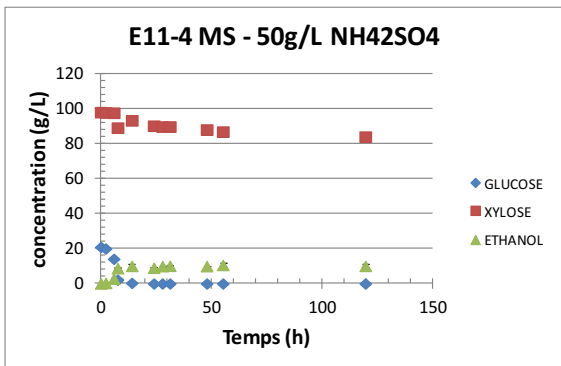
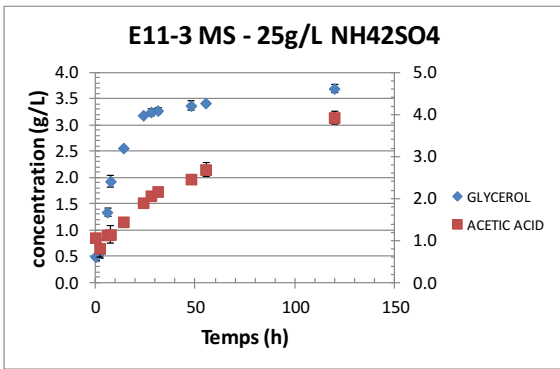
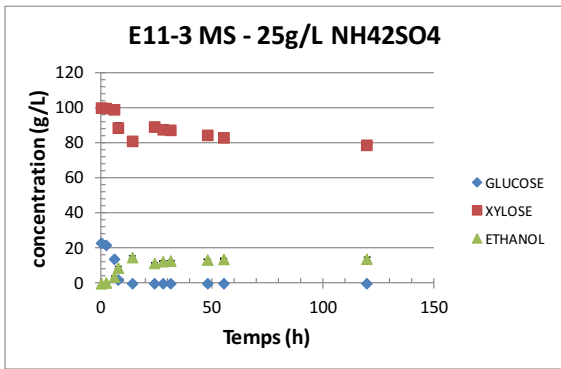
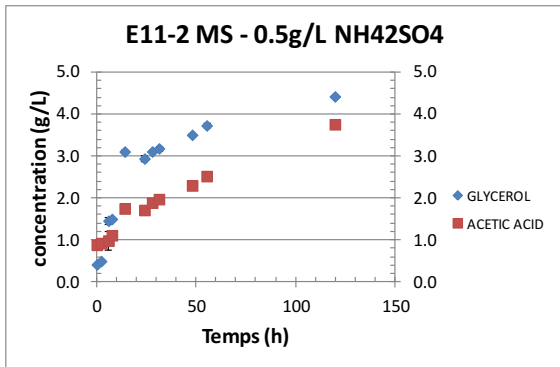
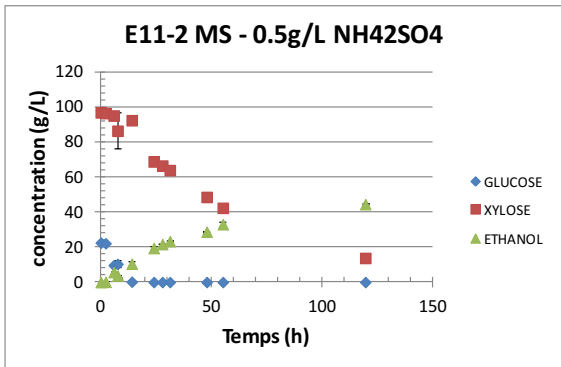
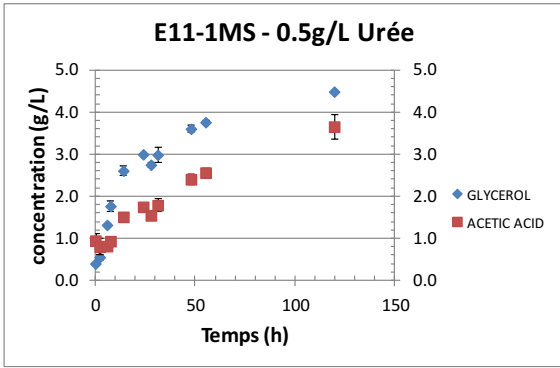
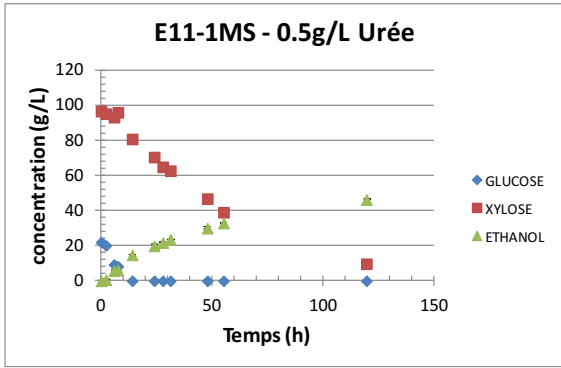
Dans cette optique, la série d'expériences Essais#11 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu de fermentation synthétique; lequel est supplémenté à différentes concentrations de NH_4SO_4 .

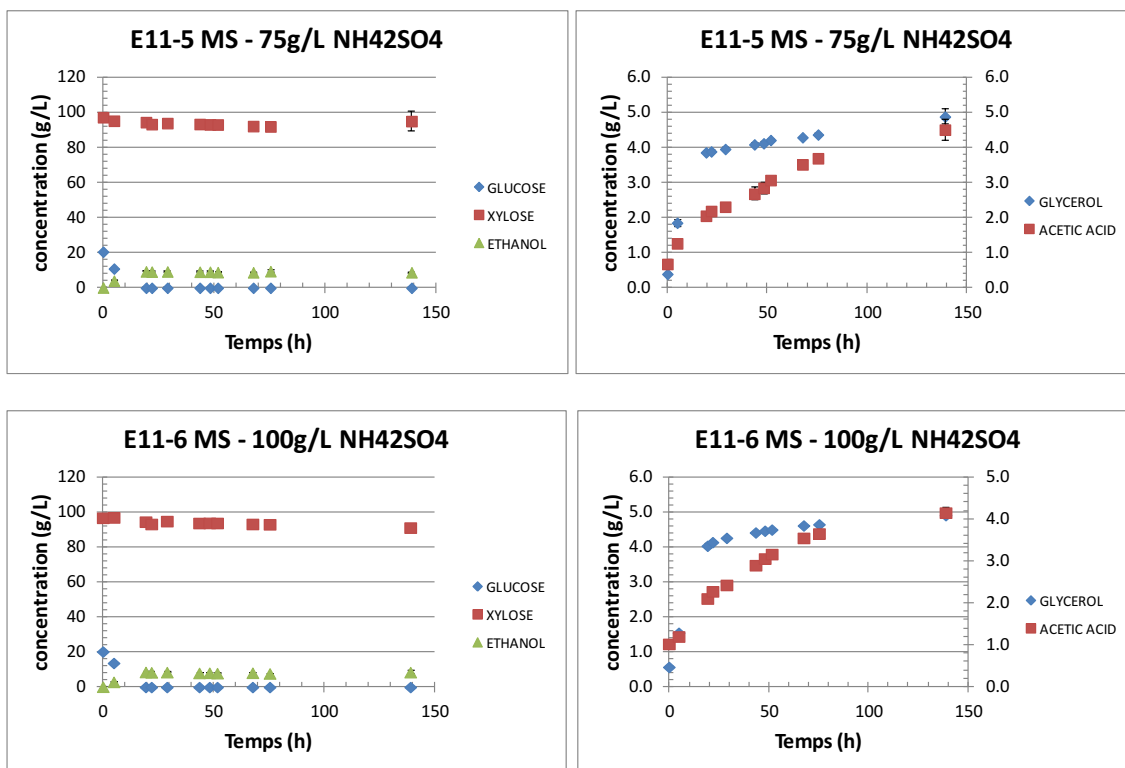
Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	60	g/L
Lactrol	0.1	g/L
pH	5.2	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	2.1	g/L
Fermenteur	150ml Erlen	

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E11-1	MS - 0.5g/L Urée	2	Milieu de fermentation (MS)	120	g/L sucres
			Source d'azote: Urée	18:82	ratio Glu:Xyl
E11-2	MS - 0.5g/L NH_4SO_4	2	Milieu de fermentation (MS)	0.48	g/L
			Source d'azote: NH_2SO_4	18:82	ratio Glu:Xyl
E11-3	MS - 25g/L NH_4SO_4	2	Milieu de fermentation (MS)	0.48	g/L
			Source d'azote: NH_2SO_4	120	g/L sucres
E11-4	MS - 50g/L NH_4SO_4	2	Milieu de fermentation (MS)	18:82	ratio Glu:Xyl
			Source d'azote: NH_2SO_4	25	g/L
E11-5	MS - 75g/L NH_4SO_4	2	Milieu de fermentation (MS)	120	g/L sucres
			Source d'azote: NH_2SO_4	18:82	ratio Glu:Xyl
E11-6	MS - 100g/L NH_4SO_4	2	Milieu de fermentation (MS)	75	g/L
			Source d'azote: NH_2SO_4	18:82	ratio Glu:Xyl
			Source d'azote: NH_2SO_4	100	g/L

Résultats





#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E11-1	MS - 0.5g/L Urée	83.0%	0.81	0.61	0.49	0.44	1.06	1.79%	0.024	0.007	0.001	0.004	0.005
E11-2	MS - 0.5g/L NH42SO4	82.4%	0.81	0.59	0.49	0.26	0.75	0.93%	0.017	0.000	0.000	0.012	0.100
E11-3	MS - 25g/L NH42SO4	61.8%	0.49	0.28	0.19	ND	1.07	4.67%	0.006	0.002	0.004	ND	0.032
E11-4	MS - 50g/L NH42SO4	56.2%	0.38	0.21	0.16	0.01	0.72	8.44%	0.005	0.000	0.014	0.016	0.079
E11-5	MS - 75g/L NH42SO4	74.5%	0.38	0.19	0.13	0.00	0.48	21.36%	0.003	0.003	0.006	-0.002	0.002
E11-6	MS - 100g/L NH42SO4	62.9%	0.34	0.17	0.11	0.00	0.44	10.26%	0.008	0.001	0.001	0.013	0.022

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Une concentration en NH₄SO₄ ≥ 25 g/L pose une inhibition majeure pour la fermentation. En effet, la diminution du rendement et de la productivité est très élevée et la consommation du xylose est à toute fin pratique nulle dans les milieux contenant 25 g/L et plus de NH₄SO₄
2. Dans le cas du glucose, on observe une consommation complète du glucose dans tous les milieux testés. De plus, les données de productivités en catabolisme du glucose montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les milieux contenant 50 g/L et moins de NH₄SO₄. Le rendement des milieux contenant plus de 0.5 g/L de NH₄SO₄ semble clairement plus bas que ceux des milieux E11-1 et E11-2. Par contre, cela pourrait être expliqué par le fait qu'aucun xylose n'a été consommé. Conséquemment, le rendement n'a été calculé que sur l'éthanol produit à partir de

glucose. Or, le glucose a été consommé très rapidement en début de fermentation durant les 2 phases connues pour ne pas donner des rendements éthyliques élevés; soit la phase de latence et la phase de croissance.

3. Les deux points traités ici haut démontrent encore une fois ce phénomène où les voies cataboliques du xylose chez LOMG1 semblent extrêmement sensibles et vulnérables à la présence d'inhibiteurs.
4. Sur une base massique, le NH₄SO₄ est une source d'azote aussi efficace que l'urée et est souvent utilisé dans la composition de milieux de fermentation standard à des concentrations avoisinant les 5 g/L. Dans l'optique où le NH₄SO₄ serait utilisé comme source d'azote, il serait pertinent de tester sa concentration optimale, car en terme équimolaire, 0.5 g/L d'urée équivaut à 1.1 g/L de NH₄SO₄.

10.3.3. Série d'essais #16 : Effet de la taille de l'inoculum sur l'inhibition de l'acide acétique et du furfural lors de fermentations

Rationnelle

Il a déjà été démontré que la concentration initiale en levure influençait positivement les performances de fermentation (essais #6). Il est aussi rapporté dans la littérature qu'une concentration plus élevée en levure permet de diminuer efficacement l'effet néfaste des inhibiteurs ubiquitaires aux hydrolysats. Cela pourrait s'avérer un atout important sachant que le procédé d'hydrolyse de la lignocellulose libère inconditionnellement certains inhibiteurs et que les méthodes de détoxifications traditionnelles peuvent engendrer des coûts importants.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#16 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu de fermentation synthétique contenant différentes concentrations d'acide acétique et de furfural, et un milieu d'HH contenant environ 15 g/L d'HAc. Ces milieux sont inoculés à différentes concentrations initiales en levures. Le but est de vérifier l'impact de la taille de l'inoculum sur l'inhibition de l'HAc et du furfural à des concentrations similaires à celles retrouvées dans les hydrolysats hémicellulosiques de CRB.

Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Urée	0.5	g/L
Lactrol	0.1	g/L
pH	5.2	
Température	32	°C
Agitation	150	rpm
Fermenteur	150mL Erlen	

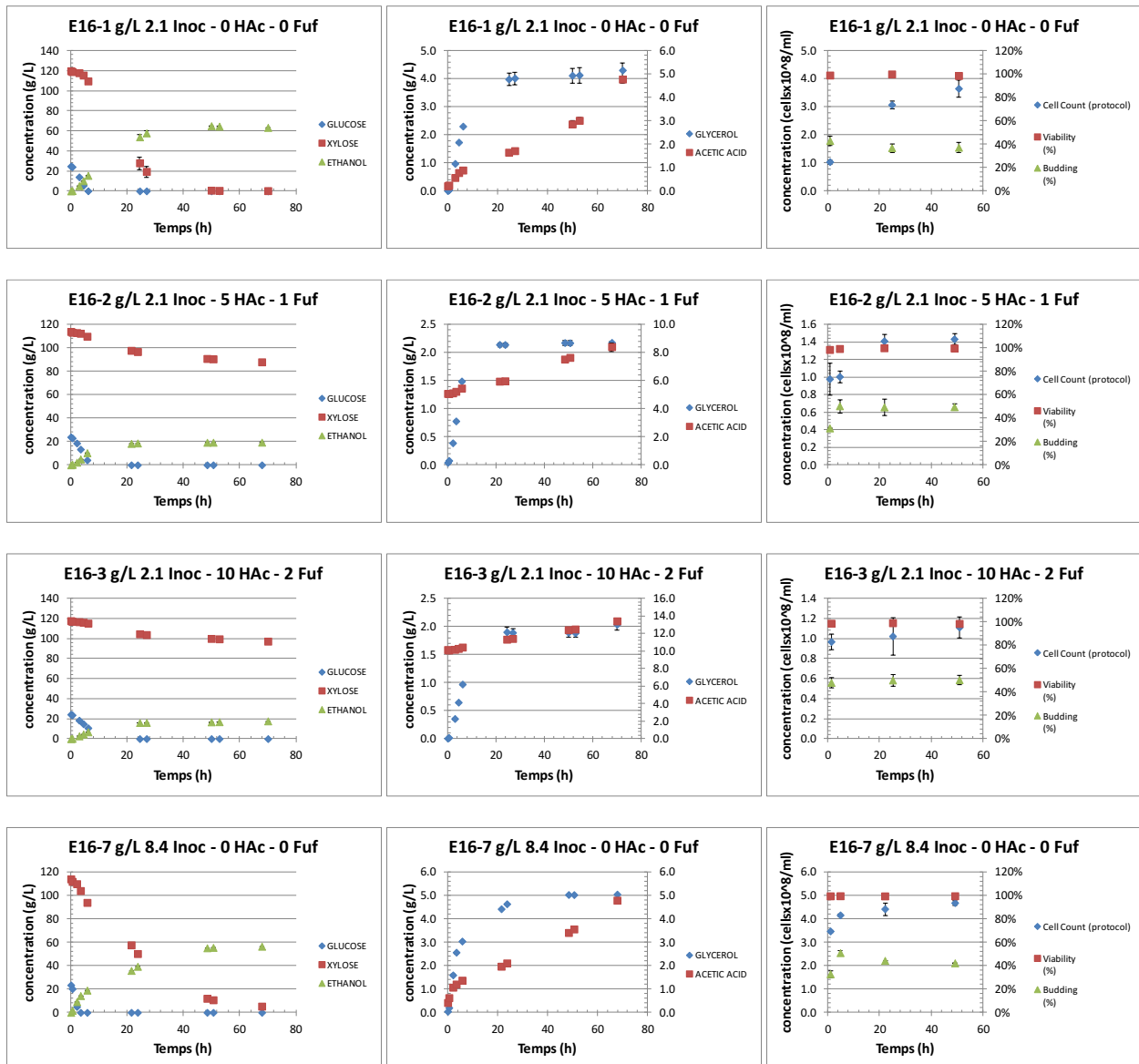
#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E16-1	g/L 2.1 Inoc - 0 HAc - 0 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	144.5	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0	<i>g/L</i>
			Furfural	0	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	37.5	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	1.04	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			2.1	<i>g/L</i>	
E16-2	g/L 2.1 Inoc - 5 HAc - 1 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	138	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	5	<i>g/L</i>
			Furfural	1	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	75	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.98	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			2.1	<i>g/L</i>	
E16-3	g/L 2.1 Inoc - 10 HAc - 2 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	142	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	10	<i>g/L</i>
			Furfural	2	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	37.5	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	1.03	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			2.1	<i>g/L</i>	
E16-7	g/L 8.4 Inoc - 0 HAc - 0 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	136	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	5	<i>g/L</i>
			Furfural	1	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	75	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	4.08	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			8.4	<i>g/L</i>	
E16-8	g/L 8.4 Inoc - 5 HAc - 1 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	136	<i>g/L sucres</i>
				17:87	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	10	<i>g/L</i>
			Furfural	2	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	75	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	3.71	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			8.4	<i>g/L</i>	
E16-9	g/L 8.4 Inoc - 10 HAc - 2 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	144.5	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0	<i>g/L</i>
			Furfural	0	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	75	<i>g/L</i>
			Conc. cellulaire initiale (RN1016)	6.14	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			16.8	<i>g/L</i>	
E16-10	g/L 16.8 Inoc - 0 HAc - 0 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	143	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	5	<i>g/L</i>
			Furfural	1	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	37.5	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	6.1	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			16.8	<i>g/L</i>	
E16-11	g/L 16.8 Inoc - 5 HAc - 1 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	142	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	10	<i>g/L</i>
			Furfural	2	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	37.5	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	5.75	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			16.8	<i>g/L</i>	
E16-12	g/L 16.8 Inoc - 10 HAc - 2 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	142	<i>g/L sucres</i>
				17:83	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	10	<i>g/L</i>
			Furfural	2	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	37.5	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	5.75	<i>x10⁸ cell/ml</i>
			16.8	<i>g/L</i>	
E16-13	HH - 2.1g/L Inoc	2	Milieu de fermentation (HH)	136	<i>g/L sucres</i>
				10:90	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	14.5	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	37.5	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	1.08	<i>x10⁸ cell/ml</i>
E16-14	HH - 8.4g/L Inoc	2	Milieu de fermentation (HH)	137	<i>g/L sucres</i>
				10:90	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	14.5	<i>g/L</i>
			Extrait de Levures	37.5	<i>g/L</i>
			[Cellulaire] initiale (RN1016)	3.69	<i>x10⁸ cell/ml</i>

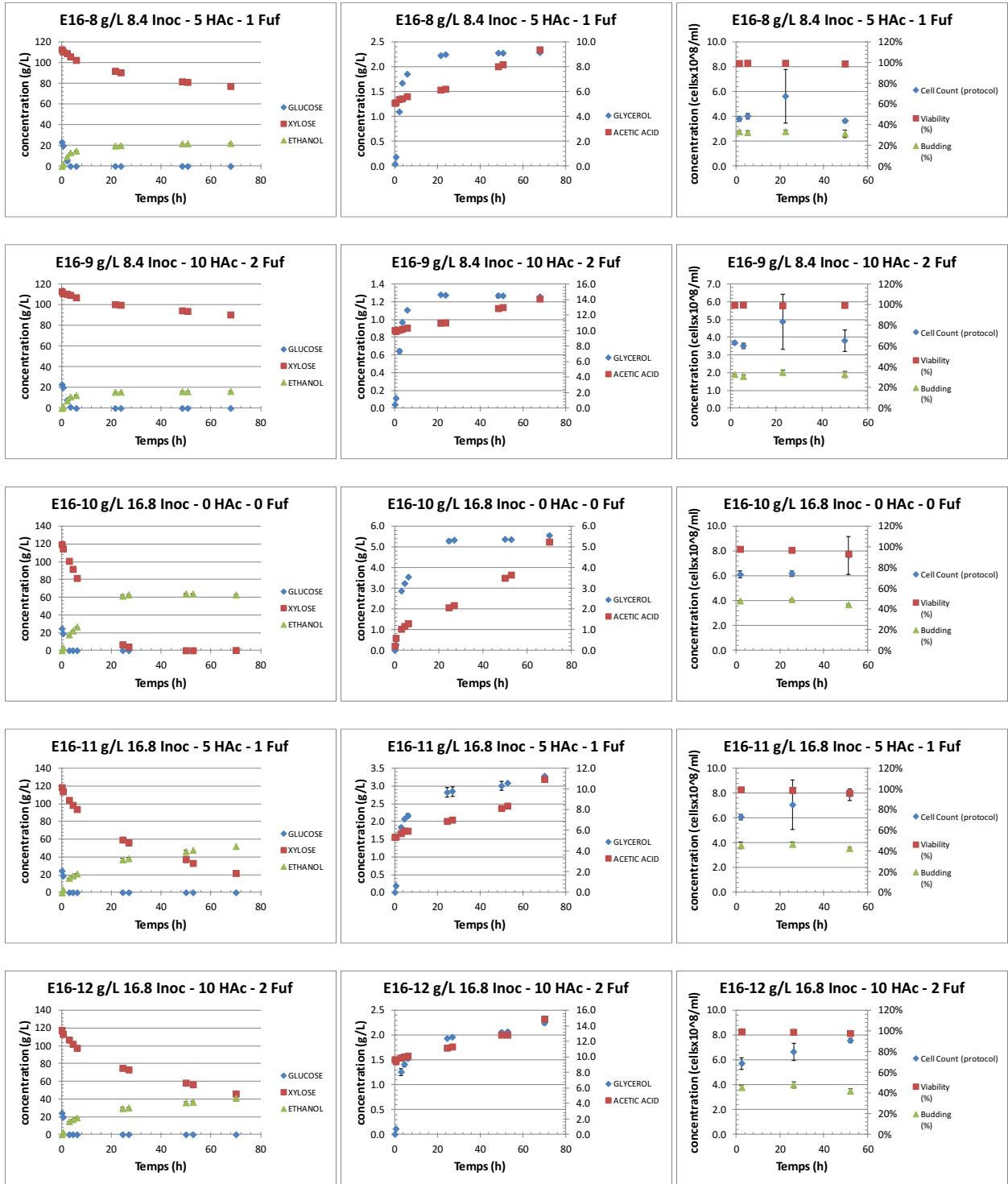
Dans le tableau ci-dessus, on observe que la concentration en extrait de levure est de 37.5 g/L dans certains milieux et de 75 g/L dans d'autres milieux. Cela est dû au fait que cette série d'expériences s'est opérée en 2 lots, chacun d'une durée d'une semaine. Or, durant le deuxième lot, la quantité d'extraits de levure disponible ne permettait pas d'en mettre 75 g/L par milieu. À des concentrations élevées comme celles-ci, équivalentes à un ratio « extrait de levure :sucre totaux » de 1 :4 et 1 :2 pour les milieux ayant reçu 37.5 et 75 g/L respectivement, il est supposé que l'impact sur les performances de fermentation sont négligeable.

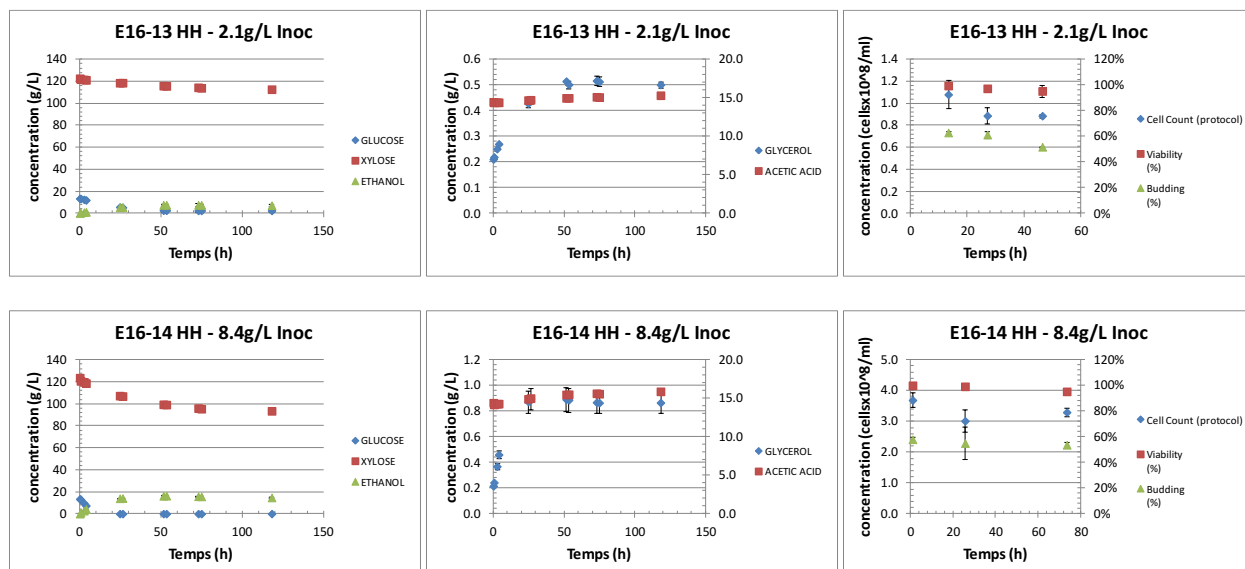
Fabrication des hydrolysats

Idem à la série d'essais #06.

Résultats







#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E16-1	g/L 2.1 Inoc - 0 HAc - 0 Fuf	88.4%	2.23	1.33	NA	1.13	2.54	0.43%	0.052	0.036	NA	0.006	0.012
E16-2	g/L 2.1 Inoc - 5 HAc - 1 Fuf	75.9%	0.78	0.40	NA	0.02	1.80	1.73%	0.006	0.004	NA	0.010	0.058
E16-3	g/L 2.1 Inoc - 10 HAc - 2 Fuf	77.4%	0.67	0.35	ND	0.04	1.12	2.23%	0.013	0.004	ND	0.012	0.035
E16-7	g/L 8.4 Inoc - 0 HAc - 0 Fuf	83.6%	1.64	1.15	NA	0.66	4.40	0.56%	0.012	0.008	NA	0.007	0.169
E16-8	g/L 8.4 Inoc - 5 HAc - 1 Fuf	73.9%	0.84	0.46	ND	0.14	4.48	1.09%	0.008	0.005	ND	0.004	0.035
E16-9	g/L 8.4 Inoc - 10 HAc - 2 Fuf	70.8%	0.66	0.34	ND	0.06	3.26	1.87%	0.006	0.003	ND	0.004	0.109
E16-10	g/L 16.8 Inoc - 0 HAc - 0 Fuf	85.5%	2.56	1.34	NA	1.89	7.21	0.28%	0.035	0.010	NA	0.039	0.135
E16-11	g/L 16.8 Inoc - 5 HAc - 1 Fuf	84.2%	1.54	0.96	NA	0.54	7.17	ND	0.026	0.025	NA	ND	0.026
E16-12	g/L 16.8 Inoc - 10 HAc - 2 Fuf	84.1%	1.23	0.75	NA	0.39	5.64	4.41%	0.021	0.017	NA	0.019	0.058
E16-T	g/L Très Petit Inoc - 10 HAc - 2 Fuf	56.4%	0.49	0.24	NA	0.00	0.54	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E16-13	HH - 2.1g/L Inoc	72.6%	0.21	0.15	0.11	-0.01	0.20	24.53%	0.012	0.010	0.012	-0.036	0.017
E16-14	HH - 8.4g/L Inoc	84.3%	0.58	0.32	NA	0.08	1.08	4.46%	0.027	0.009	NA	0.028	0.081

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

- On observe que seulement les milieux E16-1 et E16-10 ont consommés la totalité des sucres dans la fermentation avant 48h, que la majorité des sucres de la fermentation E16-7 étaient consommés à 48h et que pour le reste des milieux il n'y avait qu'une très faible consommation de sucres après 48h. Suivant cela, le meilleur comparatif de productivité est de comparer les productivités à 48h, mis à part pour les milieux E16-1 et 10 pour lesquels la productivité à 24h doit être utilisée.
- En comparant les 3 milieux sans inhibiteurs (E16-1, 7 et 10), on s'attendrait à observer une hausse en productivité suivant l'augmentation de la taille de l'inoculum. Or, le milieu ayant reçu 8.4 g/L de levure est moins performant que celui en ayant reçu 2.1 g/L (2.23 g/L-h vs 1.15 g/L-h). Par contre celui en ayant reçu 16.8 g/L performe comme on s'y attendrait; il a la plus haute productivité. Ceci peut être expliqué par une erreur de manipulation lors des tests. Effectivement,

les tests ont été réalisés en 2 lots. Le premier lot était composé des milieux E16-2, 7, 8 et 9. Or, durant la fermentation de ce lot, l'agitation de l'incubateur s'est arrêtée pour plus de 18h. Ce manque d'agitation peut être à l'origine des moins bonnes performances du milieu E16-7. Noter que la température des milieux a été maintenue.

3. Malgré cette erreur expérimentale, pour les milieux contenant des inhibiteurs, la productivité augmente avec l'augmentation de la biomasse initiale, comme on s'y attendrait. Par contre il faut garder en tête que les milieux E16-8 et 9 auraient probablement mieux performé s'il n'y avait pas eu un arrêt de l'agitation de l'incubateur.
4. Les résultats montrent clairement que la présence d'HAc et de furfural aux concentrations testées diminue le rendement éthylique des fermentations ayant reçu un inoculum de 2.1 et 8.4 g/L de levures. Cependant, la très haute concentration initiale en levure des milieux ayant reçu 16.8 g/L semble les protéger de ce phénomène.
5. La présence d'HAc et de furfural aux concentrations testées inhibe fortement la productivité éthylique des fermentations, indépendamment de la taille de l'inoculum. De plus, noter que les inhibiteurs affectent très sévèrement les productivités éthyliques xylolytiques, mais très peu celles glycolytiques. Il faut tout de même mettre en garde que cette conclusion est donnée avec des milieux de fermentation ayant de faibles concentrations initiales en glucose.
6. En comparant les pertes en rendement et en productivité des milieux avec inhibiteurs par rapport à leur milieu de comparaison sans inhibiteurs, il est tout de même apparent que l'augmentation de la biomasse initiale confère un certain degré de protection contre les effets néfastes des inhibiteurs.
7. Les mesures de concentration cellulaires montrent clairement que les inhibiteurs bloquent la croissance cellulaire et n'ont pas un impact significatif sur la vitalité. Par contre, dans le cas des 2 milieux d'HH testés, on observe réellement une baisse de la concentration cellulaire et on peut donc conclure que d'autres substances présentes dans les hydrolysats sont toxiques aux levures.
8. Il est important de pointer que le fait d'augmenter la concentration initiale en levure a un impact sur le taux de réplique et la biomasse finale atteinte dans le milieu de fermentation. En effet, dans le milieu E16-1 la biomasse a approximativement quadruplé de 1×10^8 cells/ml à 3.7×10^8 cells/ml. Dans le cas du milieu E16-7, la biomasse augmente seulement de 3.5 à 4.7×10^8 cells/ml. Finalement, pour le milieu E16-8, on n'observe aucune croissance cellulaire significative.

10.3.4. Série d'essais #19 : Effet synergique de l'acide acétique et du 5-HMF sur les performances de fermentations

Rationnelle

L'implémentation industrielle de la fermentation d'LCH peut s'opérer de plusieurs façons. Les nouvelles avancées de CRB dans le domaine de la détoxification des hydrolysats ont permis d'éliminer la majorité des inhibiteurs. Effectivement, seuls l'acide acétique, le HMF et possiblement l'acide lévulinique se retrouveraient encore à des concentrations élevées dans les hydrolysats. De plus, afin de diminuer l'impact de l'acide acétique (retrouvé seulement dans la fraction hémicellulosique) et celui du HMF (retrouvé seulement dans la fraction cellulosique), il est suggéré de mélanger les deux fractions afin de

diluer les inhibiteurs. Cette technique aurait l'avantage de ne pas diluer la concentration totale de sucres, à condition d'avoir une concentration en sucre similaire dans la fraction cellulosique et hémicellulosique.

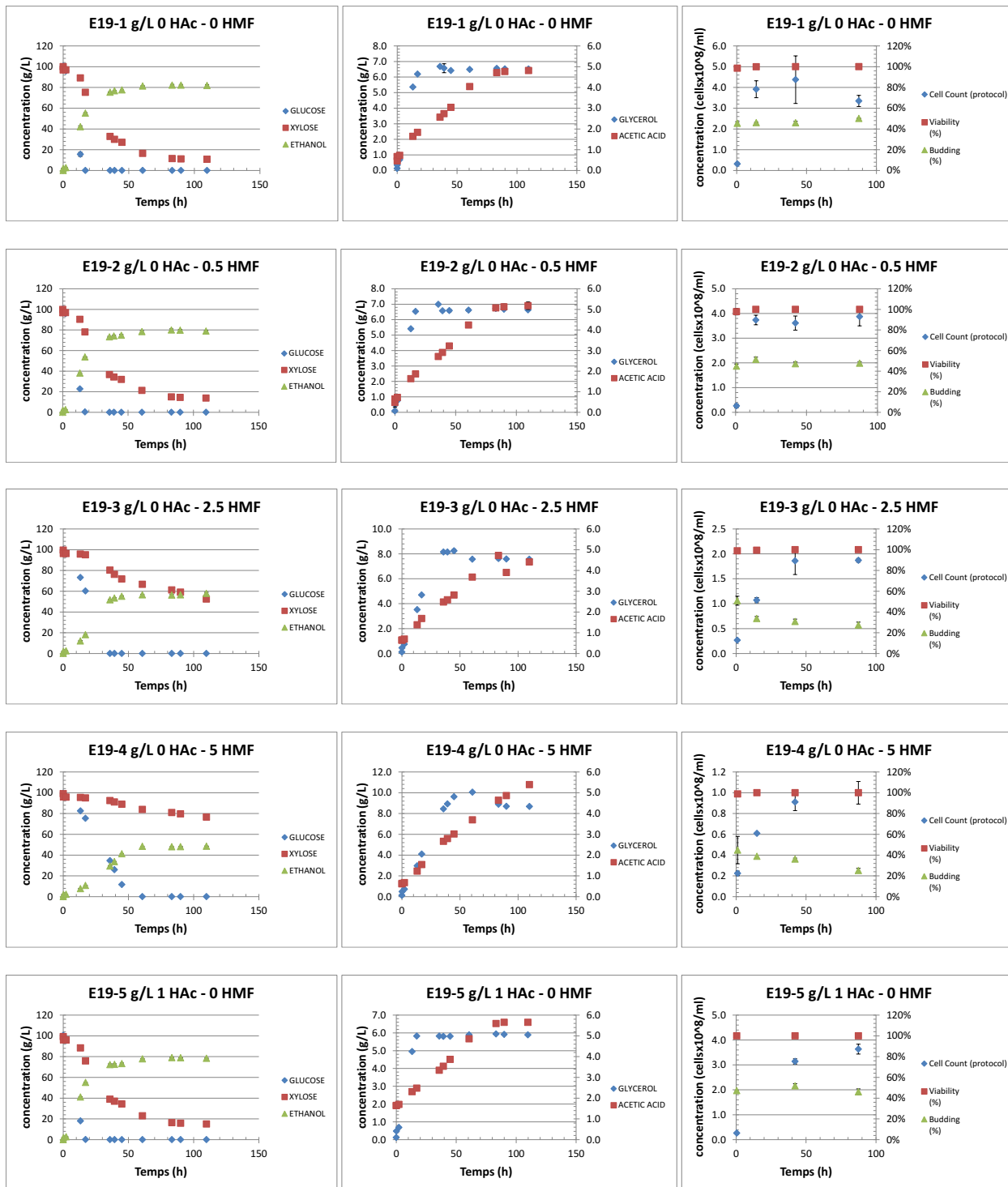
Dans cette optique, la série d'expériences Essais#16 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu de fermentation synthétique ayant une haute teneur en sucres et différentes concentrations initiales en HAc et HMF. Cela est important afin de pouvoir établir quels sont les niveaux d'inhibition acceptables dans un milieu de culture semblable à ce qui est envisagé à l'échelle industrielle. De plus, bien que les effets de l'HAc sur les performances de fermentation de LOMG1 aient été précédemment étudiés (série d'essais #4, #5 et #16), l'impact du HMF n'a pas encore été investigué directement.

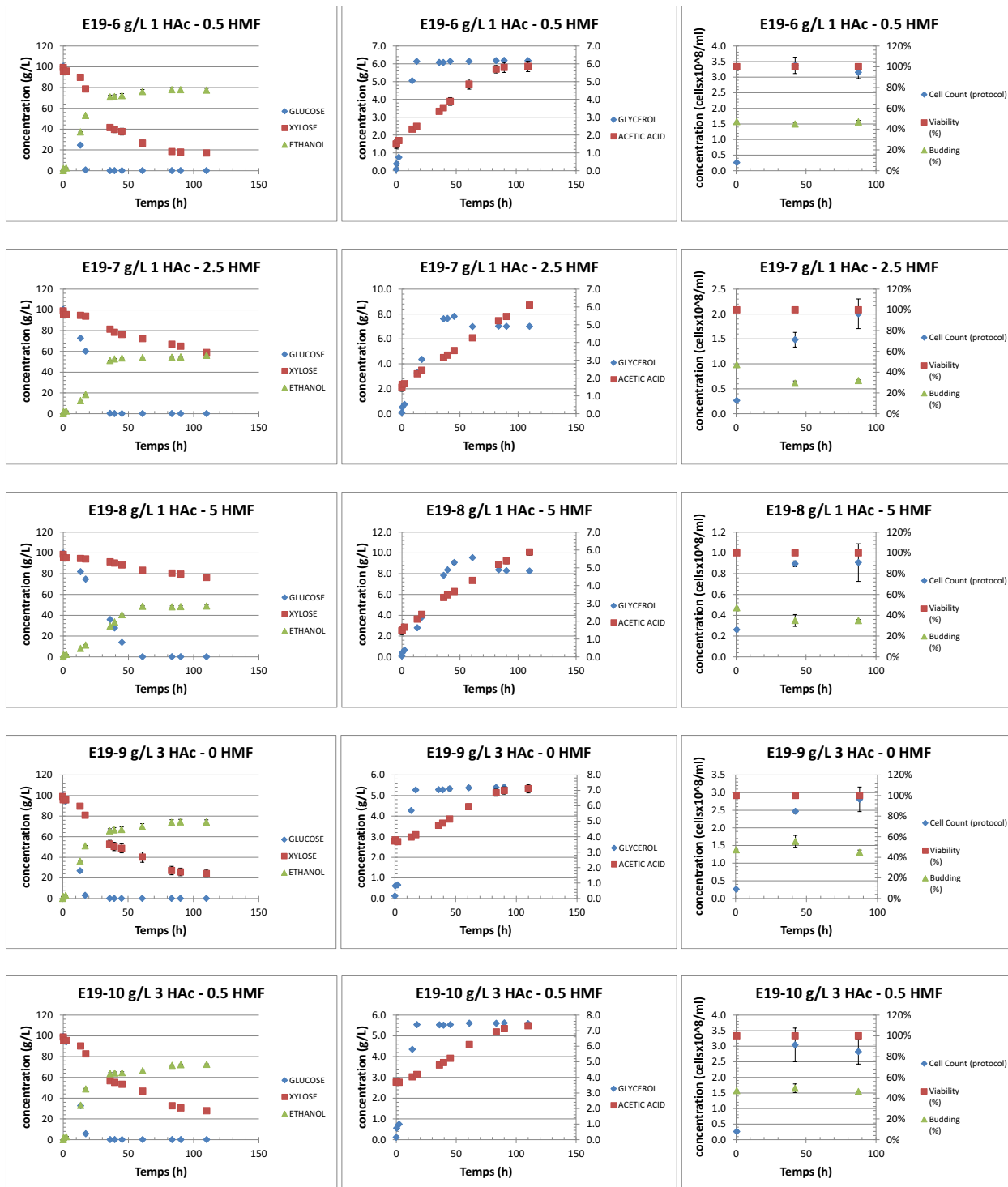
Protocole

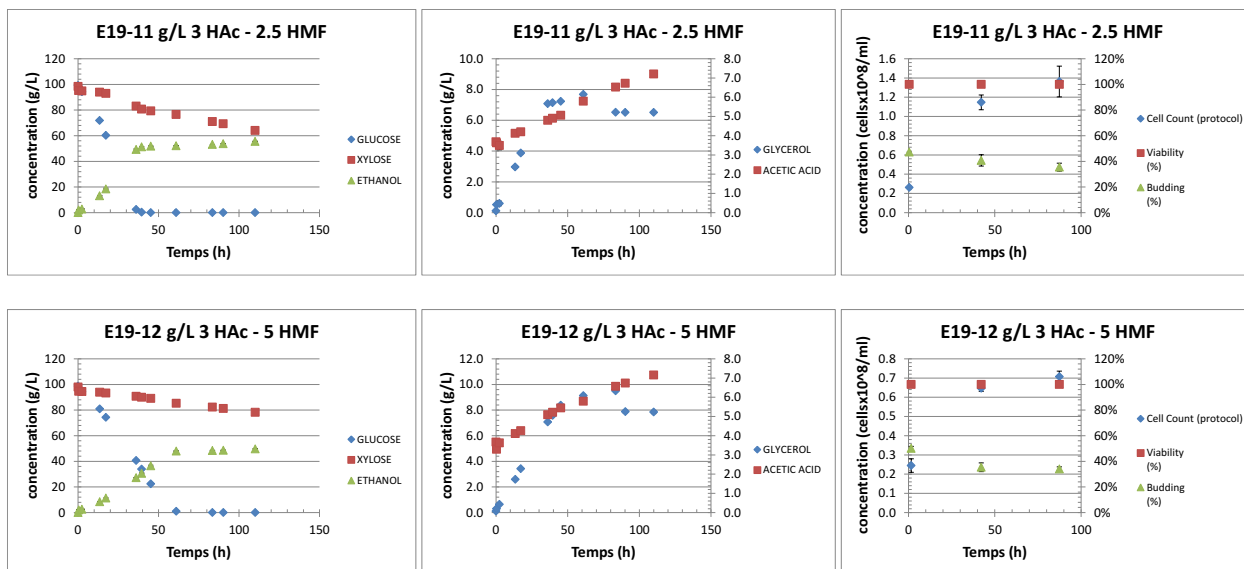
Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	50	g/L
Urée	0.5	g/L
Lactrol	0.01	g/L
pH ini	5.2	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
Conc. cellulaire initiale (RN1016)	0.26	$\times 10^8$ cell/ml
Fermenteur	150mL Erlen	

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E19-1	g/L 0 HAc - 0 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	200.5	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0.0	<i>g/L</i>
E19-2	g/L 0 HAc - 0.5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	200.2	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0.0	<i>g/L</i>
E19-3	g/L 0 HAc - 2.5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	199.5	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0.0	<i>g/L</i>
E19-4	g/L 0 HAc - 5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	198.6	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	0.0	<i>g/L</i>
E19-5	g/L 1 HAc - 0 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	199.8	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	1.0	<i>g/L</i>
E19-6	g/L 1 HAc - 0.5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	199.7	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	1.0	<i>g/L</i>
E19-7	g/L 1 HAc - 2.5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	199.3	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	1.0	<i>g/L</i>
E19-8	g/L 1 HAc - 5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	198.3	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	1.0	<i>g/L</i>
E19-9	g/L 3 HAc - 0 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	198.9	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	3.0	<i>g/L</i>
E19-10	g/L 3 HAc - 0.5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	198.3	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	3.0	<i>g/L</i>
E19-11	g/L 3 HAc - 2.5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	197.6	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	3.0	<i>g/L</i>
E19-12	g/L 3 HAc - 5 HMF	2	Milieu de fermentation (MS)	196.8	<i>g/L sucres</i>
				50%	<i>ratio Glu:Xyl</i>
			Acide Acétique	3.0	<i>g/L</i>
			HMF	5.0	<i>g/L</i>

Résultats







#ID	Nom	Performances					Erreur Absolue						
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E19-1	g/L 0 HAc - 0 HMF	84.8%	2.60	1.63	1.13	0.60	3.21	0.75%	0.014	0.002	0.004	0.014	0.072
E19-2	g/L 0 HAc - 0.5 HMF	84.1%	2.54	1.57	1.10	0.56	2.90	1.51%	0.008	0.011	0.010	0.025	0.012
E19-3	g/L 0 HAc - 2.5 HMF	76.4%	1.27	1.16	0.78	0.10	1.06	1.66%	0.006	0.005	0.007	0.018	0.022
E19-4	g/L 0 HAc - 5 HMF	77.7%	0.73	0.89	0.67	0.00	0.92	0.49%	0.003	0.003	0.001	0.003	0.006
E19-5	g/L 1 HAc - 0 HMF	84.0%	2.56	1.54	1.09	0.52	3.11	0.61%	0.012	0.008	0.003	0.011	0.033
E19-6	g/L 1 HAc - 0.5 HMF	83.5%	2.48	1.52	1.08	0.53	2.81	3.22%	0.024	0.028	0.020	0.046	0.015
E19-7	g/L 1 HAc - 2.5 HMF	77.8%	1.27	1.11	0.75	0.07	1.08	1.43%	0.007	0.005	0.007	0.009	0.014
E19-8	g/L 1 HAc - 5 HMF	78.3%	0.74	0.88	0.67	0.00	0.90	2.10%	0.002	0.005	0.007	0.034	0.010
E19-9	g/L 3 HAc - 0 HMF	82.6%	1.94	1.41	1.00	0.35	2.97	4.02%	0.023	0.036	0.028	0.041	0.016
E19-10	g/L 3 HAc - 0.5 HMF	82.7%	2.26	1.34	1.10	0.32	2.83	1.08%	0.021	0.015	0.009	0.016	0.035
E19-11	g/L 3 HAc - 2.5 HMF	80.9%	1.23	1.07	0.73	0.08	1.37	0.35%	0.018	0.003	0.001	0.009	0.014
E19-12	g/L 3 HAc - 5 HMF	81.9%	0.71	1.01	0.68	0.03	0.81	0.13%	0.003	0.010	0.001	0.002	0.011

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Cette série d'expériences affiche des données avec de faibles incertitudes et des échantillonnages fréquents. Cela permet l'analyse précise des phases de production d'éthanol provenant du glucose et celle provenant du xylose.
2. Indépendamment de la concentration en HAc, on observe une diminution significative du rendement pour des concentrations en HMF >0.5 g/L. Néanmoins, cette baisse de rendement est virtuellement identique pour des concentrations en HMF de 2.5 ou 5 g/L. Ces baisses de rendements sont aussi observables en analysant les figures de production de glycérol et d'HAc, montrant une augmentation de la production de ces deux co-produits proportionnellement à la concentration en inhibiteurs.

3. La baisse de rendement amené par le HMF est moins élevée plus la concentration en HAc est élevée. En effet, cette perte entre les milieux E19-1 et E19-4 est de 8.4%, entre E19-5 et E19-8 elle est de 6.8%, et entre E19-9 et E19-12 elle est de 0.8%. Ainsi, il apparaît que l'HAc mitige l'effet du HMF sur le rendement.
4. Les milieux E19-1, 5 et 9 démontrent qu'une faible concentration en HAc (0 à 3 g/L) n'affecte pas le rendement de façon significative, bien qu'il semble le diminuer très légèrement.
5. Le HMF diminue beaucoup la productivité éthylique glucolytique, et de façon encore plus sévère celle xylolytique. Qui plus aie, pour des concentrations similaires, le HMF inhibe beaucoup plus la productivité que l'HAc. Par exemple en comparant l'effet de 2.5 g/L d'HMF (E19-3) vs l'effet de 3 g/L d'HAc (E19-9) sur les performances de fermentation. Cette remarque s'applique sur le rendement de fermentation également.
6. En observant les figures de concentration cellulaire durant la fermentation, on voit clairement que le HMF et l'HAc sont tous deux des inhibiteurs de croissance cellulaire.

10.4. Regroupement#4 – Impacte des méthodes de détoxifications des hydrolysats sur les performances de fermentation

10.4.1. Série d'essais #12 : Méthodes de détoxification des hydrolysats (investigation préliminaire)

Rationnelle

Les tests de fermentation d'LCH ont clairement démontré des performances moindres par rapport à la fermentation d'un milieu de fermentation standard. La raison est attribuable à la présence d'inhibiteurs ubiquitaires, générée lors de l'hydrolyse de la lignocellulose : acide acétique, furfural, 5-HMF, acide lévulinique, acide formique et phénoliques. Or, la littérature propose plusieurs méthodes de détoxification permettant de retirer la majorité de ces inhibiteurs générés par l'hydrolyse. Les rendements de telles méthodes sont très variables, ainsi il est important de tester les méthodes les plus prometteuses et d'en vérifier les effets sur les performances de fermentation.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#12 investigate les performances de LOMG1 dans des milieux de fermentation composés d'hydrolysats hémicellulosiques de Triticale détoxifiés grâce à diverses méthodes. Il est important de connaître l'impact de telles méthodes afin de pouvoir choisir laquelle est la plus apte à pouvoir être implémentée à l'échelle industrielle.

Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	1:2	ratio EL:Sucres
Urée	-	g/L
Lactrol	0.01	g/L
pH	5.2	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.54	$\times 10^8$ cell/ml
Fermenteur	150ml Erlen	

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E12-1	Détox HH - Char Act	2	Méthode de détoxification	Caharbon Activé	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	16.5	g/L
			Acide acétique	0:100	ratio Glu:Xyl
E12-2	Détox HH - Ca(OH)2 + Na2SO3	2	Méthode de détoxification	Ca(OH)2 + Na2SO3	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	19	g/L
			Acide acétique	2:98	ratio Glu:Xyl
E12-3	Détox HH - Ca(OH)2	2	Méthode de détoxification	Ca(OH)2	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	20.5	g/L
			Acide acétique	4:96	ratio Glu:Xyl
E12-4	Détox HH - Éther Éthylique	2	Méthode de détoxification	Éther Éthylique	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	22	g/L
			Acide acétique	12:88	ratio Glu:Xyl
E12-5	Détox HH - Éther Éthylique + Rotavap	2	Méthode de détoxification	Éther Éthylique + Rotavap	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	20.5	g/L
			Acide acétique	6:94	ratio Glu:Xyl
E12-6	Détox HH - Na2SO3	2	Méthode de détoxification	Na2SO3	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	19.5	g/L
			Acide acétique	3:97	ratio Glu:Xyl
E12-7	HH s/a Détox (RO)	2	Méthode de détoxification	s/a Détox	
			Milieu de fermentation (HH)	13.5	g/L sucres
			Acide acétique	5:95	ratio Glu:Xyl
E12-8	HH Détox - Rotavap	2	Méthode de détoxification	Détox - Rotavap	
			Milieu de fermentation (HH; à partir E12-8)	15.5	g/L
			Acide acétique	9:91	ratio Glu:Xyl
E12-9	HH - Explosion vapeur s/a acide	2	Méthode de détoxification	Explosion vapeur s/a acide	
			Milieu de fermentation (HH)	15	g/L sucres
			Acide acétique	5:95	ratio Glu:Xyl
E12-10	MS - YD	2	Milieu de fermentation (MS)	76	g/L
				100:0	ratio Glu:Xyl

Noter que l'acide acétique est indiqué tel que retrouvé dans les hydrolysats. Il ne s'agit pas d'acide acétique ajouté de manière externe aux milieux de fermentations.

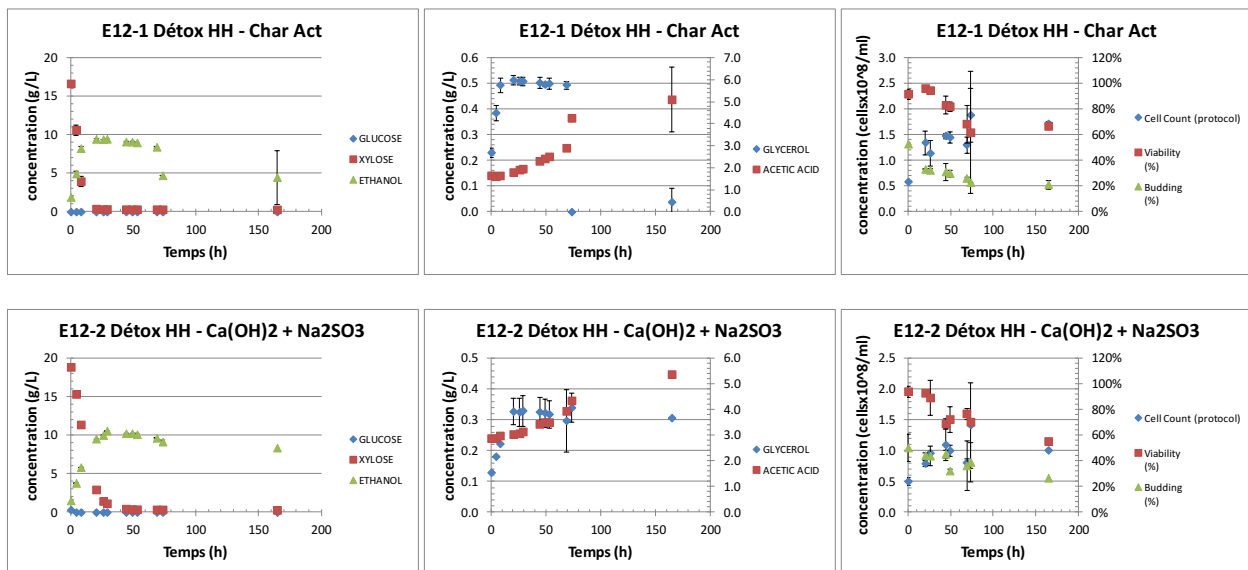
Fabrication des hydrolysats hémicellulosiques

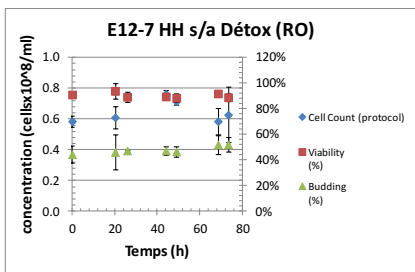
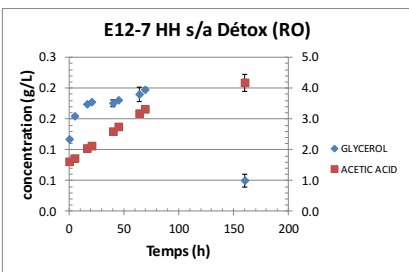
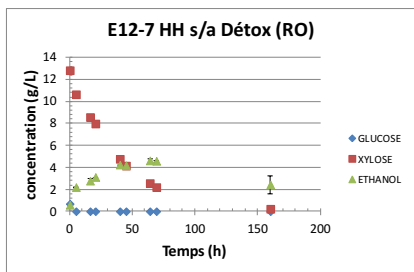
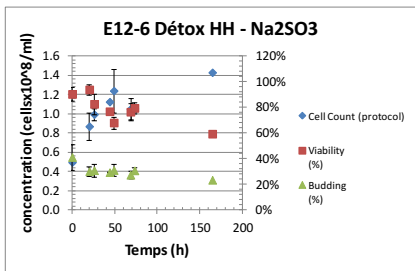
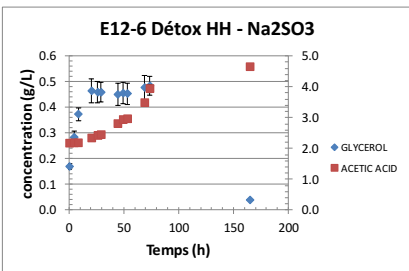
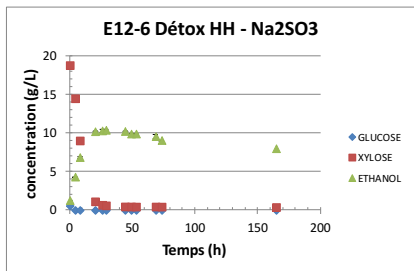
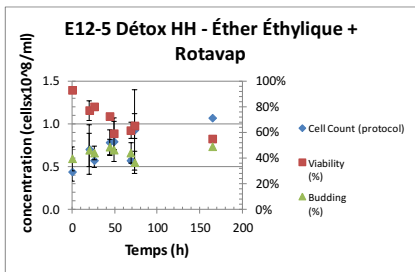
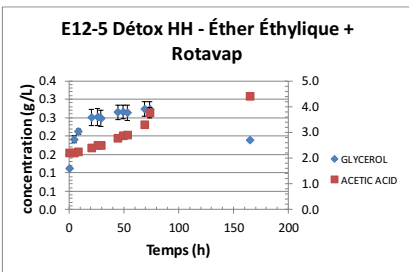
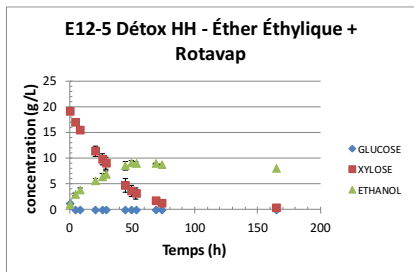
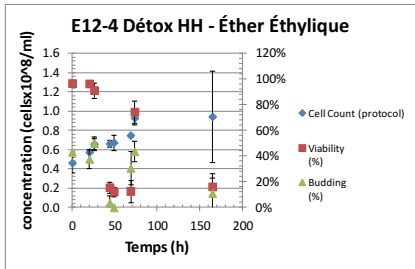
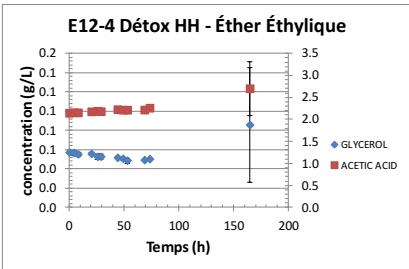
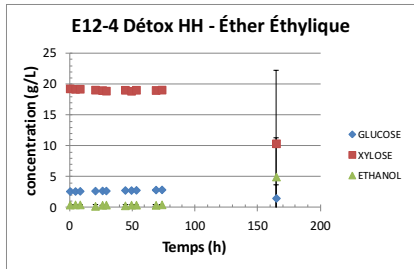
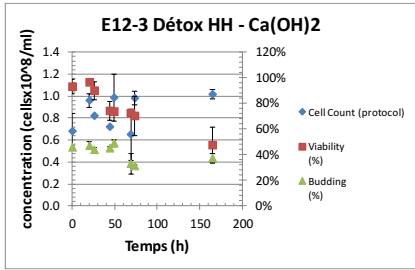
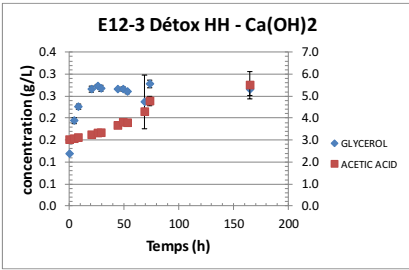
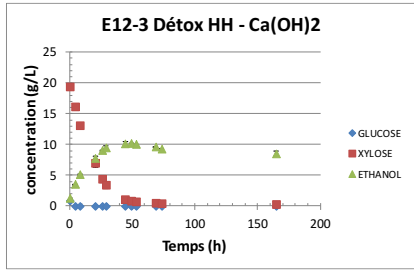
1. Broyage de la biomasse (*Phalaris canariensis*; Alpsite);
2. Imprégnation à faible concentration d'acide (1.8% H2SO4);
3. Étape d'explosion à la vapeur (haute température / haute pression);
4. Récupération de la fraction liquide et lavage;
5. Mélange des eaux de lavage et de la fraction liquide;
6. Neutralisation au CaCO3;
7. Filtration et concentration à l'osmose inverse.

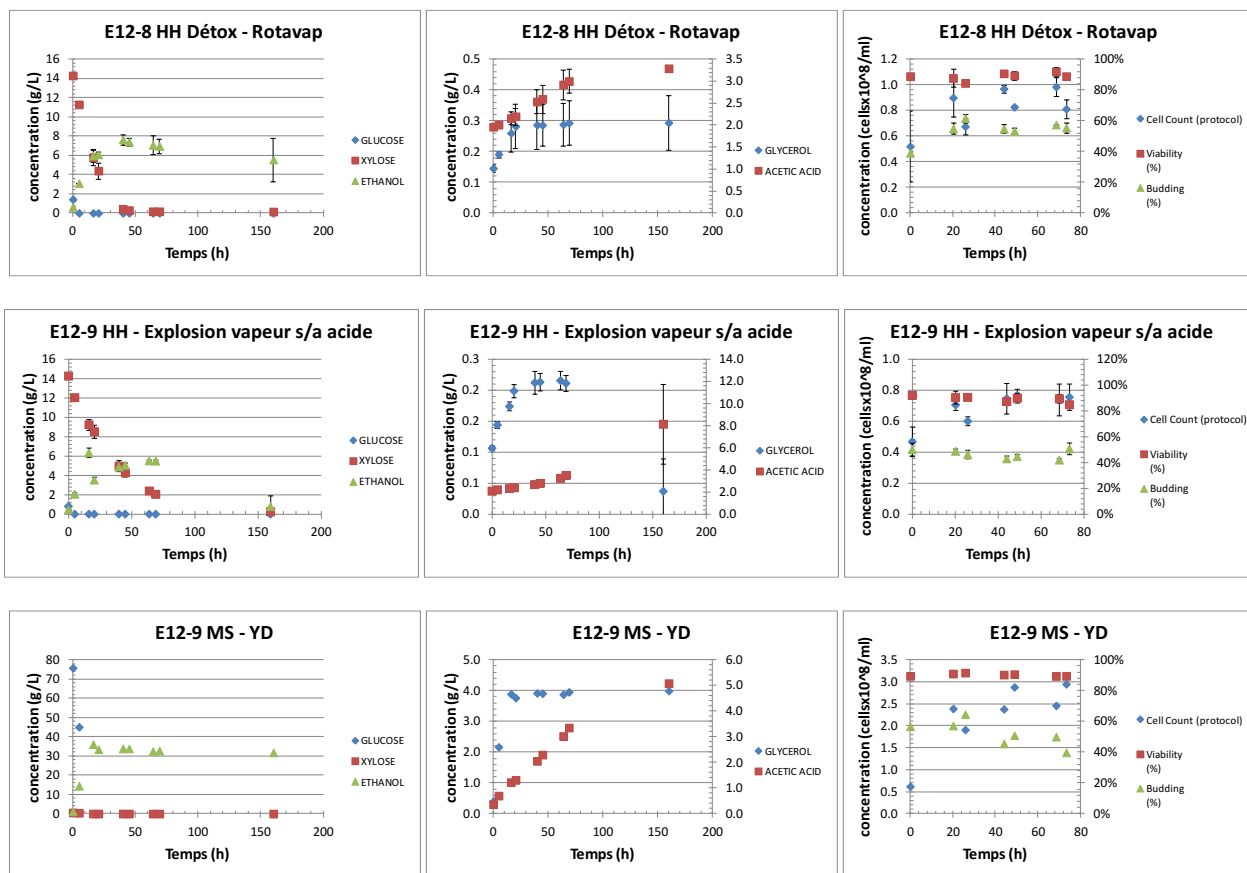
Détail des protocoles de détoxification des hydrolysats

Medium	Méthode de détoxification	Protocole
E12-7	s/a Détox (RO)	Raw HH, not detoxified, not modified.
E12-9	Explosion vapeur s/a acide	HH were produced without diluted H2SO4 acid impregnation before steam explosion. Instead, the Canary Grass was impregnated with H2O only. Concentrated by RO.
E12-8	RO + Rotavapor	HH which were further concentrated in Rotavapor after concentration by RO.
E12-1	Charbon activé	Using CaO, raise the HH pH to 7; Add 100g of activated charcoal; Stirr at 200rpm/30C for 1h; Remove solids by vacuum filtration.
E12-6	Na2SO3	Add 1g/L Na2SO3.
E12-3	Ca(OH)2	Using Ca(OH)2, increase pH to 10; Leave under mild agitation for 30min/60C; Ajust pH to 5.2 with H2SO4; Centrifuge and discard precipitate.
E12-4	Éther Éthylique	In a decanter, mix 100ml HH / 20ml of Ethyl Ether; Mix well for 5 min, decant and separate; Repeat 2 other times.
E12-2	Ca(OH)2 + Na2SO3	Using Ca(OH)2, increase pH to 10; Add 1g/L Na2SO3; Leave under mild agitation for 30min/60C; Ajust pH to 5.2 with H2SO4; Centrifuge and discard precipitate.
E12-5	Éther Éthylique + Rotavap	In a decanter, mix 100ml HH/ 20ml of Ethyl Ether; Mix well for 5 min, decant and separate; Repeat 2 other times; Evaporate remaning solvant in Rotavapor at 40C for approx 4h.

Résultats







#ID	Nom	Performances					Erreur Absolue						
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E12-1	Détox HH - Char Act	86.2%	0.39	NA	NA	0.79	NA	2.77%	0.002	NA	NA	0.065	NA
E12-2	Détox HH - Ca(OH) ₂ + Na ₂ SO ₃	91.2%	0.41	0.21	NA	0.40	NA	2.03%	0.001	0.001	NA	0.008	NA
E12-3	Détox HH - Ca(OH) ₂	90.2%	0.38	0.21	NA	0.24	NA	5.13%	0.010	0.005	NA	0.014	NA
E12-4	Détox HH - Éther Éthylique	ND	0.00	0.00	0.00	NA	NA	ND	0.000	0.000	0.000	NA	NA
E12-5	Détox HH - Éther Éthylique + Rotavap	93.9%	0.26	0.19	0.12	0.12	NA	18.71%	0.017	0.010	0.000	0.012	NA
E12-6	Détox HH - Na ₂ SO ₃	92.7%	0.43	NA	NA	0.44	NA	2.11%	0.004	NA	NA	0.008	NA
E12-7	HH s/a Détox (RO)	72.1%	0.13	0.09	0.06	0.04	NA	3.75%	0.001	0.001	0.004	0.002	NA
E12-8	HH Détox - Rotavap	81.2%	0.27	NA	NA	0.19	NA	13.67%	0.011	NA	NA	0.020	NA
E12-9	HH - Explosion vapeur s/a acide	77.8%	0.16	0.11	NA	0.07	NA	3.12%	0.007	0.003	NA	0.009	NA
E12-10	MS - YD	80.3%	NA	NA	NA	NA	2.70	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Conclusions

Noter que les rendements de récupération des sucres et d'enlèvements des inhibiteurs par les différentes techniques de détoxification ne seront pas abordés ici. Cela vient principalement du fait que ces expériences furent réalisées par un expérimentateur externe et que les données recueillies ne sont pas de qualité. Malheureusement, cela se reflète dans les données de fermentations présentées ici. Elles sont néanmoins assez probantes pour tirer certaines conclusions.

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Le milieu E12-7 est le milieu standard, c'est-à-dire le milieu n'ayant pas été détoxifié et duquel les autres milieux découlent. La raison pour laquelle sa concentration initiale en sucres totaux est plus basse que la majorité des autres milieux est inconnue.
2. Le milieu E12-9 est un milieu d'hydrolysats non détoxifiés, mais ayant été fabriqué par une méthode différente de ceux des autres milieux. Principalement, l'étape d'explosion à la vapeur s'est opérée sans acide sulfurique. Cela a été fait afin d'investiguer la possibilité que cette technique d'hydrolyse génère moins d'inhibiteurs. Bien que cette technique est connue pour avoir un rendement d'hydrolyse plus faible, si elle s'avère générer un milieu de fermentation moins toxique pour les levures, le jeu en vaudrait peut-être la chandelle.
3. À première vue, il semble que l'explosion à la vapeur sans acide ne soit pas significativement plus efficace à produire des hydrolysats fermentables que l'hydrolyse avec acide (E12-7 vs E12-9). Il apparaît aussi que l'éther éthylique est très toxique pour les levures (E12-4) et que si l'on veut l'utiliser comme méthode de détoxification il faudra le séparer efficacement du milieu (E12-5).
4. Il apparaît que la détoxification au charbon activé (E12-1) et au sulfite de sodium (E12-6) sont les méthodes les plus efficaces, puisqu'elles affichent les plus hautes productivités à 24h, mais surtout la plus haute productivité éthylique xylolytique. Le traitement à la chaux (E12-3) et sa combinaison au sulfite de sodium (E12-2) offrent des performances quelque peu moindres.

10.4.2. Série d'essais #13 : Méthodes de détoxification des hydrolysats (investigation préliminaire; suite)

Rationnelle

Idem à la série d'essais #12

Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	-	<i>ratio</i> <i>EL:Sucres</i>
Urée	-	<i>g/L</i>
Lactrol	0.01	<i>g/L</i>
pH	5.2	
Température	32	<i>C</i>
Agitation	150	<i>rpm</i>
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.85	<i>x10⁸ cell/ml</i>
Fermenteur	150ml Erlen	

#ID	Nom	Répliques	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E13-1	HH s/a Détox (RO; s/a YE)	2	Méthode de détoxification	Aucune	
			Milieu de fermentation (HH)	19.5	g/L sucres
			Acide Acétique	3:97	ratio Glu:Xyl
E13-2	HH Détox - Zéolithe	2	Méthode de détoxification	Zéolithe	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	20	g/L
			Acide Acétique	5:95	ratio Glu:Xyl
E13-3	HH Détox - DMC	2	Méthode de détoxification	Carbonate diméthyle	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	18.5	g/L
			Acide Acétique	5:95	ratio Glu:Xyl
E13-4	HH Détox - Éthyle Acétate	2	Méthode de détoxification	Éthyle Acétate	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E13-1)	18.5	g/L
			Acide Acétique	0:100	ratio Glu:Xyl
			Acide Acétique	ND	g/L

Noter que l'acide acétique est indiqué tel que retrouvé dans les hydrolysats. Il ne s'agit pas d'acide acétique ajouté de manière externe aux milieux de fermentations.

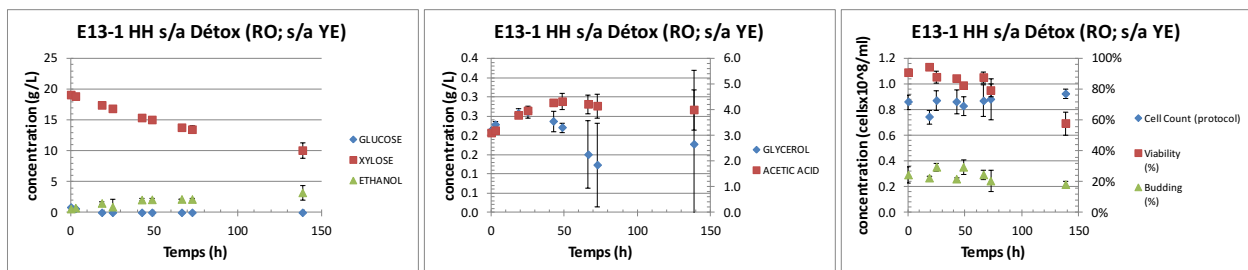
Fabrication des hydrolysats

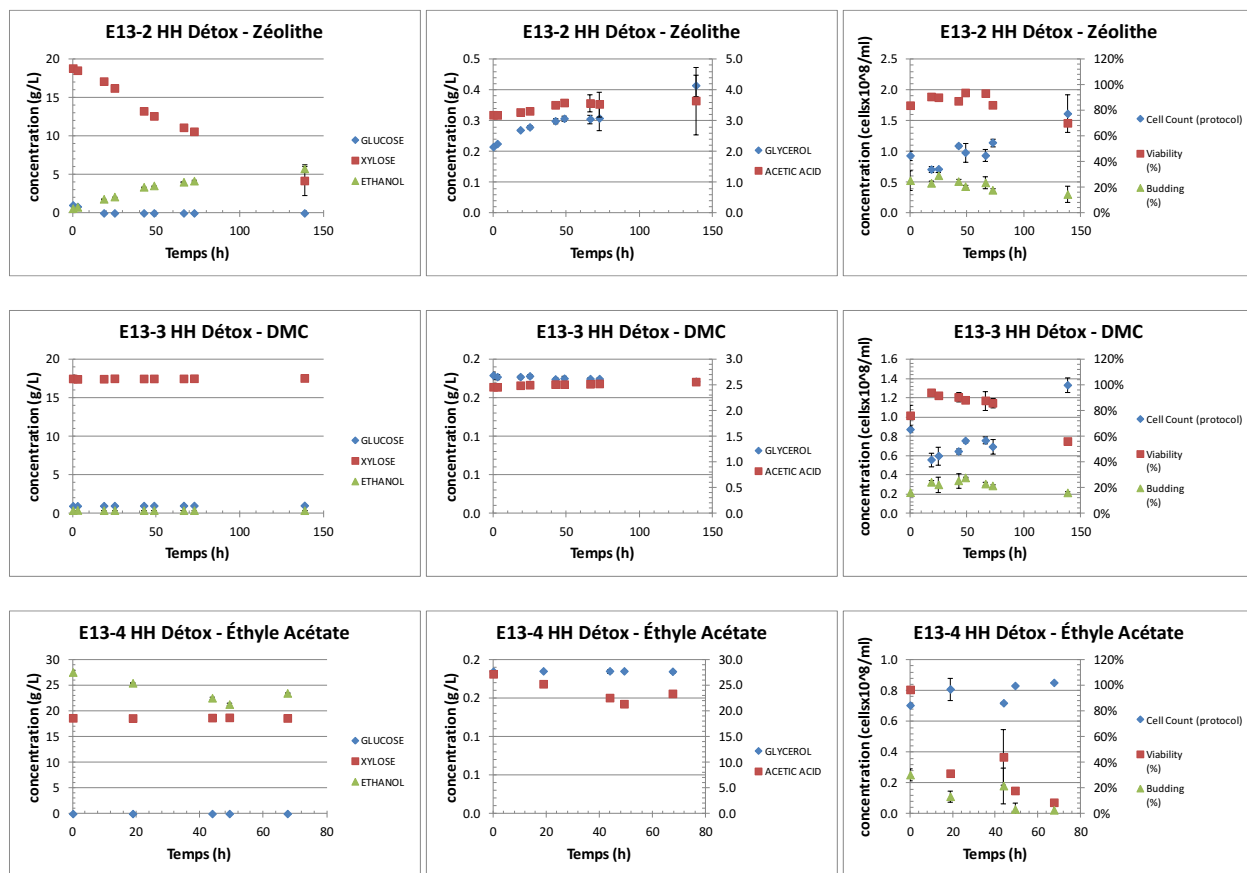
Idem à la série d'essais #12

Détail des protocoles de détoxification des hydrolysats

Medium	Méthode de détoxification	Protocole
E13-1	HH s/a Détox (RO; s/a YE)	Raw HH, not detoxified, not modified.
E13-2	HH Détox - Zéolithe	Using CaO, raise the HH pH to 7; Add 100g of zeolithe; Stirr at 200rpm/30C for 1h; Remove solids by vacuum filtration.
E13-3	HH Détox - DMC (carbonate de diméthyle)	In a decanter, mix 100ml HH/ 20ml of DMC; Mix well for 5 min, decant and separate; Repeat 2 other times.
E13-4	HH Détox - Éthyle Acétate	In a decanter, mix 100ml HH/ 20ml of Ethyl Acetate; Mix well for 5 min, decant and separate; Repeat 2 other times.

Résultats





#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E13-1	HH s/a Détox (RO; s/a YE)	49.7%	0.08	0.04	0.03	0.01	NA	5.89%	0.037	0.003	0.001	0.012	NA
E13-2	HH Détox - Zéolithe	76.7%	0.09	0.07	0.06	0.03	NA	3.11%	0.001	0.001	0.000	0.005	NA
E13-3	HH Détox - DMC	4.0%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-41.29%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E13-4	HH Détox - Éthyle Acétate	NA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Conclusions

Il est important de noter que les hydrolysats constituant le milieu E12-7 et ceux constituant E13-1 sont littéralement les mêmes. La raison pour laquelle E12-7 contient moins de sucres totaux initiaux est inconnue. Par contre on remarque la très faible performance du milieu E13-1 en comparaison à son homologue E12-7. La raison de cela est attribuable au fait qu'aucun extrait de levure n'a été ajouté au milieu de fermentation E13-1 (dû à une erreur de l'expérimentateur). Or, cette erreur expérimentale donne un aperçu de l'importance d'ajouter les nutriments essentiels aux levures dans les milieux de fermentation basés sur les LCH : rendement de 49.7% vs 72.1% et productivité de 0.04 vs 0.09 à 48h pour le milieu sans extrait de levure et celui avec, respectivement.

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Le diméthyl carbonate et l'éthyle acétate sont tous deux très toxiques pour les levures et si l'on veut les utiliser à des fins de détoxification, cela nécessitera une étape de séparation très efficace. D'ailleurs, l'analyse de l'éthanol dans le milieu E13-4 n'a pas pu être faite avec la colonne HPLC habituellement utilisée, car l'éthyle acétate masquait la majorité des pics. Conséquemment, les données quantifiant les métabolites de ce milieu ne sont pas valides.
2. La zéolithe semble une méthode très efficace de détoxification et pourrait être un substitue moins coûteux au charbon activé.

10.4.3. Série d'essais #14 : Méthodes de détoxification des hydrolysats (investigation principale)

Rationnelle

Suite aux résultats des séries d'essais #12 et #13, il est clair que certaines méthodes de détoxifications ne sont pas à point et nécessiteraient un effort R&D avant d'atteindre des résultats concluants. Par contre, 2 méthodes ont été retenues due à leur simplicité et leur efficacité afin d'investiguer leur efficacité sur des hydrolysats plus concentrés en sucres. Ces méthodes sont le traitement au charbon activé et au Na₂SO₃.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#14 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu de fermentation composé d'hydrolysats hémicellulosiques de Triticale détoxifié grâce aux méthodes de détoxification jugés les plus pertinents suite aux essais précédents.

Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Acide Acétique	10.5	g/L
Extrait de Levures	1:2	ratio EL:Sucres
Urée	-	g/L
Lactrol	0.01	g/L
pH	5.2	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.69	$\times 10^8$ cell/ml
Fermenteur	150ml Erlen	

#D	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E14-1	HH s/a Détox (Rotavap)	2	Méthode de détoxification	Aucune	
			Milieu de fermentation (HH)	84	g/L sucres ratio Glu:Xyl
E14-2	Détox HH - 1g/L Na ₂ SO ₃	2	Méthode de détoxification	1g/L Na ₂ SO ₃	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E14-1)	84	g/L sucres ratio Glu:Xyl
E14-3	Détox HH - 5g/L Na ₂ SO ₃	2	Méthode de détoxification	5g/L Na ₂ SO ₃	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E14-1)	83.5	g/L sucres ratio Glu:Xyl
E14-4	Détox HH - Char Act	2	Méthode de détoxification	Charbon Activé	
			Milieu de fermentation (HH; à partir de E14-1)	76	g/L sucres ratio Glu:Xyl
				6:94	

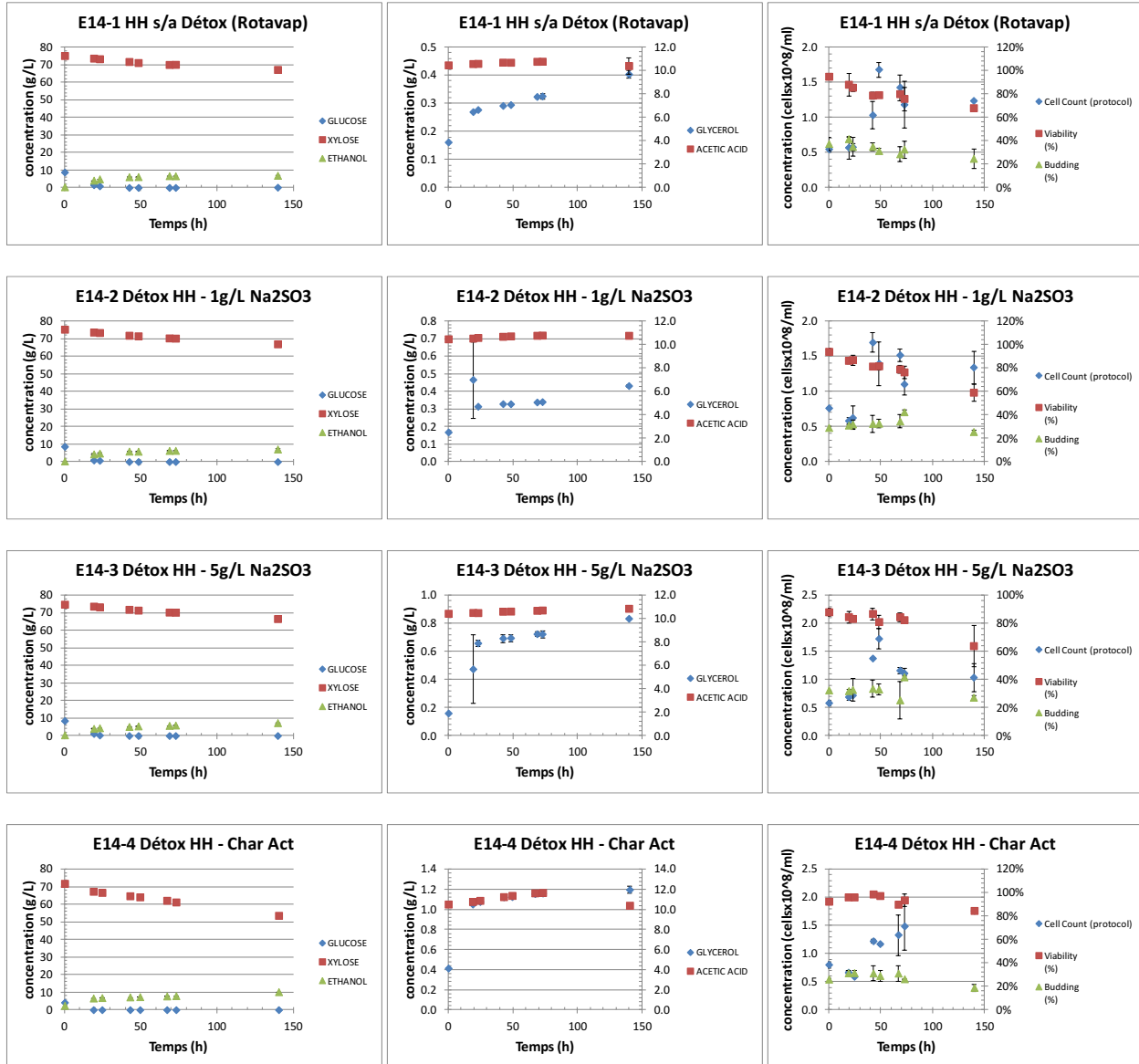
Fabrication des hydrolysats

Idem à la série d'essais #12.

Détail des protocoles de détoxification des hydrolysats

Idem aux protocoles détaillés dans la série d'essais #12.

Résultats



#ID	Nom	Y _{max}	Performances					Y _{max}	Erreur Absolue				
			Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)		Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E14-1	HH s/a Détox (Rotavap)	77.1%	0.21	0.13	0.09	0.02	0.20	1.77%	0.002	0.001	0.001	0.001	0.004
E14-2	Détox HH - 1g/L Na ₂ SO ₃	78.6%	0.20	0.12	0.09	0.03	0.20	7.92%	0.008	0.004	0.001	0.007	0.015
E14-3	Détox HH - 5g/L Na ₂ SO ₃	81.3%	0.19	0.11	0.08	0.03	0.18	4.44%	0.004	0.003	0.001	0.003	0.005
E14-4	Détox HH - Char Act	68.0%	0.29	0.15	0.11	0.02	NA	2.20%	0.000	0.000	0.001	0.001	NA

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Les hydrolysats non détoxifiés contenaient autour de 10 g/L d'acide acétique et cela s'est avéré extrêmement toxique pour les levures. La consommation du xylose était quasiment nulle dans tous les milieux testés. Noter que d'autres inhibiteurs pourraient être présents dans les hydrolysats, bien que seulement des traces de furfural et de 5-HMF ont été mesurées (données non montrées).
2. Le traitement au Na₂SO₃ ne semble pas avoir d'effet bénéfique sur des hydrolysats concentrés comme ceux-ci, contrairement à ce qui a été observé lors des essais #12 et #13.
3. Il en va de même pour le charbon activé, pour lequel on observe même une baisse significative de rendement et une légère hausse en productivité. Noter que la baisse en rendement pourrait provenir du fait qu'une plus grande quantité de xylose a été consommée. En effet, il a déjà été observé que le rendement de LOMG1 sur lors du catabolisme du xylose dans un milieu contenant des inhibiteurs est faible en comparaison à ceux observés lors du catabolisme du glucose (essais #19). La quasi-totalité de l'éthanol produite dans les autres milieux provenait seulement du glucose, un sucre beaucoup plus facilement métabolisable par LOMG1.
4. À la lumière de ces résultats, il est clair qu'un grand effort R&D doit être dirigé à trouver une méthode de détoxification techniquement et économiquement viable. Vu les très faibles performances des milieux testés ici, il est difficile de concevoir un procédé industriel rentable sans grandement améliorer le rendement et les cinétiques.

10.4.4. Série d'essais #17 : Aération du milieu de fermentation comme méthode atténuant l'effet des inhibiteurs ubiquitaires

Rationnelle

Outre les méthodes de détoxification pré-fermentaire des hydrolysats testés précédemment, il existe quelques méthodes permettant de diminuer l'effet néfaste des inhibiteurs ubiquitaires : l'augmentation de la concentration cellulaire initiale (série d'essais #16), l'aération du milieu de fermentation et le contrôle du pH. Ces trois méthodes sont suggérées dans la littérature. L'aération du milieu de fermentation diminue nécessairement le rendement éthylique de la fermentation en favorisant la croissance cellulaire et en permettant à la cellule d'utiliser sa chaîne respiratoire afin de générer de l'ATP au lieu de seulement utiliser le chemin métabolique fermentatif. Par contre, l'aération augmente l'activité et le taux de croissance des levures, ce qui pourrait atténué l'effet de certains inhibiteurs qui ont montré être principalement des inhibiteurs de croissance cellulaire.

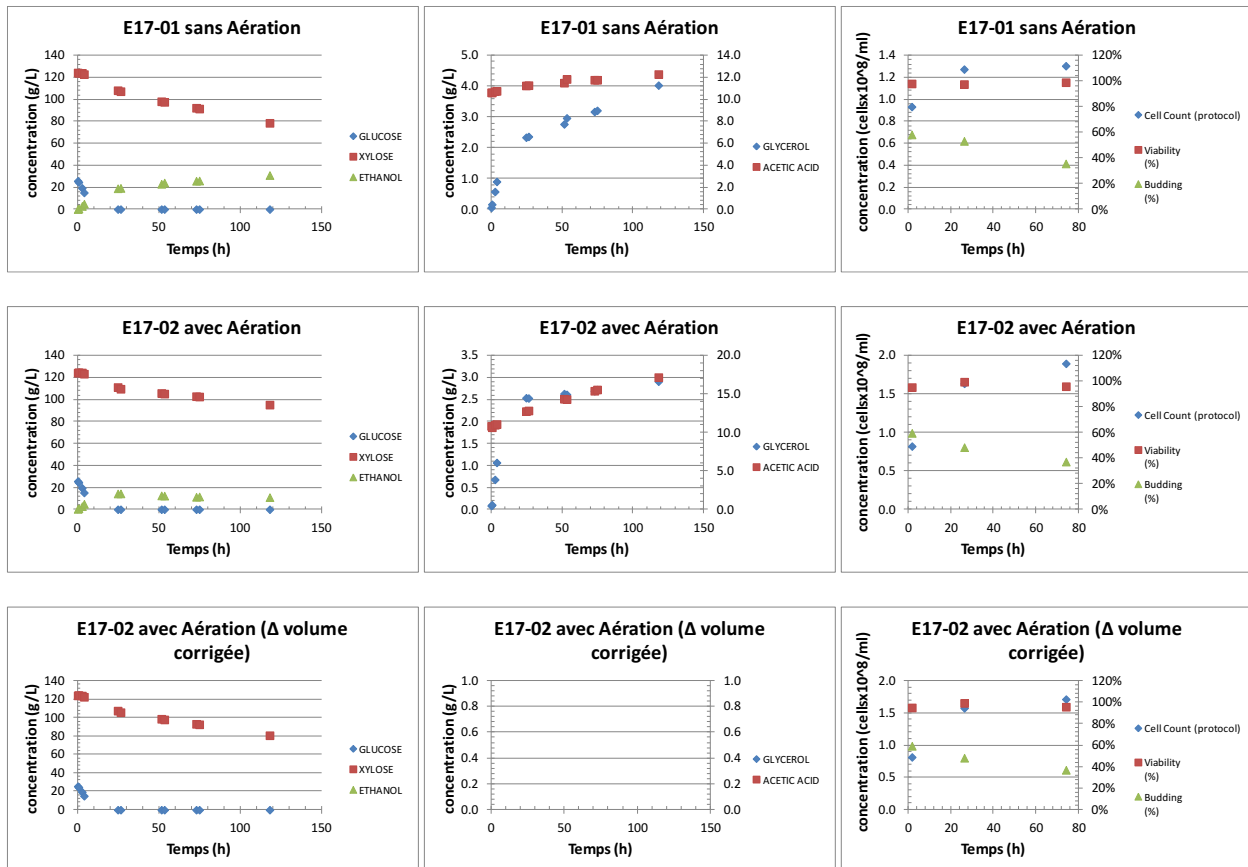
Dans cette optique, la série d'expériences Essais#17 investigate les performances de LOMG1 dans un milieu de fermentation synthétique contenant de l'acide acétique et du furfural à l'image d'hydrolysats hémicellulosiques. En plus, deux conditions sont testées : un milieu avec aération continue et un milieu sans aération. Il est important de quantifier les bénéfices que peut apporter une aération dans la fermentation, car un fermenteur nécessitant un système d'aération est plus coûteux en TCI et TPC qu'un fermenteur ordinaire sans aération.

Protocole

Composition et paramètres communs des milieux de cultures		
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Acide Acétique	10	g/L
Furfural	0.5	g/L
Extrait de Levures	37.5	g/L
Urée	0.5	g/L
Lactrol	0.1	g/L
pH	5.2	
Température	32	C
Agitation	200	rpm
[Cellulaire] initiale (RN1016)	0.89	$\times 10^8$ cell/ml
	2.1	g/L
Fermenteur	Bioréacteur 2L	

#ID	Nom	Réplicas	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E17-1	sans Aération	1	Milieu de fermentation (MS)	150	g/L sucres
			Aération	0	vvm
E17-2	avec Aération	1	Milieu de fermentation (MS)	150	g/L sucres
			Aération	0.25	vvm

Résultats



#ID	Nom	Performances						Erreur Absolue					
		Y _{max}	Q _{Eth}	Q _{Eth}	Q _{Eth}	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}	Y _{max}	Q _{Eth}	Q _{Eth}	Q _{Eth}	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
			@24h	@48h	@72h				@24h	@48h	@72h		
E17-1	sans Aération	84.5%	0.77	0.46	0.36	0.13	1.26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E17-2	avec Aération	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Conclusions

Le fait d'utiliser une aération dans le milieu de fermentation E17-2 a posé des problèmes quant à la quantification de l'éthanol et de l'acide acétique. En effet, ces deux substances volatiles étaient entraînées en dehors du fermenteur par l'aération et ceci, de manière non quantifiable. Conséquemment, afin de comparer l'effet de l'aération, il faut comparer la consommation en sucres et assumer que le rendement éthylique est le même.

Les figures de suivi de fermentation présentent les résultats. Un intérêt particulier est donné aux concentrations en sucres et en biomasse corrigées pour le volume perdu du milieu E17-2. En comparant la consommation en sucres de ce milieu avec celles de E17-1, il est possible de comparer au moins les cinétiques de catabolisme des sucres et de croissance cellulaires (deux substances non volatiles). On s'aperçoit qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux milieux : aéré et non aéré. On remarque aussi que la biomasse finale dans le milieu aéré est légèrement plus haute, ce qui peut être attendu en sachant que la réplification cellulaire est plus rapide en présence d'oxygène.

À des concentrations élevées d'inhibiteurs comme celle testée ici, il ne semble pas y avoir davantage à aérer le milieu de fermentation. De plus, même si une certaine aération procurait un léger avantage, il serait difficile de justifier le coût additionnel au niveau industriel. En effet, un système d'aération et de récupération de l'éthanol entraînée hors du fermenteur est difficilement envisageable à faibles coûts.

10.4.5. Série d'essais #18 : Le contrôle du pH comme méthode atténuant l'effet des inhibiteurs ubiquitaires

Rationnelle

Tel que mentionné lors de la rationnelle de la série d'essais #17, le contrôle du pH a été démontré avoir un effet positif sur les performances de fermentation. De plus, il est connu que le pH diminue durant la fermentation éthylique par *S. cerevisiae* (voir section 10.4.5). Un pH plus élevé diminuerait l'inhibition par l'acide acétique, bien que cela n'a pas pu être démontré pour la souche LOMG1 (voir essais #4 et #5). Il est donc supposé que le contrôle du pH peut avoir des effets positifs dans le cas d'une fermentation d'HH contenant des inhibiteurs ubiquitaires.

Dans cette optique, la série d'expériences Essais#18 investigate les performances de fermentation de LOMG1 en milieu synthétique contenant de l'HAc, du furfural et avec un contrôle du pH. Il est important de quantifier les bénéfices en performances de fermentation apportés par un système de contrôle du pH, car cela implique un coût additionnel en TCI et TPC à l'échelle industrielle. Néanmoins, un tel système est assez standard et n'est habituellement pas très coûteux.

Protocole

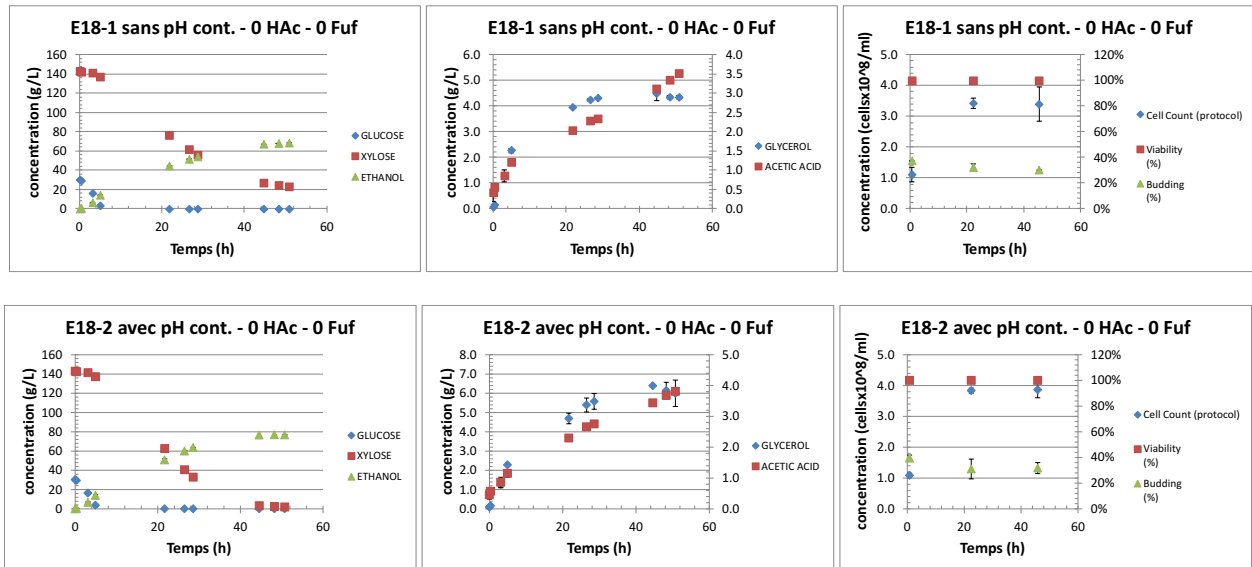
Composition et paramètres communs des milieux de cultures

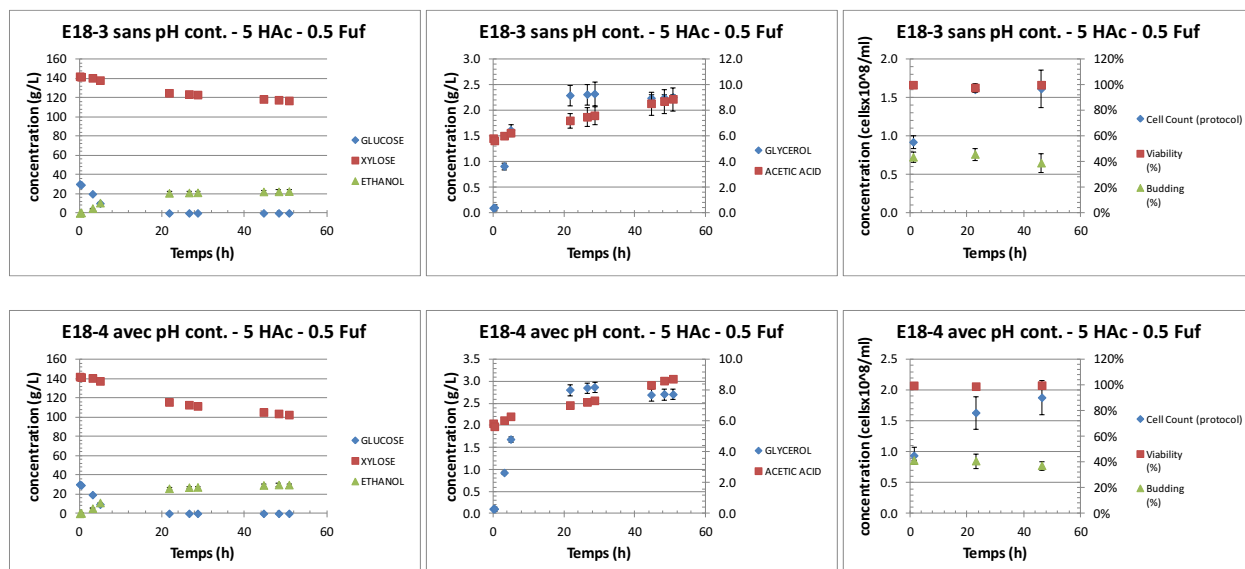
Substance / Paramètre	Consigne	Unité
Extrait de Levures	37.5	g/L
Urée	0.5	g/L
Lactrol	0.1	g/L
pH ini	5.2	
Température	32	C
Agitation	150	rpm
Conc. cellulaire initiale (RN1016)	1.02	$\times 10^8$ cell/ml
	2.1	g/L
Fermenteur	150mL Erlen	

#ID	Nom	Répliques	Composition et paramètres du milieu de culture		
			Substance / Paramètre	Consigne	Unité
E18-1	sans pH cont. - 0 HAc - 0 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	173.5	g/L sucres
				17:83	ratio Glu:Xyl
			Acide Acétique	0	g/L
			Furfural	0	g/L
			contrôle pH?		Non
E18-2	avec pH cont. - 0 HAc - 0 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	173	g/L sucres
				18:82	ratio Glu:Xyl
			Acide Acétique	0	g/L
			Furfural	0	g/L
			contrôle pH?		Oui
E18-3	sans pH cont. - 5 HAc - 0.5 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	172	g/L sucres
				18:92	ratio Glu:Xyl
			Acide Acétique	5	g/L
			Furfural	0.5	g/L
			contrôle pH?		Non
E18-4	avec pH cont. - 5 HAc - 0.5 Fuf	2	Milieu de fermentation (MS)	172	g/L sucres
				18:92	ratio Glu:Xyl
			Acide Acétique	5	g/L
			Furfural	0.5	g/L
			contrôle pH?		Oui

Noter que le contrôle du pH s'est fait de manière manuelle.

Résultats





#ID	Nom	Performances					Erreur Absolue						
		Y _{max}	Q _{Eth} @24h (g/L-h)	Q _{Eth} @48h (g/L-h)	Q _{Eth} @72h (g/L-h)	Q _{Eth_Xyl} (g/L-h)	Q _{Eth_Glu} (g/L-h)	Y _{max}	Q _{Eth} @24h	Q _{Eth} @48h	Q _{Eth} @72h	Q _{Eth_Xyl}	Q _{Eth_Glu}
E18-1	sans pH cont. - 0 HAC - 0 Fuf	89.1%	1.99	1.42	NA	0.99	2.91	0.80%	0.017	0.002	NA	0.025	0.119
E18-2	avec pH cont. - 0 HAC - 0 Fuf	88.1%	2.44	1.60	NA	1.85	2.85	0.52%	0.031	NA	NA	ND	0.166
E18-3	sans pH cont. - 5 HAC - 0.5 Fuf	80.4%	0.88	0.47	NA	0.06	2.18	7.48%	0.052	0.028	NA	0.128	0.164
E18-4	avec pH cont. - 5 HAC - 0.5 Fuf	85.6%	1.13	0.62	NA	0.13	2.29	7.74%	0.033	0.023	NA	0.085	0.116

Conclusions

En analysant les figures de suivi de fermentation et le tableau récapitulatif des performances ci-dessus, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1. Le contrôle du pH est bénéfique pour tous les aspects de performances de la fermentation : le rendement, la productivité et la croissance cellulaire. De plus, bien que cela ne se reflète pas directement dans le tableau des performances, il est très important de souligner que dans le milieu E18-2, tout le xylose a été efficacement et rapidement métabolisé. Il apparaît donc que le pH joue un rôle crucial pour le métabolisme du xylose chez LOMG1. En effet, dans le milieu avec et sans inhibiteurs, le pH a permis de doubler la productivité éthylique xylolytique.
2. Il est néanmoins difficile d'être certain de l'aspect bénéfique du contrôle du pH pour les milieux avec inhibiteurs (E18-3 et E18-4), vu l'intersection de leurs incertitudes. En comparant les productivités à 48h, on observe un gain de 13% et de 32% pour les milieux ayant un contrôle du pH sans inhibiteurs et avec inhibiteurs respectivement.
3. Le contrôle du pH peut donc être une solution permettant de réduire l'impact des inhibiteurs. Par contre, la différence de performances entre un milieu ayant des inhibiteurs et un milieu de fermentation « propre » est encore très élevée, avec ou sans contrôle du pH. Encore une fois en comparant les productivités à 48h : même avec contrôle du pH, la présence de 5 g/L d'HAc et 0.5 g/L de Fuf on assiste à une baisse de 61% entre les milieux E18-4 et E18-2.

11. Annexe D : Tableau des écoulements

Cette annexe présente le tableau des écoulements de la simulation ChemCAD du procédé LCH. L'identification des flux (« Stream No. ») correspond aux flux de la simulation ChemCAD, telle que présenté dans la section 4.7.

Tableau 11.1: Tableau des écoulements de la simulation ChemCAD du le procédé LCH

Stream No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Stream Name	LCH		Urea	Water			Urea_F-W	Corn Mash									F-Broth		F-Broth	Yeast
Temp C	15	15.0001	15	15	15.0306	32.8967	15.0299	33	0	15.0299	15.0004	32.8967	31.6145	31.6145	16.131	16.131	32.8967	0	32.8967	15
Pres bar	1.01	1.01	1.01	1.01	2	1.08	2	1.01	0	2	1.01	1.08	1.01	1.01	1.08	1.08	1.08	0	1.08	1.01
Enth kW	-6001.2	-30.743	-1.472	-29.063	-30.743	-6569.8	-6031.9	-389.05	0	-6031.9	-34.244	-6569.8	-423.3	-423.3	-6431.5	-6431.5	-6569.8	0	-6569.8	-5.1515
Vapor mole frac.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total kmol/h	69.7235	0.3791	0.0126	0.3653	0.3791	76.9197	70.1026	4.1978	0	70.1026	0.3975	76.9197	4.5952	4.5952	74.8239	74.8239	76.9197	0	76.9197	0.032
Total kg/h	1500.386	7.4096	0.7542	6.58	7.4096	1645.938	1507.796	104.6208	0	1507.796	7.3375	1645.938	111.9583	111.9583	1608.182	1608.182	1645.938	0	1645.938	0.7438
Total std L m3/h	1.3245	0.0072	0.0006	0.0066	0.0072	1.4648	1.3317	0.0781	0	1.3317	0.0071	1.4648	0.0852	0.0852	1.4271	1.4271	1.4648	0	1.4648	0.0005
Total std V m3/h	1562.76	8.5	0.28	8.19	8.5	1724.05	1571.26	94.09	0	1571.26	8.91	1724.05	103	103	1677.08	1677.08	1724.05	0	1724.05	0.72
Flowrates in kg/h																				
Water	1225.192	6.58	0	6.58	6.58	1346.782	1231.772	71.1422	0	1231.772	6.58	1346.782	77.7222	77.7222	1309.027	1309.027	1346.782	0	1346.782	0
Alpha-D-Glucose	175.2844	0	0	0	0	175.2844	175.2844	27.2014	0	175.2844	0	175.2844	27.2014	27.2014	175.2844	175.2844	175.2844	0	175.2844	0
D-Xylose	90.0909	0	0	0	0	90.0909	90.0909	0	0	90.0909	0	90.0909	0	0	90.0909	90.0909	90.0909	0	90.0909	0
Ethanol	0	0	0	0	0	9.899	0	0	0	0	0	9.899	0	0	9.899	9.899	9.899	0	9.899	0
Glycerol	0	0	0	0	0	1.6259	0	0	0	0	0	1.6259	0	0	1.6259	1.6259	1.6259	0	1.6259	0
Acetic Acid	6.6344	0	0	0	0	7.1498	6.6344	0	0	6.6344	0	7.1498	0	0	7.1498	7.1498	7.1498	0	7.1498	0
5-HMF	1.3269	0	0	0	0	1.3269	1.3269	0	0	1.3269	0	1.3269	0	0	1.3269	1.3269	1.3269	0	1.3269	0
Furfural	0.2654	0	0	0	0	0.2654	0.2654	0	0	0.2654	0	0.2654	0	0	0.2654	0.2654	0.2654	0	0.2654	0
Formic Acid	0.2654	0	0	0	0	0.2654	0.2654	0	0	0.2654	0	0.2654	0	0	0.2654	0.2654	0.2654	0	0.2654	0
Levulinic Acid	1.3269	0	0	0	0	1.3269	1.3269	0	0	1.3269	0	1.3269	0	0	1.3269	1.3269	1.3269	0	1.3269	0
Carbon Dioxide	0	0	0	0	0	0.0463	0	0	0	0	0	0.0463	0	0	0.0463	0.0463	0.0463	0	0.0463	0
Yeast	0	0	0	0	0	1.7751	0	0	0	0	0.7438	1.7751	0.7438	0.7438	1.7751	1.7751	1.7751	0	1.7751	0.7438
USS	0	0	0	0	0	2.0924	0	2.0924	0	0	0	2.0924	2.0924	2.0924	2.0924	2.0924	2.0924	0	2.0924	0
UDS	0	0	0	0	0	7.1762	0	4.1848	0	0	0	7.1762	4.1848	4.1848	7.1762	7.1762	7.1762	0	7.1762	0
Urea	0	0.7542	0.7542	0	0.7542	0.7542	0.7542	0	0	0.7542	0.0074	0.7542	0.0074	0.0074	0.7542	0.7542	0.7542	0	0.7542	0
YEN	0	0.0754	0	0	0.0754	0.0754	0.0754	0	0	0.0754	0.0056	0.0754	0.0056	0.0056	0.0754	0.0754	0.0754	0	0.0754	0
Lactrol	0	0	0	0	0	0.0007	0	0	0	0	0.0007	0.0007	0.0007	0.0007	0.0007	0.0007	0.0007	0	0.0007	0
Nitrogen	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	0.0006	0.0006	0.0006	0	0.0006	0
Oxygen	0	0	0	0	0	0.0003	0	0	0	0	0	0.0003	0	0	0.0003	0.0003	0.0003	0	0.0003	0

STREAM PROPERTIES																				
Stream No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Name	LCH		Urea	Water			Urea_F-W	Corn Mash									F-Broth		F-Broth	Yeast
-- Overall --																				
Molar flow kmol/h	69.7235	0.3791	0.0126	0.3653	0.3791	76.9197	70.1026	4.1978	0	70.1026	0.3975	76.9197	4.5952	4.5952	74.8239	74.8239	76.9197	0	76.9197	0.032
Mass flow kg/h	1500.386	7.4096	0.7542	6.58	7.4096	1645.938	1507.796	104.6208	0	1507.796	7.3375	1645.938	111.9583	111.9583	1608.182	1608.182	1645.938	0	1645.938	0.7438
Temp C	15	15.0001	15	15	15.0306	32.8967	15.0299	33	0	15.0299	15.0004	32.8967	31.6145	31.6145	16.131	16.131	32.8967	0	32.8967	15
Pres bar	1.01	1.01	1.01	1.01	2	1.08	2	1.01	0	2	1.01	1.08	1.01	1.01	1.08	1.08	1.08	0	1.08	1.01
Vapor mole fraction	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Enth kW	-6001.2	-30.743	-1.472	-29.063	-30.743	-6569.8	-6031.9	-389.05	0	-6031.9	-34.244	-6569.8	-423.3	-423.3	-6431.5	-6431.5	-6569.8	0	-6569.8	-5.1515
Tc C	741.8715	416.1577	431.85	374.2	416.1577	753.5966	740.3146	1396.72	0	740.3146	1667.127	753.5966	1415.527	1415.527	762.1657	762.1657	753.5966	0	753.5966	4885.85
Pc bar	1038.756	292.8601	90.5	221.1823	292.8601	1045.381	1035.243	2011.029	0	1035.243	2055.47	1045.381	2003.504	2003.504	1062.178	1062.178	1045.381	0	1045.381	537.0004
Std. sp gr. wtr = 1	1.133	1.032	1.335	1	1.032	1.124	1.132	1.339	0	1.132	1.036	1.124	1.314	1.314	1.127	1.127	1.124	0	1.124	1.5
Std. sp gr. air = 1	0.743	0.675	2.074	0.622	0.675	0.739	0.743	0.861	0	0.743	0.637	0.739	0.841	0.841	0.742	0.742	0.739	0	0.739	0.802
Degree API	-6.5879	5.6116	-25.5075	10	5.6116	-5.5714	-6.528	-25.817	0	-6.528	5.1377	-5.5714	-23.7883	-23.7883	-5.937	-5.937	-5.5714	0	-5.5714	-37.1667
Average mol wt	21.5191	19.5453	60.056	18.015	19.5453	21.3981	21.5084	24.923	0	21.5084	18.4601	21.3981	24.3639	24.3639	21.4929	21.4929	21.3981	0	21.3981	23.2376
Actual dens kg/m3	1131.481	1023.373	1230.007	998.7349	1023.369	1117.622	1130.813	1343.801	0	1130.813	1065.495	1117.622	1321.311	1321.311	1126.257	1126.257	1117.622	0	1117.622	2571.657
Actual vol m3/h	1.326	0.0072	0.0006	0.0066	0.0072	1.4727	1.3334	0.0779	0	1.3334	0.0069	1.4727	0.0847	0.0847	1.4279	1.4279	1.4727	0	1.4727	0.0003
Std liq m3/h	1.3245	0.0072	0.0006	0.0066	0.0072	1.4648	1.3317	0.0781	0	1.3317	0.0071	1.4648	0.0852	0.0852	1.4271	1.4271	1.4648	0	1.4648	0.0005
Std vap O C m3/h	1562.759	8.497	0.2815	8.1866	8.497	1724.05	1571.256	94.0873	0	1571.256	8.9089	1724.05	102.9963	102.9963	1677.076	1677.076	1724.05	0	1724.05	0.7174
-- Vapor only --																				
Molar flow kmol/h																				
Mass flow kg/h																				
Average mol wt																				
Actual dens kg/m3																				
Actual vol m3/h																				
Std liq m3/h																				
Std vap O C m3/h																				
Cp kJ/kg-K																				
Z factor																				
Visc N-s/m2																				
Th cond W/m-K																				
-- Liquid only --																				
Molar flow kmol/h	69.7235	0.3791	0.0126	0.3653	0.3791	76.9197	70.1026	4.1978		70.1026	0.3975	76.9197	4.5952	4.5952	74.8239	74.8239	76.9197		76.9197	0.032
Mass flow kg/h	1500.386	7.4096	0.7542	6.58	7.4096	1645.938	1507.796	104.6208		1507.796	7.3375	1645.938	111.9583	111.9583	1608.182	1608.182	1645.938		1645.938	0.7438
Average mol wt	21.5191	19.5453	60.056	18.015	19.5453	21.3981	21.5084	24.923		21.5084	18.4601	21.3981	24.3639	24.3639	21.4929	21.4929	21.3981		21.3981	23.2376
Actual dens kg/m3	1131.482	1023.373	1230.007	998.7349	1023.369	1117.622	1130.813	1343.801		1130.813	1065.495	1117.622	1321.311	1321.311	1126.257	1126.257	1117.622		1117.622	2571.657
Actual vol m3/h	1.326	0.0072	0.0006	0.0066	0.0072	1.4727	1.3334	0.0779		1.3334	0.0069	1.4727	0.0847	0.0847	1.4279	1.4279	1.4727		1.4727	0.0003
Std liq m3/h	1.3245	0.0072	0.0006	0.0066	0.0072	1.4648	1.3317	0.0781		1.3317	0.0071	1.4648	0.0852	0.0852	1.4271	1.4271	1.4648		1.4648	0.0005
Std vap O C m3/h	1562.759	8.497	0.2815	8.1866	8.497	1724.05	1571.256	94.0873		1571.256	8.9089	1724.05	102.9963	102.9963	1677.076	1677.076	1724.05		1724.05	0.7174
Cp kJ/kg-K	3.7014	3.9408	2.0065	4.196	3.9408	3.7066	3.7042	3.2339		3.7042	3.8509	3.7066	3.2735	3.2735	3.6985	3.6985	3.7066		3.7066	0.8418
Z factor	0.003	0.0011	0.0027	0.001	0.0021	0.0058	0.0061	0.0058		0.0058	0.0011	0.0029	0.0057	0.0057	0.0031	0.0031	0.0029		0.0029	0.0029
Visc N-s/m2	0.001977	0.001147	0.0004	0.001163	0.001146	0.001206	0.00197	0.003738		0.00197	0.007678	0.001206	0.004014	0.004014	0.001972	0.001972	0.001206		0.001206	17230000
Th cond W/m-K	0.5661	0.5469	0.2143	0.5915	0.547	0.5851	0.566	0.6414		0.566	0.7549	0.5851	0.6458	0.6458	0.5643	0.5643	0.5851		0.5851	66.9456
Surf. tens. N/m	0.0775	0.075	0.0833	0.0738	0.075	0.0735	0.0775	0.0646		0.0775	0.0855	0.0735	0.0661	0.0661	0.0765	0.0765	0.0735		0.0735	0.9358

FLOW SUMMARIES																						
Stream No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
Stream Name						Urea	P-Broth						YEN	Lactrol	YEN	P-Beer						Stillage
Temp C	16.131	41.6366	45.4975	45.4975	53.8833	15	31.6433	31.6145	0	15	15	15.0299	15	33	31.6431	33	33	33	85.0731	25		
Pres bar	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.01	2	1.01	0	1.01	1.01	2	1.01	1.01	2	1.01	1.08	1.08	0.5785	1.01		
Enth kW	-6431.5	-6556.9	-6528.3	-6527.7	-424.95	-0.01438	-423.3	-423.3	0	-0.20867	-0.00023	-6031.9	-0.01551	-399.56	-423.3	-28.553	-302.78	-6551.4	-7131.3	-204.38		
Vapor mole frac.	0	0.023983	0.037847	0.037854	0.12185	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.035213	0	0		
Total kmol/h	74.8239	79.6156	80.9335	80.9198	5.2847	0.0001	4.5952	4.5952	0	0.0013	0	70.1026	0.0001	4.7213	4.5952	0.5634	2.8494	80.9198	90.4103	2.6507		
Total kg/h	1608.182	1645.938	1645.938	1645.938	120.1836	0.0074	111.9583	111.9583	0	0.0754	0.0007	1507.796	0.0056	100.3863	111.9583	19.7973	122.2083	1645.938	1671.171	121.1722		
Total std L m3/h	1.4271	1.6395	1.6869	1.6854	0.1189	0	0.0852	0.0852	0	0	0	1.3317	0	0.0954	0.0852	0.0235	0.1474	1.6854	1.6541	0.152		
Total std V m3/h	1677.08	1784.48	1814.01	1813.71	118.45	0	103	103	0	0.03	0	1571.26	0	105.82	103	12.63	63.87	1813.71	2026.42	59.41		
Flowrates in kg/h																						
Water	1309.027	1346.782	1346.782	1346.782	77.7222	0	77.7222	77.7222	0	0	0	1231.772	0	77.2544	77.7222	0.4678	2.3094	1346.782	1614.879	0.6058		
Alpha-D-Glucose	175.2844	0	0	0	0	0	27.2014	27.2014	0	0	0	175.2844	0	0	27.2014	0	0	0	0	0		
D-Xylose	90.0909	90.0909	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90.0909	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ethanol	9.899	85.2712	124.0103	124.0103	10.569	0	0	0	0	0	0	0	0	9.899	0	0.6701	2.8137	124.0103	0.1746	120.5665		
Glycerol	1.6259	15.6487	17.0001	17.0001	1.6259	0	0	0	0	0	0	0	0	1.6259	0	0	0	17.0001	17.0001	0		
Acetic Acid	7.1498	14.1612	20.4675	20.4675	0.5193	0	0	0	0	0	0	6.6344	0	0.5154	0	0.0039	0.0487	20.4675	20.2608	0		
5-HMF	1.3269	1.3269	1.3269	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3269	0	0	0	0	0	0	0	0		
Furfural	0.2654	0.2654	0.2654	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2654	0	0	0	0	0	0	0	0		
Formic Acid	0.2654	0.2654	0.2654	0.2654	0	0	0	0	0	0	0	0.2654	0	0	0	0	0.0005	0.2654	0.2635	0		
Levulinic Acid	1.3269	1.3269	1.3269	1.3269	0	0	0	0	0	0	0	1.3269	0	0	0	0	0	1.3269	1.3269	0		
Carbon Dioxide	0.0463	77.1893	118.8193	118.8193	10.486	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0463	0	10.4398	117.035	118.8193	0	0		
Yeast	1.7751	1.8101	1.8101	1.8101	1.7751	0	0.7438	0.7438	0	0	0	0	0	1.7751	0.7438	0	0	1.8101	1.8101	0		
USS	2.0924	2.0924	2.0924	2.0924	2.0924	0	2.0924	2.0924	0	0	0	0	0	2.0924	2.0924	0	0	2.0924	2.0924	0		
UDS	7.1762	8.8761	10.9402	13.3628	7.1762	0	4.1848	4.1848	0	0	0	0	0	7.1762	4.1848	0	0	13.3628	13.3628	0		
Urea	0.7542	0.7542	0.7542	0	0	0.0074	0.0074	0.0074	0	0	0	0.7542	0	0.0074	0	0	0	0	0	0		
YEN	0.0754	0.0754	0.0754	0	0	0	0.0056	0.0056	0	0.0754	0	0.0754	0.0056	0	0.0056	0	0	0	0	0		
Lactrol	0.0007	0.0007	0.0007	0	0.0007	0	0.0007	0.0007	0	0	0.0007	0	0	0.0007	0.0007	0	0	0	0	0		
Nitrogen	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	6.4979	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0006	0	6.4973	0.0006	0.0006	0	0		
Oxygen	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	1.7188	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0003	0	1.7185	0.0003	0.0003	0	0		

STREAM PROPERTIES																					
Stream No.	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
Name						Urea	P-Broth			YEN	Lactrol		YEN	P-Beer					Stillage		
-- Overall --																					
Molar flow kmol/h	74.8239	79.6156	80.9335	80.9198	5.2847	0.0001	4.5952	4.5952	0	0.0013	0	70.1026	0.0001	4.7213	4.5952	0.5634	2.8494	80.9198	90.4103	2.6507	
Mass flow kg/h	1608.182	1645.938	1645.938	1645.938	120.1836	0.0074	111.9583	111.9583	0	0.0754	0.0007	1507.796	0.0056	100.3863	111.9583	19.7973	122.2083	1645.938	1671.171	121.1722	
Temp C	16.131	41.6366	45.4975	45.4975	53.8833	15	31.6433	31.6145	0	15	15	15.0299	15	33	31.6431	33	33	33	85.0731	25	
Pres bar	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.01	2	1.01	0	1.01	1.01	2	1.01	1.01	2	1.01	1.08	1.08	0.5785	1.01	
Vapor mole fraction	0	0.02398	0.03785	0.03785	0.1219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.03521	0	0	
Enth kW	-6431.5	-6556.9	-6528.3	-6527.7	-424.95	-0.01438	-423.3	-423.3	0	-0.20867	-0.00023	-6031.9	-0.01551	-399.56	-423.3	-28.553	-302.78	-6551.4	-7131.3	-204.38	
Tc C	762.1657	424.0712	410.1585	410.9963	941.2552	431.85	1415.527	1415.527	0	3126.85	4885.85	740.3146	3126.85	1065.682	1415.527	-31.5664	49.7889	410.9963	434.1317	241.4186	
Pc bar	1062.178	333.0568	312.4101	314.456	1198.76	90.5	2003.504	2003.504	0	354.982	537.0004	1035.243	354.982	1373.43	2003.504	67.8795	77.9622	314.456	348.16	62.3524	
Std. sp gr. wtr = 1	1.127	1.004	0.976	0.977	1.011	1.335	1.314	1.314	0	2.163	0.532	1.132	2.163	1.053	1.314	0.842	0.829	0.977	1.01	0.797	
Std. sp gr. air = 1	0.742	0.714	0.702	0.702	0.785	2.074	0.841	0.841	0	2.018	18.148	0.743	2.018	0.734	0.841	1.213	1.481	0.702	0.638	1.578	
Degree API	-5.937	9.4481	13.517	13.393	8.4627	-25.5075	-23.7883	-23.7883	0	-66.0816	134.2596	-6.528	-66.0816	2.9389	-23.7883	36.4718	39.1778	13.393	8.5559	46.0152	
Average mol wt	21.4929	20.6736	20.3369	20.3404	22.7419	60.056	24.3639	24.3639	0	58.443	525.6046	21.5084	58.443	21.2626	24.3639	35.1375	42.889	20.3404	18.4843	45.7131	
Actual dens kg/m3	1126.257	34.5961	21.582	21.5818	7.3947	1230.007	1321.075	1321.311	0	1940.164	58167.51	1130.813	1940.164	1057.204	1321.075	1.3978	1.8303	24.0919	978.3005	786.755	
Actual vol m3/h	1.4279	47.5759	76.2645	76.265	16.2526	0	0.0847	0.0847	0	0	0	1.3334	0	0.095	0.0847	14.1636	66.7691	68.3191	1.7082	0.154	
Std liq m3/h	1.4271	1.6395	1.6869	1.6854	0.1189	0	0.0852	0.0852	0	0	0	1.3317	0	0.0954	0.0852	0.0235	0.1474	1.6854	1.6541	0.152	
Std vap 0 C m3/h	1677.076	1784.476	1814.015	1813.708	118.4489	0.0028	102.9963	102.9963	0	0.0289	0	1571.256	0.0021	105.8205	102.9963	12.6284	63.8656	1813.708	2026.425	59.4121	
-- Vapor only --																					
Molar flow kmol/h		1.9094	3.0631	3.0631	0.6439											0.5634	2.8494	2.8494			
Mass flow kg/h		80.5602	128.078	128.0768	21.9271											19.7973	122.2083	122.2083			
Average mol wt		42.1906	41.8138	41.8123	34.0514											35.1375	42.889	42.889			
Actual dens kg/m3		1.7507	1.7143	1.7142	1.3569											1.3978	1.8303	1.8303			
Actual vol m3/h		46.0163	74.7115	74.7134	16.1591											14.1636	66.7691	66.7691			
Std liq m3/h		0.097	0.1541	0.1541	0.0259											0.0235	0.1474	0.1474			
Std vap 0 C m3/h		42.7973	68.6543	68.6561	14.4331											12.6284	63.8656	63.8656			
Cp kJ/kg-K		0.9122	0.9338	0.9338	1.0484											0.9654	0.8885	0.8885			
Z factor		0.9946	0.9944	0.9944	0.9969											0.9976	0.9944	0.9944			
Visc N-s/m2		1.53E-05	1.53E-05	1.53E-05	1.63E-05											1.63E-05	1.5E-05	1.5E-05			
Th cond W/m-K		0.018	0.0183	0.0183	0.0228											0.0214	0.0173	0.0173			
-- Liquid only --																					
Molar flow kmol/h	74.8239	77.7062	77.8704	77.8567	4.6407	0.0001	4.5952	4.5952		0.0013	0	70.1026	0.0001	4.7213	4.5952				78.0704	90.4103	2.6507
Mass flow kg/h	1608.182	1565.378	1517.86	1517.861	98.2565	0.0074	111.9583	111.9583		0.0754	0.0007	1507.796	0.0056	100.3863	111.9583				1523.73	1671.171	121.1722
Average mol wt	21.4929	20.1448	19.4921	19.4956	21.1726	60.056	24.3639	24.3639		58.443	525.6046	21.5084	58.443	21.2626	24.3639				19.5174	18.4843	45.7131
Actual dens kg/m3	1126.257	1003.7	977.325	978.2762	1051.247	1230.007	1321.075	1321.311		1940.164	58167.51	1130.813	1940.164	1057.204	1321.075				983.0482	978.3005	786.755
Actual vol m3/h	1.4279	1.5596	1.5531	1.5516	0.0935	0	0.0847	0.0847		0	0	1.3334	0	0.095	0.0847				1.55	1.7082	0.154
Std liq m3/h	1.4271	1.5425	1.5328	1.5313	0.093	0	0.0852	0.0852		0	0	1.3317	0	0.0954	0.0852				1.538	1.6541	0.152
Std vap 0 C m3/h	1677.076	1741.679	1745.36	1745.052	104.0158	0.0028	102.9963	102.9963		0.0289	0	1571.256	0.0021	105.8205	102.9963				1749.843	2026.425	59.4121
Cp kJ/kg-K	3.6985	3.908	3.9759	3.975	3.668	2.0065	3.2727	3.2735		0.8541	0.0372	3.7042	0.8541	3.637	3.2739				3.9643	4.1296	2.4455
Z factor	0.0031	0.0012	0.0012	0.0012	0.0022	0.0027	0.0112	0.0057		0.003	0.0029	0.0058	0.003	0.0021	0.0112				0.0012	0.0005	0.0028
Visc N-s/m2	0.001972	0.000721	0.000666	0.000666	0.00128	0.0004	0.00401	0.004014		0.6147	18980000	0.00197	0.6147	0.002071	0.00401				0.000853	0.000353	0.001075
Th cond W/m-K	0.5643	0.5441	0.5463	0.547	0.5713	0.2143	0.6458	0.6458		0.8378	66.9456	0.566	0.8378	0.5468	0.6457				0.5345	0.6537	0.1688
Surf. tens. N/m	0.0765	0.0689	0.0604	0.0605	0.0601	0.0833	0.0661	0.0661		0.1763	0.9358	0.0775	0.1763	0.0627	0.0661				0.0622	0.0607	0.0222

FLOW SUMMARIES																						
Stream No.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
Stream Name	Process Water										Res Solids		LCH		Waste Waters					Permeate		Mem Vent
Temp C	25	63.1793	25	25	0	25	80.4361	25	25	15	15.0297	84.4613	30.0301	80.4355	80.4354	25.0602	84.4306	25	84.4306	84.4306		
Pres bar	1.01	0.357	1.01	1.01	0	2	2	1.01	1.01	1.01	2	2	2	2	2	3.01	1.01	1.01	1.01	1.01		
Enth kW	-204.38	-557.74	-450.81	-450.81	0	-8059.3	-7751.7	-7733	-326.27	-6001.2	-6001.2	-7169.1	-582.69	-7751.8	-7751.8	-7732.9	-7176.4	-45.081	-7.2178	-7169.2		
Vapor mole frac.	0	1	0.060606	0.060606	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000931	0.060606	1	0		
Total kmol/h	2.6507	8.1651	5.5144	5.5144	0	99.4717	98.2278	97.4429	2.0288	69.7235	69.7235	90.8771	7.3522	98.2292	98.2292	97.4429	90.9618	0.5514	0.0847	90.8771		
Total kg/h	121.1722	234.94	113.7678	113.7678	0	1812.464	1812.465	1755.433	57.0312	1500.386	1500.386	1680.039	132.4498	1812.488	1812.488	1755.433	1682.548	11.3768	2.5089	1680.039		
Total std L m3/h	0.152	0.2706	0.1186	0.1186	0	1.7935	1.7955	1.7554	0.0381	1.3245	1.3245	1.6631	0.1325	1.7956	1.7956	1.7554	1.666	0.0119	0.0029	1.6631		
Total std V m3/h	59.41	183.01	123.6	123.6	0	2229.52	2201.64	2184.05	45.47	1562.76	1562.76	2036.89	164.79	2201.68	2201.68	2184.05	2038.78	12.36	1.9	2036.89		
Flowrates in kg/h																						
Water	0.6058	90.3846	89.7789	89.7789	0	1755.433	1755.433	1755.433	0	1225.192	1225.192	1623.01	132.4498	1755.46	1755.46	1755.433	1623.857	8.9779	0.8475	1623.01		
Alpha-D-Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	175.2844	175.2844	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
D-Xylose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	90.0909	90.0909	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Ethanol	120.5665	125.1182	4.5517	4.5517	0	0	0.6289	0	0	0	0	0.6258	0	0.6258	0.6258	0	0.6298	0.4552	0.004	0.6258		
Glycerol	0	0	0	0	0	0	17.0001	0	0	0	0	17.0001	0	17.0001	17.0001	0	17.0001	0	0	17.0001		
Acetic Acid	0	1.5808	1.5808	1.5808	0	0	20.4043	0	0	6.6344	6.6344	20.4048	0	20.4048	20.4048	0	20.4188	0.1581	0.014	20.4048		
5-HMF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3269	1.3269	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Furfural	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2654	0.2654	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Formic Acid	0	0.0142	0.0142	0.0142	0	0	0.2648	0	0	0.2654	0.2654	0.2648	0	0.2648	0.2648	0	0.2649	0.0014	0.0001	0.2648		
Levulinic Acid	0	0	0	0	0	0	1.3269	0	0	1.3269	1.3269	1.3269	0	1.3269	1.3269	0	1.3269	0	0	1.3269		
Carbon Dioxide	0	17.8421	17.8421	17.8421	0	0.141	0.141	0	0.141	0	0	0.141	0	0.141	0.141	0	1.7842	1.7842	1.6432	0.141		
Yeast	0	0	0	0	0	0	1.8101	0	0	0	0	1.8101	0	1.8101	1.8101	0	1.8101	0	0	1.8101		
USS	0	0	0	0	0	56.8902	2.0924	0	56.8902	0	0	2.0924	0	2.0924	2.0924	0	2.0924	0	0	2.0924		
UDS	0	0	0	0	0	0	13.3628	0	0	0	0	13.3628	0	13.3628	13.3628	0	13.3628	0	0	13.3628		
Urea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
YEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Lactrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Nitrogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Oxygen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

STREAM PROPERTIES																						
Stream No.	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
Name	Process Water									Res Solids		LCH		Waste Waters					Permeat		Mem Vent	
-- Overall --																						
Molar flow kmol/h	2.6507	8.1651	5.5144	5.5144	0	99.4717	98.2278	97.4429	2.0288	69.7235	69.7235	90.8771	7.3522	98.2292	98.2292	97.4429	90.9618	0.5514	0.0847	90.8771		
Mass flow kg/h	121.1722	234.94	113.7678	113.7678	0	1812.465	1812.465	1755.433	57.0312	1500.386	1500.386	1680.039	132.4498	1812.488	1812.488	1755.433	1682.548	11.3768	2.5089	1680.039		
Temp C	25	63.1793	25	25	0	25	80.4361	25	25	15	15.0297	84.4613	30.0301	80.4355	80.4354	25.0602	84.4306	25	84.4306	84.4306		
Pres bar	1.01	0.357	1.01	1.01	0	2	2	1.01	1.01	1.01	2	2	2	2	2	3.01	1.01	1.01	1.01	1.01		
Vapor mole fraction	0	1	0.06061	0.06061	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000931	0.06061	1	0		
Enth kW	-204.38	-557.74	-450.81	-450.81	0	-8059.3	-7751.7	-7733	-326.27	-6001.2	-6001.2	-7169.1	-582.69	-7751.8	-7751.8	-7732.9	-7176.4	-45.081	-7.2178	-7169.2		
Tc C	241.4186	283.7176	333.2115	333.2115	0	766.6191	429.4293	374.2	4883.402	741.8715	741.8715	433.7613	374.2	429.4288	429.4288	374.2	433.4957	333.2115	190.8086	433.7613		
Pc bar	62.3524	97.1391	173.8644	173.8644	0	934.6999	338.3981	221.1823	543.4706	1038.756	1038.756	347.3955	221.1823	338.397	338.397	221.1823	347.0321	173.8644	82.9299	347.3955		
Std. sp gr. wtr = 1	0.797	0.868	0.959	0.959	0	1.011	1.009	1	1.497	1.133	1.133	1.01	1	1.009	1.009	1	1.01	0.959	0.879	1.01		
Std. sp gr. air = 1	1.578	0.993	0.712	0.712	0	0.629	0.637	0.622	0.971	0.743	0.743	0.638	0.622	0.637	0.637	0.622	0.639	0.712	1.023	0.638		
Degree API	46.0152	31.4738	15.9859	15.9859	0	8.5218	8.6793	10	-36.9769	-6.5879	-6.5879	8.5751	10	8.6792	8.6792	10	8.6062	15.9859	29.4032	8.5751		
Average mol wt	45.7131	28.7736	20.631	20.631	0	18.2209	18.4516	18.015	28.1101	21.5191	21.5191	18.4869	18.015	18.4516	18.4516	18.015	18.4973	20.631	29.6189	18.4869		
Actual dens kg/m3	786.755	0.3693	13.7741	13.7741	0	1018.379	980.3698	996.7087	3078.53	1131.481	1131.4	978.4718	995.3324	980.3705	980.3707	996.6936	401.1021	13.7741	1.0125	978.4955		
Actual vol m3/h	0.154	636.2186	8.2596	8.2596	0	1.7798	1.8488	1.7612	0.0185	1.326	1.3261	1.717	0.1331	1.8488	1.8488	1.7613	4.1948	0.826	2.4779	1.717		
Std liq m3/h	0.152	0.2706	0.1186	0.1186	0	1.7935	1.7955	1.7554	0.0381	1.3245	1.3245	1.6631	0.1325	1.7956	1.7956	1.7554	1.666	0.0119	0.0029	1.6631		
Std vap 0 C m3/h	59.4121	183.0101	123.598	123.598	0	2229.524	2201.644	2184.05	45.4739	1562.759	1562.759	2036.886	164.7896	2201.676	2201.676	2184.05	2038.785	12.3598	1.8986	2036.886		
-- Vapor only --																						
Molar flow kmol/h		8.1651	0.3342	0.3342														0.0847	0.0334	0.0847		
Mass flow kg/h		234.94	14.4521	14.4521														2.5089	1.4452	2.5089		
Average mol wt		28.7736	43.2429	43.2429														29.6189	43.2429	29.6189		
Actual dens kg/m3		0.3693	1.7717	1.7717														1.0125	1.7717	1.0125		
Actual vol m3/h		636.2186	8.1573	8.1573														2.4779	0.8157	2.4779		
Std liq m3/h		0.2706	0.0174	0.0174														0.0029	0.0017	0.0029		
Std vap 0 C m3/h		183.0101	7.4908	7.4908														1.8986	0.7491	1.8986		
Cp kJ/kg-K		1.6224	0.8649	0.8649														1.2411	0.8649	1.2411		
Z factor		0.9949	0.9946	0.9946														0.9939	0.9946	0.9939		
Visc N-s/m2		1.09E-05	1.48E-05	1.48E-05														1.5E-05	1.48E-05	1.5E-05		
Th cond W/m-K		0.0202	0.0165	0.0165														0.0223	0.0165	0.0223		
-- Liquid only --																						
Molar flow kmol/h	2.6507		5.1802	5.1802		99.4717	98.2278	97.4429	2.0288	69.7235	69.7235	90.8771	7.3522	98.2292	98.2292	97.4429	90.8771	0.518		90.8771		
Mass flow kg/h	121.1722		99.3157	99.3157		1812.464	1812.465	1755.433	57.0312	1500.386	1500.386	1680.039	132.4498	1812.488	1812.488	1755.433	1680.039	9.9316		1680.039		
Average mol wt	45.7131		19.1722	19.1722		18.2209	18.4516	18.015	28.1101	21.5191	21.5191	18.4869	18.015	18.4516	18.4516	18.015	18.4869	19.1722		18.4869		
Actual dens kg/m3	786.755		971.3579	971.3579		1018.378	980.3698	996.7087	3078.53	1131.482	1131.4	978.4719	995.3325	980.3705	980.3706	996.6936	978.4956	971.3579		978.4956		
Actual vol m3/h	0.154		0.1022	0.1022		1.7798	1.8488	1.7612	0.0185	1.326	1.3261	1.717	0.1331	1.8488	1.8488	1.7613	1.717	0.0102		1.717		
Std liq m3/h	0.152		0.1011	0.1011		1.7935	1.7955	1.7554	0.0381	1.3245	1.3245	1.6631	0.1325	1.7956	1.7956	1.7554	1.6631	0.0101		1.6631		
Std vap 0 C m3/h	59.4121		116.1072	116.1072		2229.524	2201.644	2184.05	45.4739	1562.759	1562.759	2036.886	164.7896	2201.676	2201.676	2184.05	2036.886	11.6107		2036.886		
Cp kJ/kg-K	2.4455		4.0934	4.0934		4.076	4.1306	4.1851	0.718	3.7014	3.703	4.1296	4.1815	4.1289	4.1306	4.1833	4.1296	4.0934		4.1296		
Z factor	0.0028		0.001	0.001		0.0019	0.0019	0.001	0.0028	0.003	0.0059	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0019	0.0029	0.001		0.001		
Visc N-s/m2	0.001075		0.000887	0.000887		0.001465	0.000374	0.000923	6306000	0.001977	0.001976	0.000356	0.000828	0.000374	0.000374	0.000922	0.000356	0.000887		0.000356		
Th cond W/m-K	0.1688		0.5145	0.5145		0.6252	0.6512	0.6062	65.5273	0.5661	0.5662	0.6528	0.613	0.6512	0.6512	0.6063	0.6528	0.5145		0.6528		
Surf. tens. N/m	0.0222		0.058	0.058		0.0748	0.0615	0.0721	0.9012	0.0775	0.0775	0.0607	0.0712	0.0615	0.0615	0.0721	0.0608	0.058		0.0608		

FLOW SUMMARIES																				
Stream No.	61	62	63	64	65	67	68	71	72	73	75	78	80	83	91	102	103	104	105	106
Stream Name	F-Worth		AIR								WCIP			F-Beer		Steam	Distillate			
Temp C	15.0298	16.131	15	77.5913	60.2763	31.6145	33.0236	25.1299	25.1299	84.4613	30	30.0301	0	33	45.4975	174	63.1793	31.2276	77.5913	33
Pres bar	2	1.08	1.01	1.64	1.35	1.01	2	3.01	3.01	2	1.01	2	0	1.08	1.08	8.6	0.357	1.08	1.64	1.01
Enth kW	-6031.9	-6431.5	-0.04458	0.096703	-302.14	-423.3	-6248.6	-204.37	-204.37	-7169.1	-582.7	-582.69	0	-6248.7	-6528.3	-138.3	-557.74	-423.2	0.096703	-428.11
Vapor mole frac.	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.037847	1	1	0.060978	1	0.10661
Total kmol/h	70.1026	74.8239	0.2859	0.2859	2.8494	4.5952	78.0704	2.6507	2.6507	90.8771	7.3522	7.3522	0	78.0704	80.9335	2.0958	8.1651	4.8811	0.2859	5.2847
Total kg/h	1507.796	1608.182	8.2253	8.2253	122.2083	111.9583	1523.73	121.1722	121.1722	1680.039	132.4498	132.4498	0	1523.73	1645.938	37.7557	234.94	120.1836	8.2253	120.1836
Total std L m3/h	1.3317	1.4271	0.0096	0.0096	0.1474	0.0852	1.538	0.152	0.152	1.6631	0.1325	0.1325	0	1.538	1.6869	0.0378	0.2706	0.0948	0.0096	0.1189
Total std V m3/h	1571.26	1677.08	6.41	6.41	63.87	103	1749.84	59.41	59.41	2036.89	164.79	164.79	0	1749.84	1814.01	46.97	183.01	109.4	6.41	118.45
Flowrates in kg/h																				
Water	1231.772	1309.027	0	0	2.3094	77.7222	1344.473	0.6058	0.6058	1623.01	132.4498	132.4498	0	1344.473	1346.782	37.7557	90.3846	77.7221	0	77.7222
Alpha-D-Glucose	175.2844	175.2844	0	0	0	27.2014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27.2014	0	0
D-Xylose	90.0909	90.0909	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ethanol	0	9.899	0	0	2.8137	0	121.1966	120.5665	120.5665	0.6258	0	0	0	121.1966	124.0103	0	125.1182	0	0	10.569
Glycerol	0	1.6259	0	0	0	0	17.0001	0	0	17.0001	0	0	0	17.0001	17.0001	0	0	0	0	1.6259
Acetic Acid	6.6344	7.1498	0	0	0.0487	0	20.4188	0	0	20.4048	0	0	0	20.4188	20.4675	0	1.5808	0	0	0.5193
5-HMF	1.3269	1.3269	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3269	0	0	0	0	0
Furfural	0.2654	0.2654	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2654	0	0	0	0	0
Formic Acid	0.2654	0.2654	0	0	0.0005	0	0.2649	0	0	0.2648	0	0	0	0.2649	0.2654	0	0.0142	0	0	0
Levulinic Acid	1.3269	1.3269	0	0	0	0	1.3269	0	0	1.3269	0	0	0	1.3269	1.3269	0	0	0	0	0
Carbon Dioxide	0	0.0463	0.0086	0.0086	117.035	0	1.7843	0	0	0.141	0	0	0	1.7843	118.8193	0	17.8421	0.0086	0.0086	10.486
Yeast	0	1.7751	0	0	0	0.7438	1.8101	0	0	1.8101	0	0	0	1.8101	1.8101	0	0	0.7438	0	1.7751
USS	0	2.0924	0	0	0	2.0924	2.0924	0	0	2.0924	0	0	0	2.0924	2.0924	0	0	2.0924	0	2.0924
UDS	0	7.1762	0	0	0	4.1848	13.3628	0	0	13.3628	0	0	0	13.3628	10.9402	0	0	4.1848	0	7.1762
Urea	0.7542	0.7542	0	0	0	0.0074	0	0	0	0	0	0	0	0	0.7542	0	0	0.0074	0	0
YEN	0.0754	0.0754	0	0	0	0.0056	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0754	0	0	0.0056	0	0
Lactrol	0	0.0007	0	0	0	0.0007	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0007	0	0	0.0007	0	0.0007
Nitrogen	0	0.0006	6.4979	6.4979	0.0006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0006	0	0	6.4979	6.4979	6.4979
Oxygen	0	0.0003	1.7188	1.7188	0.0003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0003	0	0	1.7188	1.7188	1.7188

STREAM PROPERTIES																				
Stream No.	61	62	63	64	65	67	68	71	72	73	75	78	80	83	91	102	103	104	105	106
Name	F-Worth		AIR								WCIP			F-Beer		Steam	Distillate			
-- Overall --																				
Molar flow kmol/h	70.1026	74.8239	0.2859	0.2859	2.8494	4.5952	78.0704	2.6507	2.6507	90.8771	7.3522	7.3522	0	78.0704	80.9335	2.0958	8.1651	4.8811	0.2859	5.2847
Mass flow kg/h	1507.796	1608.182	8.2253	8.2253	122.2083	111.9583	1523.73	121.1722	121.1722	1680.039	132.4498	132.4498	0	1523.73	1645.938	37.7557	234.94	120.1836	8.2253	120.1836
Temp C	15.0298	16.131	15	77.5913	60.2763	31.6145	33.0236	25.1299	25.1299	84.4613	30	30.0301	0	33	45.4975	174	63.1793	31.2276	77.5913	33
Pres bar	2	1.08	1.01	1.64	1.35	1.01	2	3.01	3.01	2	1.01	2	0	1.08	1.08	8.6	0.357	1.08	1.64	1.01
Vapor mole fraction	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03785	1	1	0.06098	1	0.1066
Enth kW	-6031.9	-6431.5	-0.04458	0.096703	-302.14	-423.3	-6248.6	-204.37	-204.37	-7169.1	-582.7	-582.69	0	-6248.7	-6528.3	-138.3	-557.74	-423.2	0.096703	-428.11
Tc C	740.3146	762.1657	-142.253	-142.253	49.7889	1415.527	428.7188	241.4186	241.4186	433.7613	374.2	374.2	0	428.7188	410.1585	374.2	283.7176	1338.017	-142.253	941.2552
Pc bar	1035.243	1062.178	35.8442	35.8442	77.9622	2003.504	335.2318	62.3524	62.3524	347.3955	221.1823	221.1823	0	335.2318	312.4101	221.1823	97.1391	1894.215	35.8442	1198.76
Std. sp gr. wtr = 1	1.132	1.127	0.859	0.859	0.829	1.314	0.991	0.797	0.797	1.01	1	1	0	0.991	0.976	1	0.868	1.268	0.859	1.011
Std. sp gr. air = 1	0.743	0.742	0.993	0.993	1.481	0.841	0.674	1.578	1.578	0.638	0.622	0.622	0	0.674	0.702	0.622	0.993	0.85	0.993	0.785
Degree API	-6.528	-5.937	33.2326	33.2326	39.1778	-23.7883	11.325	46.0152	46.0152	8.5751	10	10	0	11.325	13.517	10	31.4738	-19.8858	33.2326	8.4627
Average mol wt	21.5084	21.4929	28.7738	28.7738	42.889	24.3639	19.5174	45.7131	45.7131	18.4869	18.015	18.015	0	19.5174	20.3369	18.015	28.7736	24.6222	28.7738	22.7419
Actual dens kg/m3	1130.813	1126.257	1.2135	1.6179	2.1	1321.311	983.0347	786.6393	786.6393	978.4718	995.3414	995.3324	0	983.0481	21.582	4.362	0.3693	17.0343	1.6179	8.4289
Actual vol m3/h	1.3334	1.4279	6.7783	5.084	58.1936	0.0847	1.55	0.154	0.154	1.717	0.1331	0.1331	0	1.55	76.2645	8.6555	636.2186	7.0554	5.084	14.2586
Std liq m3/h	1.3317	1.4271	0.0096	0.0096	0.1474	0.0852	1.538	0.152	0.152	1.6631	0.1325	0.1325	0	1.538	1.6869	0.0378	0.2706	0.0948	0.0096	0.1189
Std vap 0 C m3/h	1571.256	1677.076	6.4072	6.4072	63.8656	102.9963	1749.843	59.4121	59.4121	2036.886	164.7896	164.7896	0	1749.843	1814.015	46.9743	183.0101	109.4034	6.4072	118.4489
-- Vapor only --																				
Molar flow kmol/h			0.2859	0.2859	2.8494										3.0631	2.0958	8.1651	0.2976	0.2859	0.5634
Mass flow kg/h			8.2253	8.2253	122.2083										128.078	37.7557	234.94	8.4368	8.2253	19.7973
Average mol wt			28.7738	28.7738	42.889										41.8138	18.015	28.7736	28.3459	28.7738	35.1375
Actual dens kg/m3			1.2135	1.6179	2.1										1.7143	4.362	0.3693	1.2103	1.6179	1.3978
Actual vol m3/h			6.7783	5.084	58.1936										74.7115	8.6555	636.2186	6.9709	5.084	14.1636
Std liq m3/h			0.0096	0.0096	0.1474										0.1541	0.0378	0.2706	0.0098	0.0096	0.0235
Std vap 0 C m3/h			6.4072	6.4072	63.8656										68.6543	46.9743	183.0101	6.6712	6.4072	12.6284
Cp kJ/kg-K			1.0135	1.0173	0.9195										0.9338	1.9254	1.6224	1.0357	1.0173	0.9654
Z factor			0.9998	1.0003	0.9947										0.9944	0.9555	0.9949	0.9996	1.0003	0.9976
Visc N-s/m2			1.78E-05	2.07E-05	1.63E-05										1.53E-05	1.53E-05	1.09E-05	1.82E-05	2.07E-05	1.63E-05
Th cond W/m-K			0.0247	0.0293	0.0194										0.0183	0.0322	0.0202	0.0258	0.0293	0.0214
-- Liquid only --																				
Molar flow kmol/h	70.1026	74.8239				4.5952	78.0704	2.6507	2.6507	90.8771	7.3522	7.3522		78.0704	77.8704				4.5835	4.7213
Mass flow kg/h	1507.796	1608.182				111.9583	1523.73	121.1722	121.1722	1680.039	132.4498	132.4498		1523.73	1517.86				111.7468	100.3863
Average mol wt	21.5084	21.4929				24.3639	19.5174	45.7131	45.7131	18.4869	18.015	18.015		19.5174	19.4921				24.3804	21.2626
Actual dens kg/m3	1130.813	1126.257				1321.311	983.0348	786.6393	786.6393	978.4719	995.3414	995.3325		983.0482	977.325				1322.227	1057.204
Actual vol m3/h	1.3334	1.4279				0.0847	1.55	0.154	0.154	1.717	0.1331	0.1331		1.55	1.5531				0.0845	0.095
Std liq m3/h	1.3317	1.4271				0.0852	1.538	0.152	0.152	1.6631	0.1325	0.1325		1.538	1.5328				0.085	0.0954
Std vap 0 C m3/h	1571.256	1677.076				102.9963	1749.843	59.4121	59.4121	2036.886	164.7896	164.7896		1749.843	1745.36				102.7323	105.8205
Cp kJ/kg-K	3.7027	3.6985				3.2735	3.9643	2.4462	2.4462	4.1296	4.1815	4.1815		3.9643	3.9759				3.2718	3.637
Z factor	0.0058	0.0031				0.0057	0.0023	0.0084	0.0084	0.0019	0.001	0.0019		0.0012	0.0012				0.0061	0.0021
Visc N-s/m2	0.00197	0.001972				0.004014	0.000853	0.001075	0.001075	0.000356	0.000829	0.000828		0.000853	0.000666				0.004091	0.002071
Th cond W/m-K	0.566	0.5643				0.6458	0.5345	0.1688	0.1688	0.6528	0.613	0.613		0.5345	0.5463				0.6454	0.5468
Surf. tens. N/m	0.0775	0.0765				0.0661	0.0622	0.0222	0.0222	0.0607	0.0712	0.0712		0.0622	0.0604				0.0662	0.0627

FLOW SUMMARIES												
Stream No.	107	108	109	110	111	112	113	114	117	120	121	125
Stream Name		Vapor Effect			Cool Water		Cool Water					Water
Temp C	80.4361	20	85.5	20.0002	20	22	20	22	25.1299	32.3454	25	15
Pres bar	2	2	0.574	1.9562	5	5	5	5	3.01	1.01	1.01	1.01
Enth kW	-7751.7	-22937	-1034.6	-22937	-44942	-44918	-5989.4	-5986.2	-204.37	-6654.4	-405.73	-29.063
Vapor mole frac.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.004713	0.060606	0
Total kmol/h	98.2278	288.648	15.541	288.648	565.5603	565.5603	75.3714	75.3714	2.6507	83.0344	4.963	0.3653
Total kg/h	1812.465	5199.993	279.9715	5199.993	10188.57	10188.57	1357.815	1357.815	121.1722	1626.139	102.391	6.58
Total std L m3/h	1.7955	5.2	0.28	5.2	10.1886	10.1886	1.3578	1.3578	0.152	1.6447	0.1067	0.0066
Total std V m3/h	2201.64	6469.65	348.33	6469.65	12676.27	12676.27	1689.35	1689.35	59.41	1861.1	111.24	8.19
Flowrates in kg/h												
Water	1755.433	5199.993	279.9715	5199.993	10188.57	10188.57	1357.815	1357.815	0.6058	1425.292	80.801	6.58
Alpha-D-Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Xylose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ethanol	0.6289	0	0	0	0	0	0	0	120.5665	125.2929	4.0966	0
Glycerol	17.0001	0	0	0	0	0	0	0	0	17.0001	0	0
Acetic Acid	20.4043	0	0	0	0	0	0	0	0	21.8415	1.4227	0
5-HMF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Furfural	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formic Acid	0.2648	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2777	0.0128	0
Levulinic Acid	1.3269	0	0	0	0	0	0	0	0	1.3269	0	0
Carbon Dioxide	0.141	0	0	0	0	0	0	0	0	17.8421	16.0579	0
Yeast	1.8101	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8101	0	0
USS	2.0924	0	0	0	0	0	0	0	0	2.0924	0	0
UDS	13.3628	0	0	0	0	0	0	0	0	13.3628	0	0
Urea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
YEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nitrogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oxygen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

STREAM PROPERTIES												
Stream No.	107	108	109	110	111	112	113	114	117	120	121	125
Name	Vapor Effect			Cool Water			Cool Water					Water
-- Overall --												
Molar flow kmol/h	98.2278	288.648	15.541	288.648	565.5603	565.5603	75.3714	75.3714	2.6507	83.0344	4.963	0.3653
Mass flow kg/h	1812.465	5199.993	279.9715	5199.993	10188.57	10188.57	1357.815	1357.815	121.1722	1626.139	102.391	6.58
Temp C	80.4361	20	85.5	20.0002	20	22	20	22	25.1299	32.3454	25	15
Pres bar	2	2	0.574	1.9562	5	5	5	5	3.01	1.01	1.01	1.01
Vapor mole fraction	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.004712	0.06061	0
Enth kW	-7751.7	-22937	-1034.6	-22937	-44942	-44918	-5989.4	-5986.2	-204.37	-6654.4	-405.73	-29.063
Tc C	429.4293	374.2	374.2	374.2	374.2	374.2	374.2	374.2	241.4186	423.105	333.2115	374.2
Pc bar	338.3981	221.1823	221.1823	221.1823	221.1823	221.1823	221.1823	221.1823	62.3524	325.8472	173.8642	221.1823
Std. sp gr. wtr = 1	1.009	1	1	1	1	1	1	1	0.797	0.989	0.959	1
Std. sp gr. air = 1	0.637	0.622	0.622	0.622	0.622	0.622	0.622	0.622	1.578	0.676	0.712	0.622
Degree API	8.6793	10	10	10	10	10	10	10	46.0152	11.6184	15.9859	10
Average mol wt	18.4516	18.015	18.015	18.015	18.015	18.015	18.015	18.015	45.7131	19.5839	20.631	18.015
Actual dens kg/m3	980.3698	997.8444	0.3487	997.8443	997.8444	997.4188	997.8443	997.4188	786.6393	142.3515	13.7741	998.7349
Actual vol m3/h	1.8488	5.2112	802.9464	5.2112	10.2106	10.2149	1.3607	1.3613	0.154	11.4234	7.4336	0.0066
Std liq m3/h	1.7955	5.2	0.28	5.2	10.1886	10.1886	1.3578	1.3578	0.152	1.6447	0.1067	0.0066
Std vap 0 C m3/h	2201.644	6469.654	348.331	6469.654	12676.27	12676.27	1689.347	1689.347	59.4121	1861.104	111.2382	8.1866
-- Vapor only --												
Molar flow kmol/h			15.541							0.3913	0.3008	
Mass flow kg/h			279.9715							16.7682	13.0069	
Average mol wt			18.015							42.853	43.2429	
Actual dens kg/m3			0.3487							1.7134	1.7717	
Actual vol m3/h			802.9464							9.7867	7.3416	
Std liq m3/h			0.28							0.0202	0.0157	
Std vap 0 C m3/h			348.331							8.7704	6.7417	
Cp kj/kg-K			1.883							0.8886	0.8649	
Z factor			0.9947							0.9947	0.9946	
Visc N-s/m2			1.16E-05							1.5E-05	1.48E-05	
Th cond W/m-K			0.0236							0.0171	0.0165	
-- Liquid only --												
Molar flow kmol/h	98.2278	288.648		288.648	565.5603	565.5603	75.3714	75.3714	2.6507	82.6431	4.6622	0.3653
Mass flow kg/h	1812.465	5199.993		5199.993	10188.57	10188.57	1357.815	1357.815	121.1722	1609.371	89.3841	6.58
Average mol wt	18.4516	18.015		18.015	18.015	18.015	18.015	18.015	45.7131	19.4737	19.1722	18.015
Actual dens kg/m3	980.3698	997.8444		997.8443	997.8444	997.4188	997.8444	997.4188	786.6393	983.3159	971.3579	998.7349
Actual vol m3/h	1.8488	5.2112		5.2112	10.2106	10.2149	1.3607	1.3613	0.154	1.6367	0.092	0.0066
Std liq m3/h	1.7955	5.2		5.2	10.1886	10.1886	1.3578	1.3578	0.152	1.6245	0.091	0.0066
Std vap 0 C m3/h	2201.644	6469.654		6469.654	12676.27	12676.27	1689.347	1689.347	59.4121	1852.334	104.4965	8.1866
Cp kj/kg-K	4.1306	4.1906		4.1906	4.1906	4.1888	4.1906	4.1888	2.4462	3.9695	4.0934	4.196
Z factor	0.0019	0.0019		0.0019	0.0049	0.0048	0.0049	0.0048	0.0084	0.0012	0.001	0.001
Visc N-s/m2	0.000374	0.001033		0.001033	0.001034	0.000988	0.001034	0.000988	0.001075	0.000861	0.000887	0.001163
Th cond W/m-K	0.6512	0.599		0.599	0.599	0.6019	0.599	0.6019	0.1688	0.5356	0.5145	0.5915
Surf. tens. N/m	0.0615	0.073		0.073	0.073	0.0726	0.073	0.0726	0.0222	0.0625	0.058	0.0738

12. Annexe E : Schéma des cédules Cuvée pour les 6 configurations à l'étude

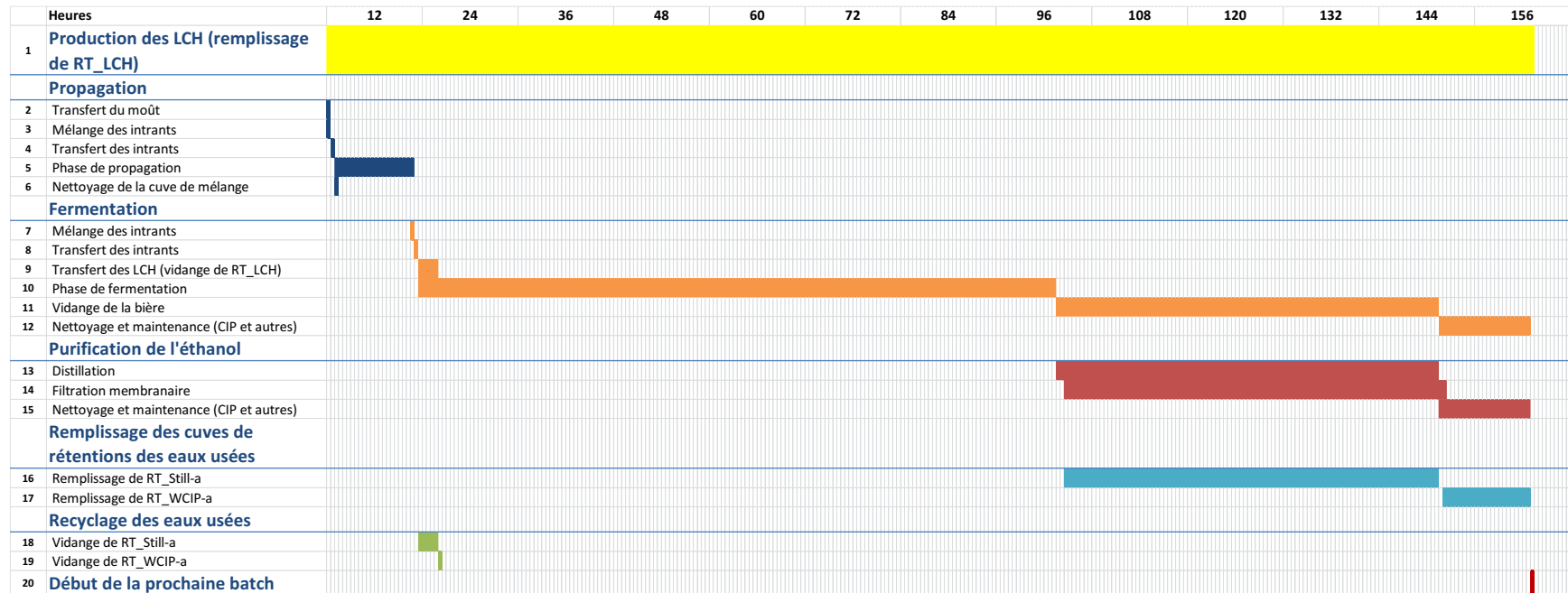


Figure 12.1: Cédula cuvée pour la configuration #1.

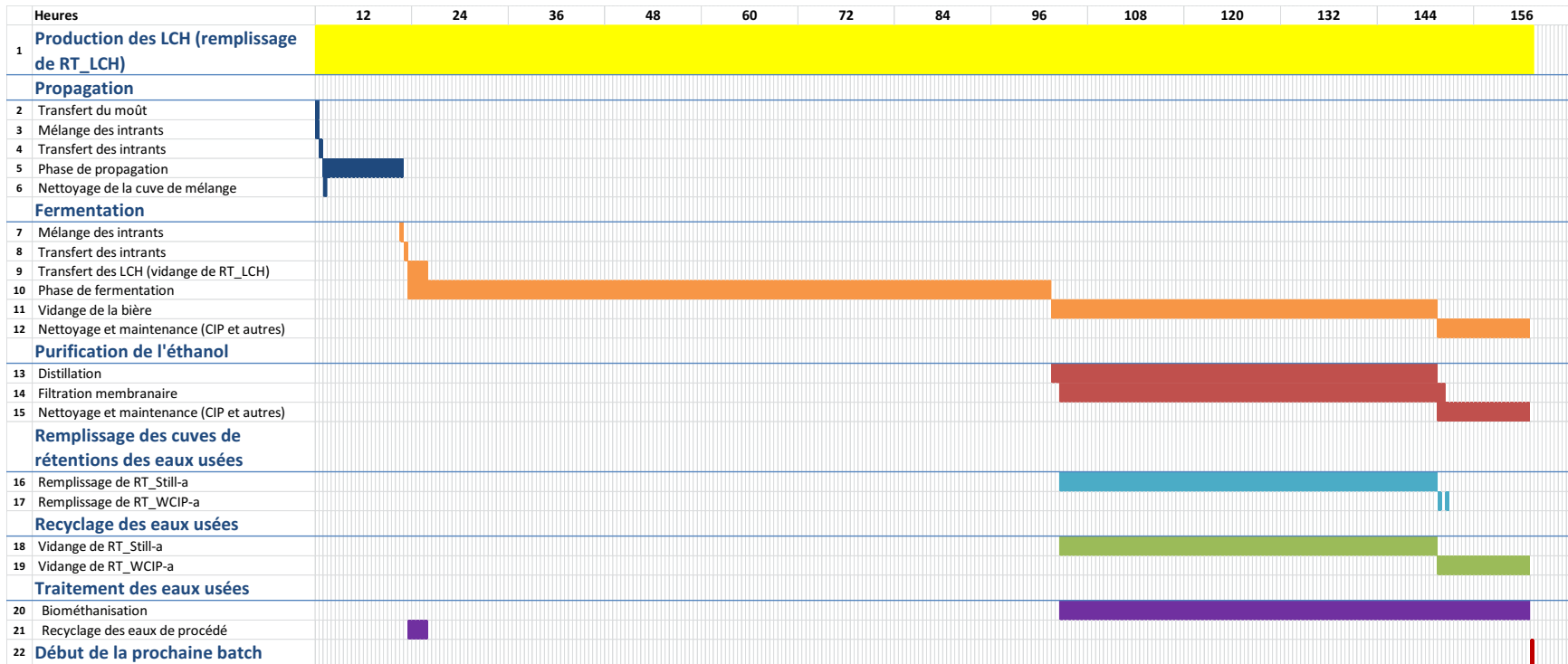


Figure 12.2: Cédule cuvée pour la configuration #2.

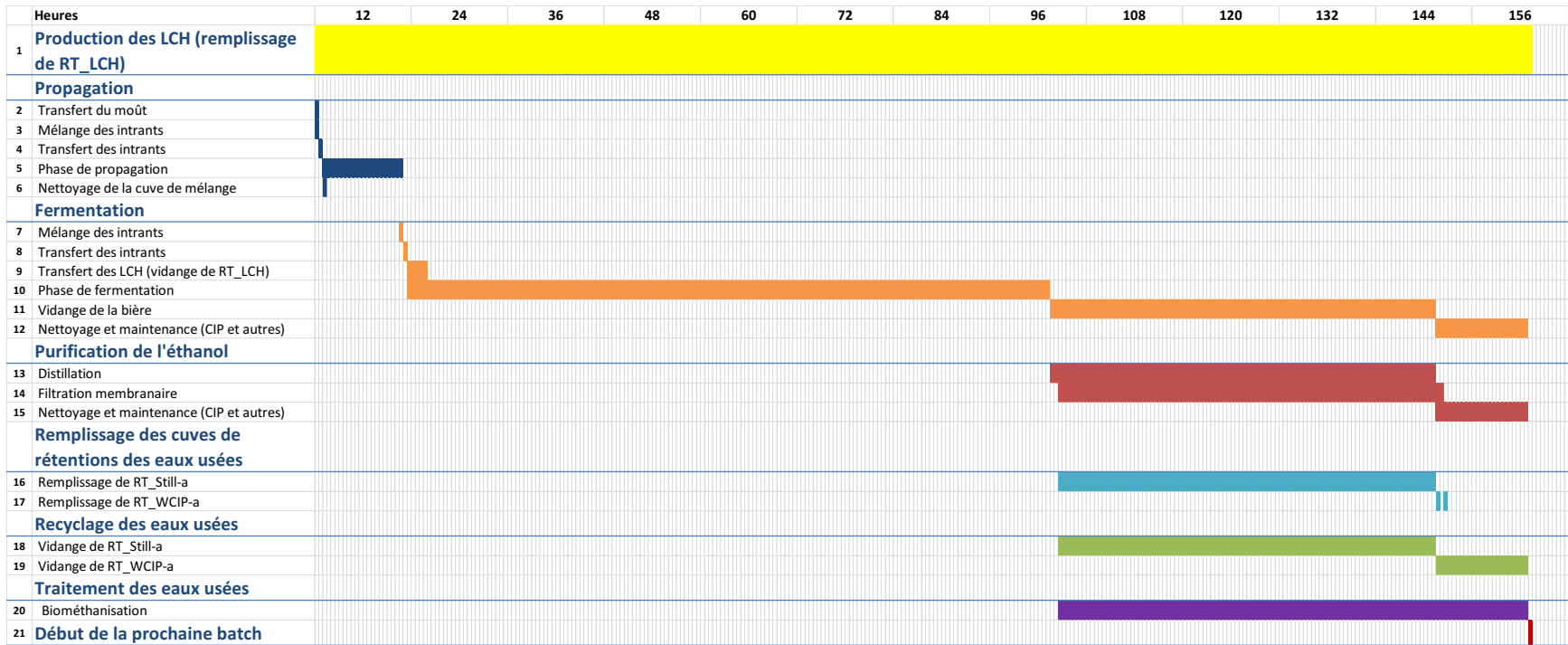


Figure 12.3: Cédule cuvée pour la configuration #3.

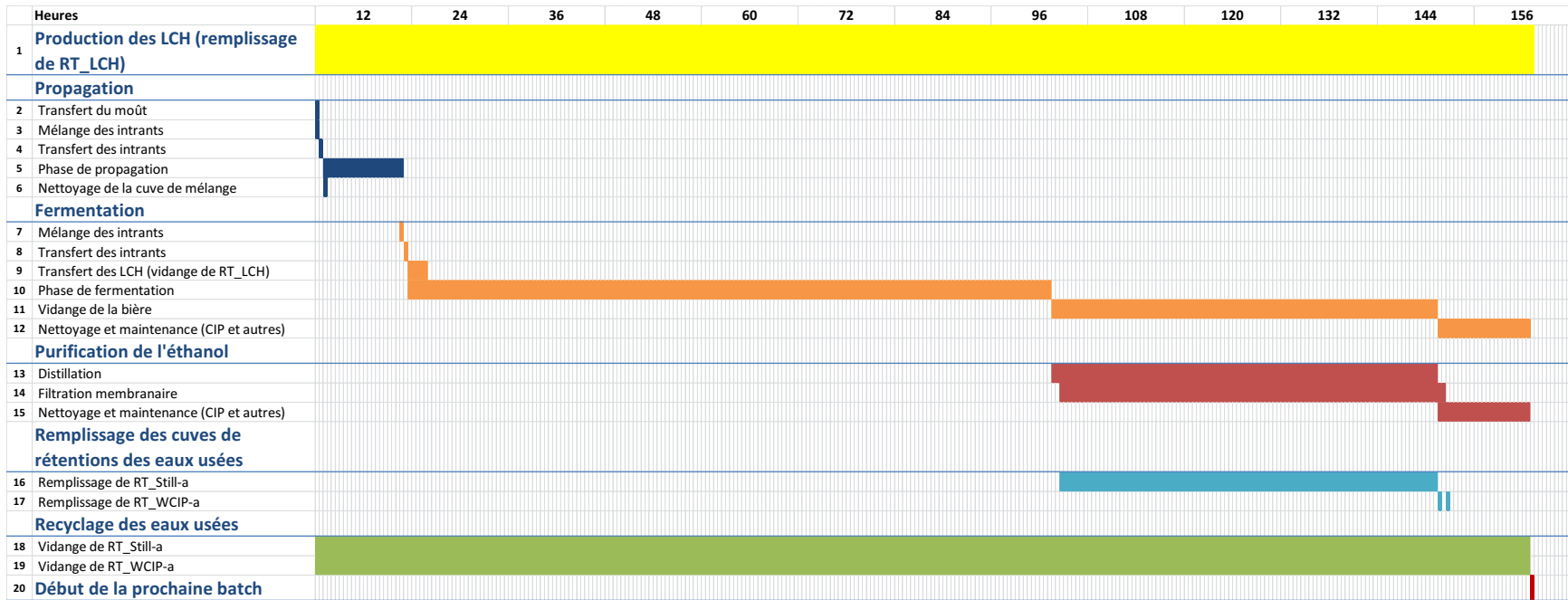


Figure 12.4: Cédule cuvée pour la configuration #7.

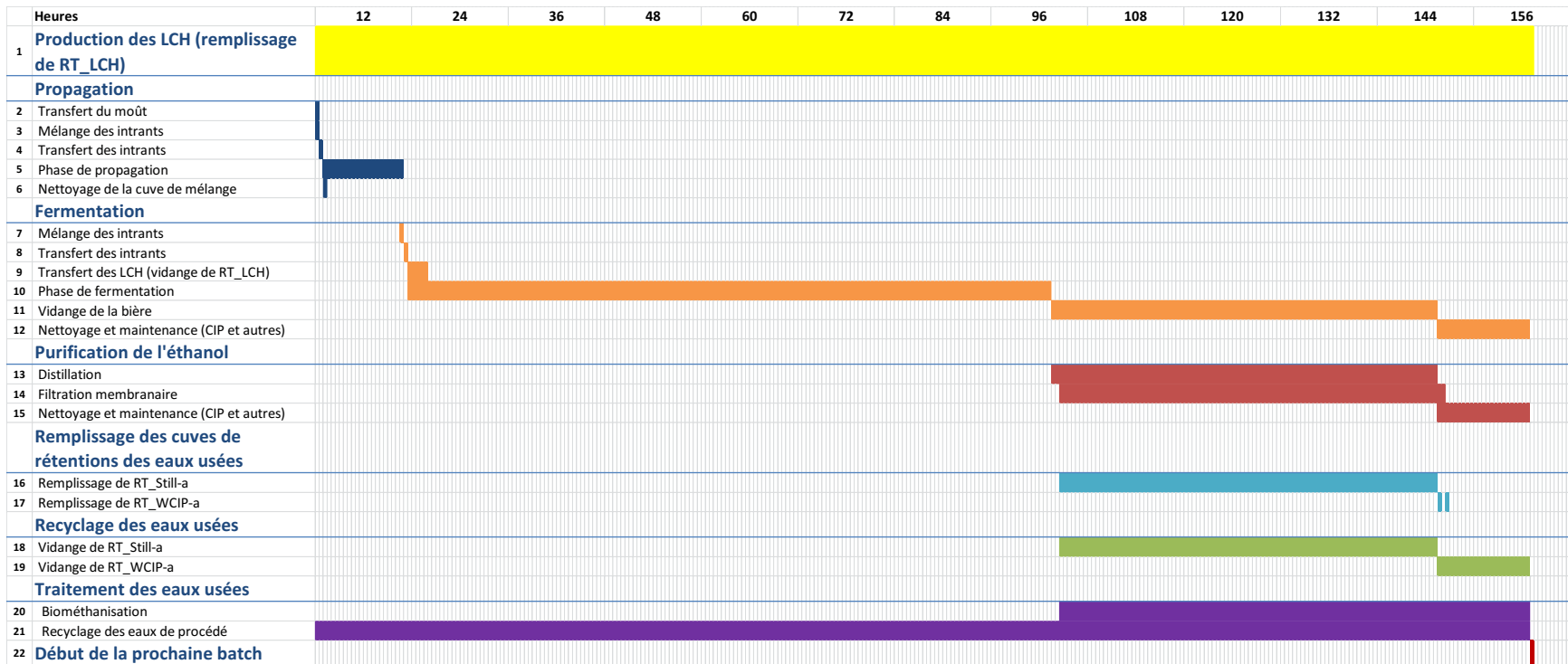


Figure 12.5: Cédule cuvée pour la configuration #8.

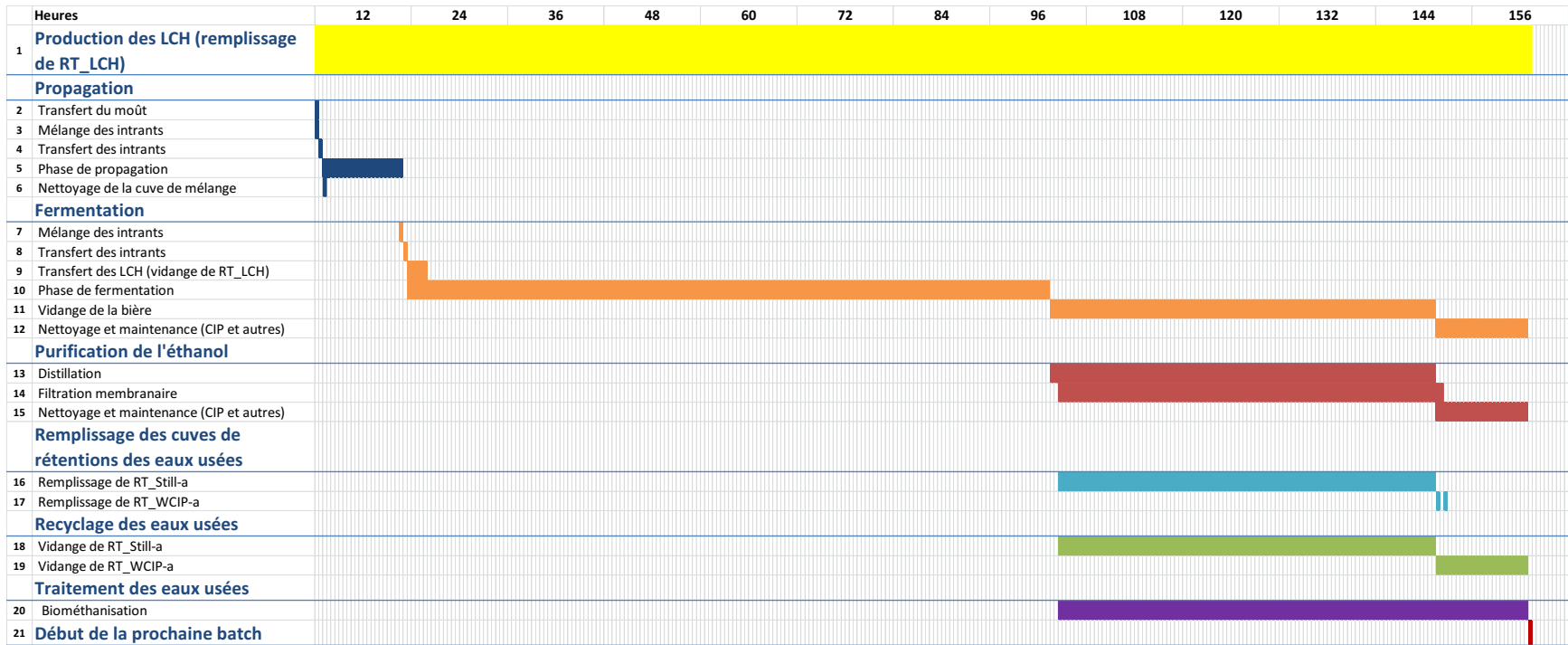


Figure 12.6: Cédule cuvée pour la configuration #9.

13. Annexe F : Consommation électrique du procédé LCH

Tableau 13.1: Détails de la consommation électrique des équipements du procédé LCH utilisée dans l'analyse économique.

Equipment	Applicable to Configurations	Name of unit	Power (kW)	Time of use (h)	Total electricity consumption (kWh/batch)	Comment
Fermenter's main pump	ALL	Pump_01	5.31	80	424.88	
Blending tank pump	ALL	Pump_02	0.15	2	0.29	
Stillage pump	1, 7	Pump_03	0.17	48	8.07	
	2, 3, 8, 9	Pump_03	0.09	48	4.10	
Waste Waters discharge pump	1	Pump_04	0.69	3	1.72	
	2, 3, 8, 9	Pump_04	0.08	48	4.06	
	7	Pump_04	0.10	151	14.51	
Ethanol 200 charge pump	ALL	Pump_05	0.01	48	0.39	
LCH delivery pump	7, 8, 9	Pump_06	3.51	3	8.78	
Ethanol 200 discharge pump	ALL	Pump_07	0.80	1	0.80	
Process Water discharge pump	2	Pump_08	1.60	4	5.59	Because 7 tankers of 40 m ³ are required to recycle the 275 m ³ of process waters.
	8	Pump_08	0.02	151	2.31	
Propagation aeration blower	ALL	Blow_01	18.50	10	185.00	
Scrubber blower	ALL	Blow_02	6.70	80	536.00	
Fermenter's agitator	ALL	NA	2.80	90	252.00	
Nb of batches per yr		55				
Total electricity consumption (kWh/yr)						
Config# 1	77503					
Config# 2	77721					
Config# 3	77188					
Config# 7	78690					
Config# 8	78024					
Config# 9	77897					

14. Annexe G : Détail des coûts opérationnels et des revenus du procédé LCH

Tableau 14.1 : Bases de calcul et hypothèses quant aux différents coûts opérationnels du procédé LCH.

Level	Total Product Costs includes (TPC)	Value	Unit	Comment	Reference
1.3.4.7	Raw Material				
	MLC purchase	100.00	\$/ton	Including transport to CRB plant.	[Berberi, 2013]
	MLC transport	286km=1100\$; 181km = 850\$; 25km=350\$		In order to calculate transport costs for distances not given here, interpolation or extrapolation is used, using these values.	[Ouimet, 2013]
	Nb of Bales per shipment	48	Bales/Load		
	Total Product Cost (TPC) of CBR's LCH production process	0.2	\$/kg-sugars	It is estimated the the LCH can be delivered with a maximum sugars concentration of 200 g/L.	[Berberi, 2013]
	CRB's Profit Margin	5%	% du TPC		
	Purchase cost of LCH	0.21	\$/kg-sugars	Is equal to TPC of CRB's process + Profit Margin	Hypothesis
	LCH transport	286km=833\$; 181km=596\$; 25km=320\$		In order to calculate transport costs for distances not given here, interpolation or extrapolation is used, using these values.	[Lemieux, 2013]
	Maximum Tanker's load volume	40.00	m ³		
	Yeasts (LOGM1)	34.25	\$/kg-ship	Yeasts are delivered in dry form. A 100 % dryness is assumed in this study.	[Boulet, 2013; D'Aoust, 2013]
	Urea	0.57	\$/kg	Target concentrations: 1 g/L for propagation & 0.5 g/L for fermentation.	[Berberi, 2013]
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	16.00	\$/kg	Concentration 50ppm (5*10 ⁻⁵ kg/L)	[D'Aoust, 2013]

	Lactrol	214.30	\$/kg	Target concentration of 0.46 mg/L in the fermenter, but completely added during the propagation.	[Boulet, 2013]
	Corn Mash	0.00	\$/m ³	For the sake of this study, it is assumed that the economical gain by the use of corn mash instead of another substrate, is equal to the economical loss incurred by the CORN process from which it is taken.	Hypothesis
1.3.4.6	Operating Labor				
	Cost of operating Labor	40.00	\$/h	Included all benefits.	[Boulet, 2013]
year	Nb of working hours per	8736.00	h/yr		
	Nb of operator assigned to the LCH process	0	Operator	It is estimated that the work load brought about by the LCH process can be assumed by present workers of the CORN process without added costs.	Hypothesis
1.3.4.5	Operating supervision	NA		Estimated that current supervision is enough, thus set to zero.	
1.3.4.4	Utilities				
	Electricity	0.0535	\$/kWh	The total electricity consumption is calculated as follow for each studied configuration: 1) the weighted average of all the intalled equipments is calculation (using the batch schedule to determine their specific operation time) 2) this weighted average is multiplied by the total annual operating time. See Annexe F : Consommation électrique du procédé LCH for details.	[Boulet, 2013]

	Steam	0.02	\$/kg-gen steam	Estimation based on: the generation of 174C/8.6bar live steam using a natural gas boiler (efficiency 85%) and a nat. gas price of 6 \$/GJ. Using this, a ChemCAD simulation shows that to generate 1 kg of steam, 0.75972 kWh, or 0.002735 GJ are required.	Hypothesis
	Vapor Effect	0.00	\$/kg	The Vapor Effect is a residual water vapor from the CORN process, at 85.5C/0.574bar. It is used in the LCH process' distillation. No costs associated.	
	<u>Waste Treatment and Disposal (Stillage)</u>				
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	0.00	\$/m ³	In the case where the WW are revalorised to Biogas by sending them to the Biomethanisation Varennes plant, it is estimated that the costs associated with the WW treatment are totally compensated by the revenues generated by the Biogas production.	Hypothesis
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	50%	of LCH transport costs	In the case where the WW are recycled to CRB's plant by tanker transport, it is estimated that the cost is 50% of the LCH transport cost. This is due to the fact that the logistic of transport of the LCH and WW are matched in order that each tankers arrives filled with LCH and leave filled with WW to close the water recycling loop.	
	Water, Process (new)	0.35	\$/m ³	Usage of new town water.	[Boulet, 2013]
	Water, Cooling	0.35	\$/m ³	Replacement of the water evapotrated in the cooling towers to satisfy the LCH cooling load.	[Boulet, 2013]
1.3.4.3	Maintenance & Repairs	5%	of f.o.b.	Suggested between 2-20% of f.o.b. or 2-10% of FCI	[Peters et al., 2003]
1.3.4.2	Operating supplies				

	Acid/Base (pH control) NaOH 50% (CIP)	NA 350.00			Mitigated Usage for CIP.	Hypothesis [Boulet, 2013]
1.3.4.1	Laboratory charges	NA			Mitigated	Hypothesis
1.3.4	Variable Production costs					
1.3.3.3	Taxes (property)	NA			Mitigated	
1.3.3.3	Financing (interests)	NA			None estimated	Hypothesis
1.3.3.2	Insurances	NA			None estimated	
1.3.3.1	Rent	NA			None estimated	
1.3.3	Fixed Charges					
1.3.2	Depreciation (CCA)	30%	per year		To calculate the depreciation table and fiscal effect, all FCI is counted and is set to be part of Category 43, for which 30% depreciation & Half first year rule applies.	[Chan et al., 2009] p.481, 578
1.3.1	Plant Overhead	NA			Estimated to zero, since infrastructure already is in place at ETG plant.	[Peters et al., 2003] p.260
1.3	Manufacturing costs					
1.2.3	Administrative expenses	NA			Estimated to zero, since infrastructure already is in place at ETG plant.	
1.2.2	Distribution & Marketing expenses	NA			Estimated to zero, since infrastructure already is in place at ETG plant.	[Peters et al., 2003] p.260
1.2.1	R&D	NA			Estimated to zero, since infrastructure already is in place at ETG plant.	
1.2	General Expenses					
1.1	Contingency	2.70	weeks of operation / yr		Usually estimated as a factor reducing the number of operating days in the years (thus reducing production by a certain factor). Here, the total operating hours per year is	Hypothesis

set to 8305 h, thus a 2.7 weeks period is set as contingency.

1 Total Product Costs (TPC)

Tableau 14.2: Détails des revenus générés par le procédé LCH.

Level	Revenues includes	Value	Unit	Production	Unit	Revenues (\$/yr)	Reference
1.2	Ethanol	0.70	\$/L	1299	m ³ /yr	\$909,088	[Boulet, 2013]
1.1	CO ₂	16.00	\$/ton	972	tons/yr	\$15,552	[Boulet, 2013]
1	Revenues					\$924,640	

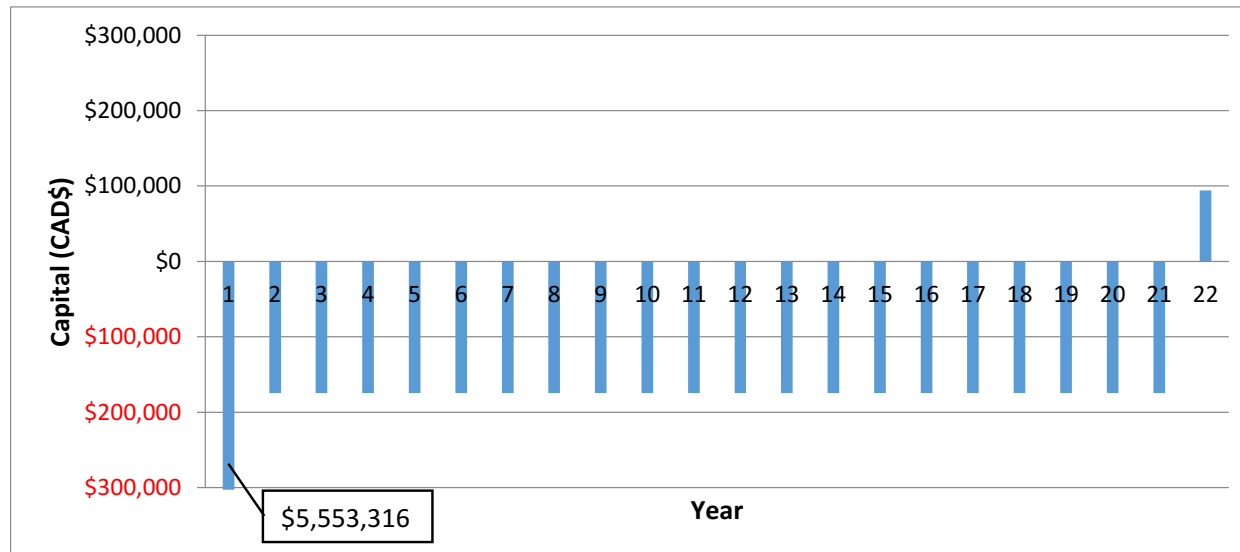
15. Annexe H : Détails des analyses économiques pour les 6 configurations du procédé LCH

15.1. Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #1

Level	Total Capital Investment (TCI)	Chosen SP (% of f.o.b.)	Actual (\$CAD)
1.2.2	Direct Costs		
	Equipment (f.o.b.)	100.0%	\$1,491,052
	Sapres	3.3%	\$49,205
	Shipping	5.0%	\$74,553
	Installation	34.0%	\$506,958
	Piping	57.0%	\$849,900
	Electrical	20.0%	\$298,210
	Instrumentation & Control system	16.0%	\$238,568
	Service facilities	6.0%	\$89,463
	Site Preparation & Yard Improvements	3.0%	\$44,732
1.2.1	Indirect Costs		
	Engineering & Supervision	34.0%	\$506,958
	Construction expenses	35.0%	\$521,868
	Legal expenses	3.0%	\$44,732
	Contractor's fee	13.0%	\$193,837
	Health, Safety and Environnement functions	2.0%	\$29,821
	Contingency	35.0%	\$521,868
1.2	Fixed Capital Investment (FCI)		\$5,461,723
1.1	Working Capital Investment (WCI)	1/12*TCP	\$91,593
1	Total Capital Investment (TCI)		\$5,553,316

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	Comment
1.3.4.7	Raw Material		
	Purchase cost of LCH	\$462,828	
	LCH transport	\$209,290	
	Yeasts (LOGM1)	\$211,560	
	Urea	\$3,570	
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	\$10,017	
	Lactrol	\$1,316	
	Corn Mash	\$0	
1.3.4.6	Operating Labor	\$0	
1.3.4.5	Operating supervision	\$0	
1.3.4.4	Utilities		
	Electricity	\$4,147	
	Steam	\$5,146	
	Vapor Effect	\$0	
	<u>Waste Treatment and Disposal</u> <u>(Stillage)</u>		
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	\$0	
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	\$104,645	
	Water, Process (new)	\$373	
	Water, Cooling	\$125	
1.3.4.3	Maintenance & Repairs	\$74,553	
1.3.4.2	Operating supplies		
	Acid/Base (pH control)	\$0	
	NaOH 50% (CIP)	\$11,550	
1.3.4.1	Laboratory charges	\$0	
1.3.4	Variable Production costs	\$1,099,119	
1.3.3	Fixed Charges	\$0	*Depreciation excluded
1.3.2	Depreciation (CCA)	ND	*Calculated separately below using 30% and half year rule
1.3.1	Plant Overhead	\$0	
1.3	Manufacturing costs	\$1,099,119	
1.2	General Expenses	\$0	
1.1	Contingency	ND	*Calculated as a reduction in yearly OP hours of 5.2% (or 2.7 weeks); reducing yearly production capacity of the same amount. Thus annual OP hours are set to 8305h/yr for this case study.
1	Total Product Costs (TPC)	\$1,099,119	

Year	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Income Statement																						
Revenues		\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640
Expenses																						
Variable Production costs		\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119	\$1,099,119
Fixed Charges		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Depreciation (CCA)		\$819,258	\$1,392,739	\$974,918	\$682,442	\$477,710	\$334,397	\$234,078	\$163,854	\$114,698	\$80,289	\$56,202	\$39,341	\$27,539	\$19,277	\$13,494	\$9,446	\$6,612	\$4,628	\$3,240	\$2,268	\$0
Plant Overhead		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
General Expenses		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Gross profit		\$993,738	\$1,567,219	\$1,149,397	\$856,922	\$652,189	\$508,876	\$408,557	\$338,334	\$289,178	\$254,768	\$230,682	\$213,821	\$202,018	\$193,757	\$187,974	\$183,925	\$181,092	\$179,108	\$177,719	\$176,747	\$0
Income Tax (29%)		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Net profit		\$993,738	\$1,567,219	\$1,149,397	\$856,922	\$652,189	\$508,876	\$408,557	\$338,334	\$289,178	\$254,768	\$230,682	\$213,821	\$202,018	\$193,757	\$187,974	\$183,925	\$181,092	\$179,108	\$177,719	\$176,747	\$0
Cash Flow Statement																						
Exploitation Activities																						
Net profit		\$993,738	\$1,567,219	\$1,149,397	\$856,922	\$652,189	\$508,876	\$408,557	\$338,334	\$289,178	\$254,768	\$230,682	\$213,821	\$202,018	\$193,757	\$187,974	\$183,925	\$181,092	\$179,108	\$177,719	\$176,747	\$0
CCA		\$819,258	\$1,392,739	\$974,918	\$682,442	\$477,710	\$334,397	\$234,078	\$163,854	\$114,698	\$80,289	\$56,202	\$39,341	\$27,539	\$19,277	\$13,494	\$9,446	\$6,612	\$4,628	\$3,240	\$2,268	\$1,588
Investment Activities																						
FCI		\$5,461,723																				
Salvage																						\$0
Fiscal effect of salvage																						\$1,074
Working Capital		\$91,593																				\$91,593
Financing Activities																						
Net Cash Flow		\$5,553,316	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$174,479	\$94,255

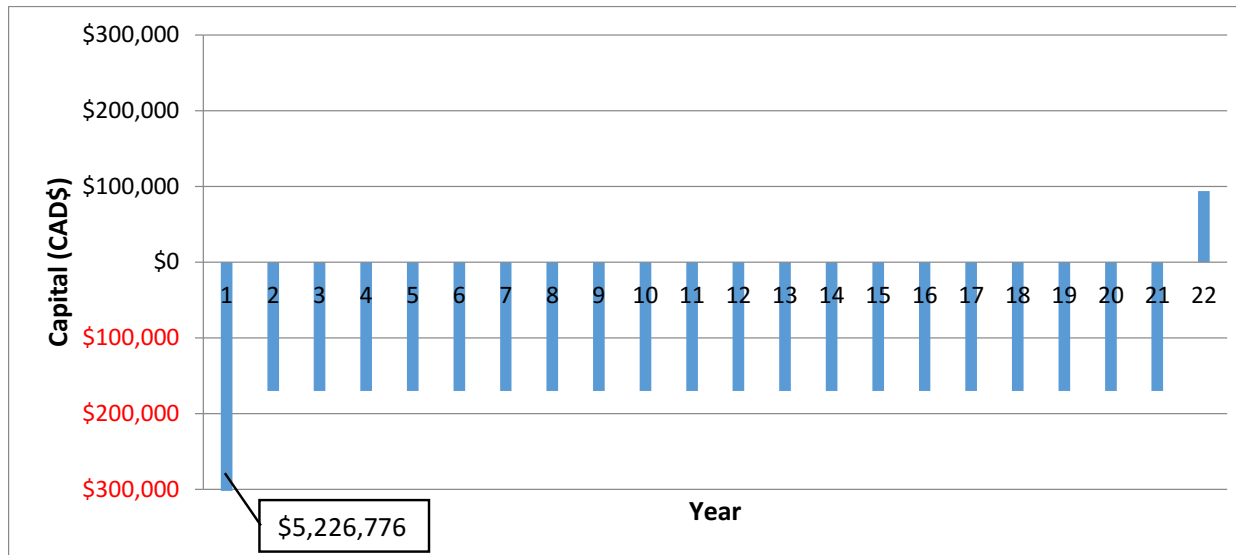


15.2. Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #2

Level	Total Capital Investment (TCI)	Chosen SP (% of f.o.b.)	Actual (\$CAD)
1.2.2	Direct Costs		
	Equipment (f.o.b.)	100.0%	\$1,402,007
	Sapres	3.3%	\$46,266
	Shipping	5.0%	\$70,100
	Installation	34.0%	\$476,683
	Piping	57.0%	\$799,144
	Electrical	20.0%	\$280,401
	Instrumentation & Control system	16.0%	\$224,321
	Service facilities	6.0%	\$84,120
	Site Preparation & Yard Improvements	3.0%	\$42,060
1.2.1	Indirect Costs		
	Engineering & Supervision	34.0%	\$476,683
	Construction expenses	35.0%	\$490,703
	Legal expenses	3.0%	\$42,060
	Contractor's fee	13.0%	\$182,261
	Health, Safety and Environnement functions	2.0%	\$28,040
	Contingency	35.0%	\$490,703
1.2	Fixed Capital Investment (FCI)		\$5,135,553
1.1	Working Capital Investment (WCI)	1/12*TCP	\$91,223
1	Total Capital Investment (TCI)		\$5,226,776

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	Comment
1.3.4.7	Raw Material		
	Purchase cost of LCH	\$462,828	
	LCH transport	\$209,290	
	Yeasts (LOGM1)	\$211,560	
	Urea	\$3,570	
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	\$10,017	
	Lactrol	\$1,316	
	Corn Mash	\$0	
1.3.4.6	Operating Labor	\$0	
1.3.4.5	Operating supervision	\$0	
1.3.4.4	Utilities		
	Electricity	\$4,154	
	Steam	\$5,146	
	Vapor Effect	\$0	
	<u>Waste Treatment and Disposal</u> <u>(Stillage)</u>		
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	\$0	
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	\$104,645	
	Water, Process (new)	\$373	
	Water, Cooling	\$125	
1.3.4.3	Maintenance & Repairs	\$70,100	
1.3.4.2	Operating supplies		
	Acid/Base (pH control)	\$0	
	NaOH 50% (CIP)	\$11,550	
1.3.4.1	Laboratory charges	\$0	
1.3.4	Variable Production costs	\$1,094,674	
1.3.3	Fixed Charges	\$0	*Depreciation excluded
1.3.2	Depreciation (CCA)	ND	*Calculated separately below using 30% and half year rule
1.3.1	Plant Overhead	\$0	
1.3	Manufacturing costs	\$1,094,674	
1.2	General Expenses	\$0	
1.1	Contingency	ND	*Calculated as a reduction in yearly OP hours of 5.2% (or 2.7 weeks); reducing yearly production capacity of the same amount. Thus annual OP hours are set to 8305h/yr for this case study.
1	Total Product Costs (TPC)	\$1,094,674	

Year	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Income Statement																						
Revenus		\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640
Expenses																						
Variable Production costs		\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674	\$1,094,674
Fixed Charges		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Depreciation (CCA)		\$770,333	\$1,309,566	\$916,696	\$641,687	\$449,181	\$314,427	\$220,099	\$154,069	\$107,848	\$75,494	\$52,846	\$36,992	\$25,894	\$18,126	\$12,688	\$8,882	\$6,217	\$4,352	\$3,046	\$2,133	\$0
Plant Overhead		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
General Expenses		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Gross profit		\$940,367	\$1,479,600	\$1,086,731	\$811,722	\$619,216	\$484,461	\$390,133	\$324,104	\$277,883	\$245,528	\$222,880	\$207,026	\$195,929	\$188,161	\$182,723	\$178,916	\$176,252	\$174,387	\$173,081	\$172,167	\$0
Income Tax (29%)		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Net profit		\$940,367	\$1,479,600	\$1,086,731	\$811,722	\$619,216	\$484,461	\$390,133	\$324,104	\$277,883	\$245,528	\$222,880	\$207,026	\$195,929	\$188,161	\$182,723	\$178,916	\$176,252	\$174,387	\$173,081	\$172,167	\$0
Cash Flow Statement																						
Exploitation Activities																						
Net profit		\$940,367	\$1,479,600	\$1,086,731	\$811,722	\$619,216	\$484,461	\$390,133	\$324,104	\$277,883	\$245,528	\$222,880	\$207,026	\$195,929	\$188,161	\$182,723	\$178,916	\$176,252	\$174,387	\$173,081	\$172,167	\$0
CCA		\$770,333	\$1,309,566	\$916,696	\$641,687	\$449,181	\$314,427	\$220,099	\$154,069	\$107,848	\$75,494	\$52,846	\$36,992	\$25,894	\$18,126	\$12,688	\$8,882	\$6,217	\$4,352	\$3,046	\$2,133	\$1,493
Investment Activities																						
FCI		\$5,135,553																				
Salvage																						\$0
Fiscal effect of salvage																						\$1,010
Working Capital		\$91,223																				\$91,223
Financing Activities																						
Net Cash Flow		\$5,226,776	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$170,034	\$93,726

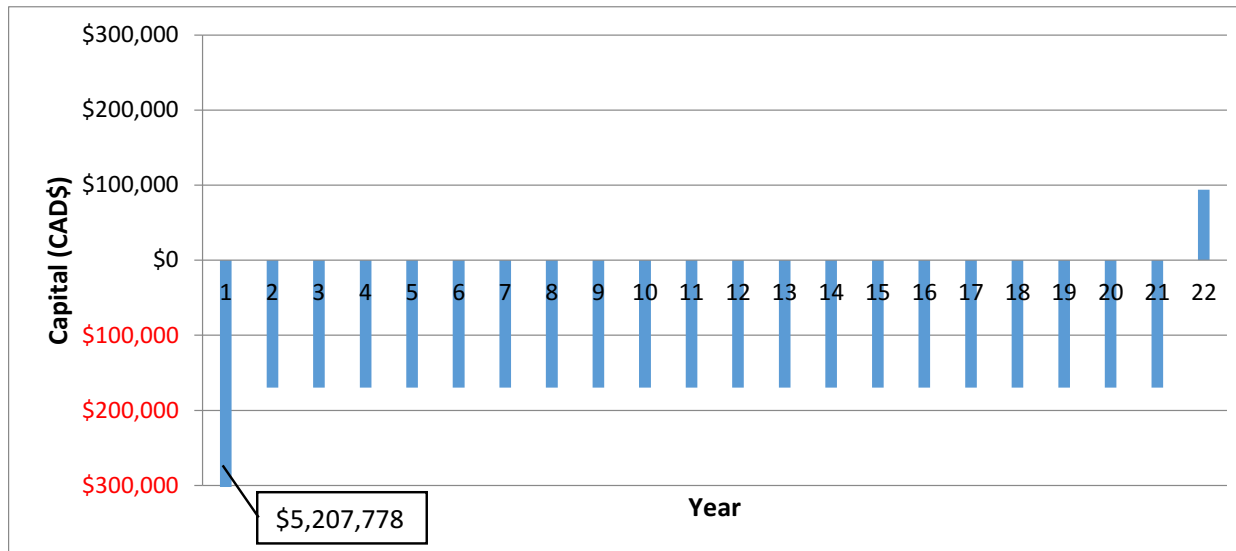


15.3. Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #3

Level	Total Capital Investment (TCI)	Chosen SP (% of f.o.b.)	Actual (\$CAD)
1.2.2	Direct Costs		
	Equipment (f.o.b.)	100.0%	\$1,396,827
	Sapres	3.3%	\$46,095
	Shipping	5.0%	\$69,841
	Installation	34.0%	\$474,921
	Piping	57.0%	\$796,192
	Electrical	20.0%	\$279,365
	Instrumentation & Control system	16.0%	\$223,492
	Service facilities	6.0%	\$83,810
	Site Preparation & Yard Improvements	3.0%	\$41,905
1.2.1	Indirect Costs		
	Engineering & Supervision	34.0%	\$474,921
	Construction expenses	35.0%	\$488,890
	Legal expenses	3.0%	\$41,905
	Contractor's fee	13.0%	\$181,588
	Health, Safety and Environnement functions	2.0%	\$27,937
	Contingency	35.0%	\$488,890
1.2	Fixed Capital Investment (FCI)		\$5,116,579
1.1	Working Capital Investment (WCI)	1/12*TCP	\$91,199
1	Total Capital Investment (TCI)		\$5,207,778

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	Comment
1.3.4.7	Raw Material		
	Purchase cost of LCH	\$462,828	
	LCH transport	\$209,290	
	Yeasts (LOGM1)	\$211,560	
	Urea	\$3,570	
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	\$10,017	
	Lactrol	\$1,316	
	Corn Mash	\$0	
1.3.4.6	Operating Labor	\$0	
1.3.4.5	Operating supervision	\$0	
1.3.4.4	Utilities		
	Electricity	\$4,130	
	Steam	\$5,146	
	Vapor Effect	\$0	
	<u>Waste Treatment and Disposal</u> <u>(Stillage)</u>		
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	\$0	
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	\$104,645	
	Water, Process (new)	\$373	
	Water, Cooling	\$125	
1.3.4.3	Maintenance & Repairs	\$69,841	
1.3.4.2	Operating supplies		
	Acid/Base (pH control)	\$0	
	NaOH 50% (CIP)	\$11,550	
1.3.4.1	Laboratory charges	\$0	
1.3.4	Variable Production costs	\$1,094,391	
1.3.3	Fixed Charges	\$0	*Depreciation excluded
1.3.2	Depreciation (CCA)	ND	*Calculated separately below using 30% and half year rule
1.3.1	Plant Overhead	\$0	
1.3	Manufacturing costs	\$1,094,391	
1.2	General Expenses	\$0	
1.1	Contingency	ND	*Calculated as a reduction in yearly OP hours of 5.2% (or 2.7 weeks); reducing yearly production capacity of the same amount. Thus annual OP hours are set to 8305h/yr for this case study.
1	Total Product Costs (TPC)	\$1,094,391	

Year	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Income Statement																						
Revenue		\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640
Expenses																						
Variable Production costs		\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391	\$1,094,391
Fixed Charges		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Depreciation (CCA)		\$767,487	\$1,304,728	\$913,309	\$639,317	\$447,522	\$313,265	\$219,286	\$153,500	\$107,450	\$75,215	\$52,650	\$36,855	\$25,799	\$18,059	\$12,641	\$8,849	\$6,194	\$4,336	\$3,035	\$2,125	\$0
Plant Overhead		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
General Expenses		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Gross profit		\$937,238	\$1,474,479	\$1,083,061	\$809,068	\$617,273	\$483,017	\$389,037	\$323,251	\$277,201	\$244,966	\$222,402	\$206,607	\$195,550	\$187,811	\$182,393	\$178,600	\$175,946	\$174,087	\$172,787	\$171,876	\$0
Income Tax (29%)		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Net profit		\$937,238	\$1,474,479	\$1,083,061	\$809,068	\$617,273	\$483,017	\$389,037	\$323,251	\$277,201	\$244,966	\$222,402	\$206,607	\$195,550	\$187,811	\$182,393	\$178,600	\$175,946	\$174,087	\$172,787	\$171,876	\$0
Cash Flow Statement																						
Exploitation Activities																						
Net profit		\$937,238	\$1,474,479	\$1,083,061	\$809,068	\$617,273	\$483,017	\$389,037	\$323,251	\$277,201	\$244,966	\$222,402	\$206,607	\$195,550	\$187,811	\$182,393	\$178,600	\$175,946	\$174,087	\$172,787	\$171,876	\$0
CCA		\$767,487	\$1,304,728	\$913,309	\$639,317	\$447,522	\$313,265	\$219,286	\$153,500	\$107,450	\$75,215	\$52,650	\$36,855	\$25,799	\$18,059	\$12,641	\$8,849	\$6,194	\$4,336	\$3,035	\$2,125	\$1,487
Investment Activities																						
FCI		\$5,116,579																				
Salvage																						\$0
Fiscal effect of salvage																						\$1,006
Working Capital		\$91,199																				\$91,199
Financing Activities																						
Net Cash Flow		\$5,207,778	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$169,751	\$93,693

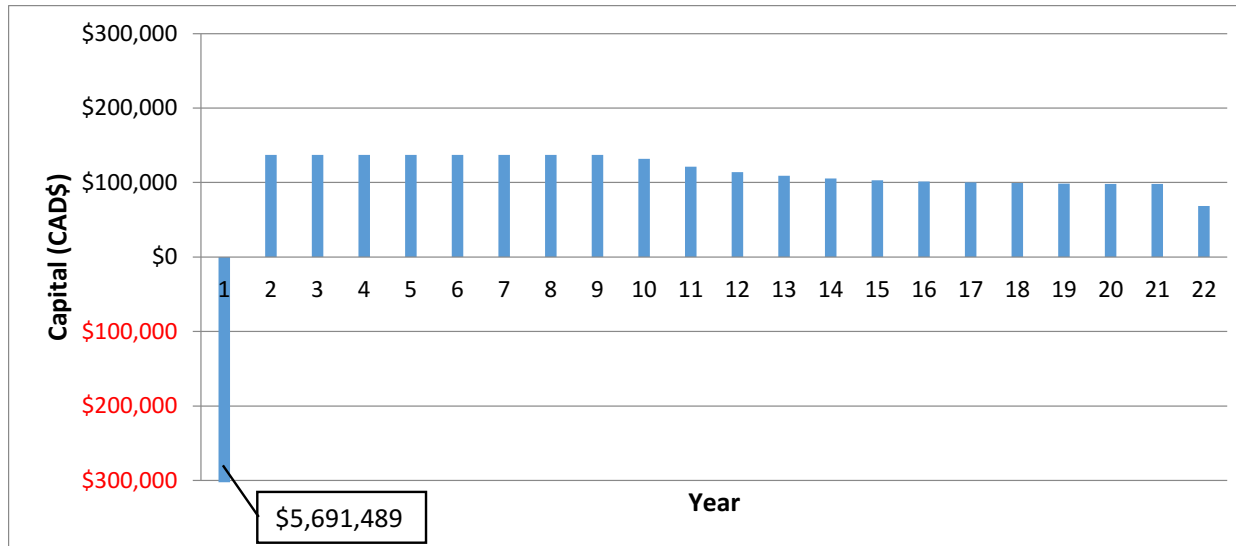


15.4. Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #7

Level	Total Capital Investment (TCI)	Chosen SP (% of f.o.b.)	Actual (\$CAD)
1.2.2	Direct Costs		
	Equipment (f.o.b.)	100.0%	\$1,535,863
	Sapres	3.3%	\$50,683
	Shipping	5.0%	\$76,793
	Installation	34.0%	\$522,193
	Piping	57.0%	\$875,442
	Electrical	20.0%	\$307,173
	Instrumentation & Control system	16.0%	\$245,738
	Service facilities	6.0%	\$92,152
	Site Preparation & Yard Improvements	3.0%	\$46,076
1.2.1	Indirect Costs		
	Engineering & Supervision	34.0%	\$522,193
	Construction expenses	35.0%	\$537,552
	Legal expenses	3.0%	\$46,076
	Contractor's fee	13.0%	\$199,662
	Health, Safety and Environnement functions	2.0%	\$30,717
	Contingency	35.0%	\$537,552
1.2	Fixed Capital Investment (FCI)		\$5,625,867
1.1	Working Capital Investment (WCI)	1/12*TCP	\$65,622
1	Total Capital Investment (TCI)		\$5,691,489

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	Comment
1.3.4.7	Raw Material		
	Purchase cost of LCH	\$462,828	
	LCH transport	\$0	
	Yeasts (LOGM1)	\$211,560	
	Urea	\$3,570	
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	\$10,017	
	Lactrol	\$1,316	
	Corn Mash	\$0	
1.3.4.6	Operating Labor	\$0	
1.3.4.5	Operating supervision	\$0	
1.3.4.4	Utilities		
	Electricity	\$4,189	
	Steam	\$5,146	
	Vapor Effect	\$0	
	<u>Waste Treatment and Disposal</u> <u>(Stillage)</u>		
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	\$0	
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	\$0	
	Water, Process (new)	\$373	
	Water, Cooling	\$125	
1.3.4.3	Maintenance & Repairs	\$76,793	
1.3.4.2	Operating supplies		
	Acid/Base (pH control)	\$0	
	NaOH 50% (CIP)	\$11,550	
1.3.4.1	Laboratory charges	\$0	
1.3.4	Variable Production costs	\$787,467	
1.3.3	Fixed Charges	\$0	*Depreciation excluded
1.3.2	Depreciation (CCA)	ND	*Calculated separately below using 30% and half year rule
1.3.1	Plant Overhead	\$0	
1.3	Manufacturing costs	\$787,467	
1.2	General Expenses	\$0	
1.1	Contingency	ND	*Calculated as a reduction in yearly OP hours of 5.2% (or 2.7 weeks); reducing yearly production capacity of the same amount. Thus annual OP hours are set to 8305h/yr for this case study.
1	Total Product Costs (TPC)	\$787,467	

Year	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Income Statement																						
Revenue		\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640
Expenses																						
Variable Production costs		\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467	\$787,467
Fixed Charges		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Depreciation (CCA)		\$843,880	\$1,434,596	\$1,004,217	\$702,952	\$492,066	\$344,447	\$241,113	\$168,779	\$118,145	\$82,702	\$57,891	\$40,524	\$28,367	\$19,857	\$13,900	\$9,730	\$6,811	\$4,768	\$3,337	\$2,336	\$0
Plant Overhead		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
General Expenses		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Gross profit		\$706,707	\$1,297,423	\$867,044	\$565,779	\$354,894	\$207,274	\$103,940	\$31,606	\$19,028	\$54,471	\$79,282	\$96,649	\$108,806	\$117,316	\$123,273	\$127,443	\$130,362	\$132,405	\$133,835	\$134,837	\$0
Income Tax (29%)		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$5,518	\$15,797	\$22,992	\$28,028	\$31,554	\$34,022	\$35,749	\$36,958	\$37,805	\$38,398	\$38,812	\$39,103	\$0
Net profit		\$706,707	\$1,297,423	\$867,044	\$565,779	\$354,894	\$207,274	\$103,940	\$31,606	\$13,510	\$38,675	\$56,290	\$68,621	\$77,252	\$83,294	\$87,524	\$90,485	\$92,557	\$94,008	\$95,023	\$95,734	\$0
Cash Flow Statement																						
Exploitation Activities																						
Net profit		\$706,707	\$1,297,423	\$867,044	\$565,779	\$354,894	\$207,274	\$103,940	\$31,606	\$13,510	\$38,675	\$56,290	\$68,621	\$77,252	\$83,294	\$87,524	\$90,485	\$92,557	\$94,008	\$95,023	\$95,734	\$0
CCA		\$843,880	\$1,434,596	\$1,004,217	\$702,952	\$492,066	\$344,447	\$241,113	\$168,779	\$118,145	\$82,702	\$57,891	\$40,524	\$28,367	\$19,857	\$13,900	\$9,730	\$6,811	\$4,768	\$3,337	\$2,336	\$1,635
Investment Activities																						
FCI		\$5,625,867																				
Salvage																						\$0
Fiscal effect of salvage																						\$1,107
Working Capital		\$65,622																				\$65,622
Financing Activities																						
Net Cash Flow		\$5,691,489	\$137,173	\$137,173	\$137,173	\$137,173	\$137,173	\$137,173	\$137,173	\$131,655	\$121,376	\$114,181	\$109,145	\$105,619	\$103,151	\$101,424	\$100,214	\$99,368	\$98,775	\$98,361	\$98,070	\$68,364

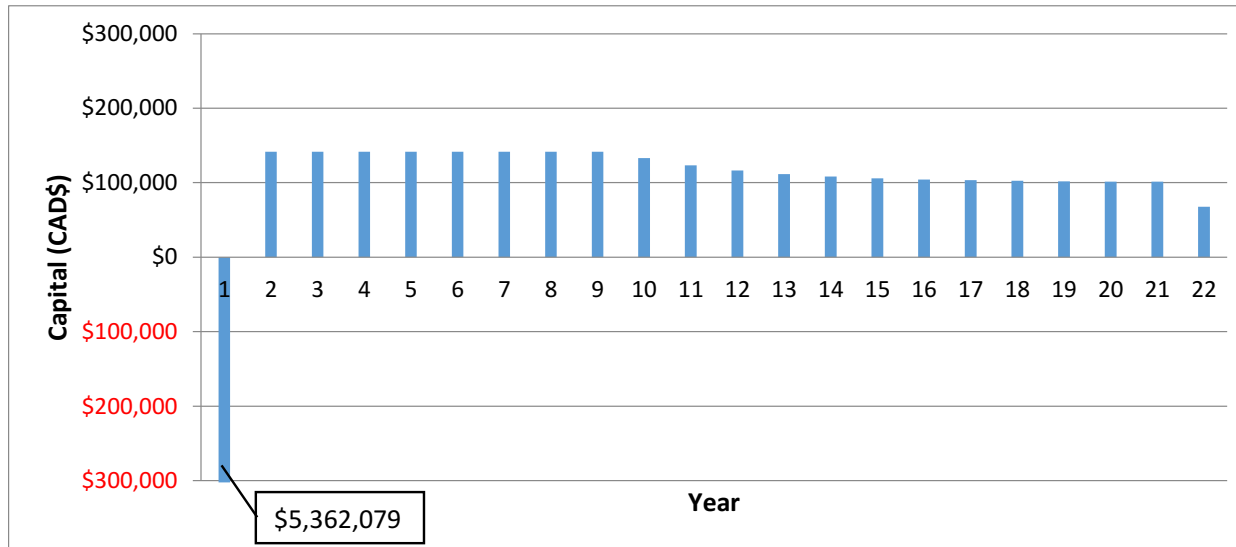


15.5. Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #8

Level	Total Capital Investment (TCI)	Chosen SP (% of f.o.b.)	Actual (\$CAD)
1.2.2	Direct Costs		
	Equipment (f.o.b.)	100.0%	\$1,446,037
	Sapres	3.3%	\$47,719
	Shipping	5.0%	\$72,302
	Installation	34.0%	\$491,653
	Piping	57.0%	\$824,241
	Electrical	20.0%	\$289,207
	Instrumentation & Control system	16.0%	\$231,366
	Service facilities	6.0%	\$86,762
	Site Preparation & Yard Improvements	3.0%	\$43,381
1.2.1	Indirect Costs		
	Engineering & Supervision	34.0%	\$491,653
	Construction expenses	35.0%	\$506,113
	Legal expenses	3.0%	\$43,381
	Contractor's fee	13.0%	\$187,985
	Health, Safety and Environnement functions	2.0%	\$28,921
	Contingency	35.0%	\$506,113
1.2	Fixed Capital Investment (FCI)		\$5,296,834
1.1	Working Capital Investment (WCI)	1/12*TCP	\$65,245
1	Total Capital Investment (TCI)		\$5,362,079

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	Comment
1.3.4.7	Raw Material		
	Purchase cost of LCH	\$462,828	
	LCH transport	\$0	
	Yeasts (LOGM1)	\$211,560	
	Urea	\$3,570	
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	\$10,017	
	Lactrol	\$1,316	
	Corn Mash	\$0	
1.3.4.6	Operating Labor	\$0	
1.3.4.5	Operating supervision	\$0	
1.3.4.4	Utilities		
	Electricity	\$4,150	
	Steam	\$5,146	
	Vapor Effect	\$0	
	<u>Waste Treatment and Disposal</u> <u>(Stillage)</u>		
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	\$0	
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	\$0	
	Water, Process (new)	\$373	
	Water, Cooling	\$125	
1.3.4.3	Maintenance & Repairs	\$72,302	
1.3.4.2	Operating supplies		
	Acid/Base (pH control)	\$0	
	NaOH 50% (CIP)	\$11,550	
1.3.4.1	Laboratory charges	\$0	
1.3.4	Variable Production costs	\$782,936	
1.3.3	Fixed Charges	\$0	*Depreciation excluded
1.3.2	Depreciation (CCA)	ND	*Calculated separately below using 30% and half year rule
1.3.1	Plant Overhead	\$0	
1.3	Manufacturing costs	\$782,936	
1.2	General Expenses	\$0	
1.1	Contingency	ND	*Calculated as a reduction in yearly OP hours of 5.2% (or 2.7 weeks); reducing yearly production capacity of the same amount. Thus annual OP hours are set to 8305h/yr for this case study.
1	Total Product Costs (TPC)	\$782,936	

Year	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Income Statement																						
Revenue		\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640
Expenses																						
Variable Production costs		\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936	\$782,936
Fixed Charges		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Depreciation (CCA)		\$794,525	\$1,350,693	\$945,485	\$661,839	\$463,288	\$324,301	\$227,011	\$158,908	\$111,235	\$77,865	\$54,505	\$38,154	\$26,708	\$18,695	\$13,087	\$9,161	\$6,412	\$4,489	\$3,142	\$2,199	\$0
Plant Overhead		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
General Expenses		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Gross profit		\$652,822	\$1,208,989	\$803,781	\$520,136	\$321,584	\$182,598	\$85,307	\$17,204	\$30,468	\$63,839	\$87,198	\$103,550	\$114,996	\$123,008	\$128,617	\$132,543	\$135,291	\$137,215	\$138,561	\$139,504	\$0
Income Tax (29%)		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$8,836	\$18,513	\$25,287	\$30,029	\$33,349	\$35,672	\$37,299	\$38,437	\$39,234	\$39,792	\$40,183	\$40,456	\$0
Net profit		\$652,822	\$1,208,989	\$803,781	\$520,136	\$321,584	\$182,598	\$85,307	\$17,204	\$21,632	\$45,325	\$61,911	\$73,520	\$81,647	\$87,336	\$91,318	\$94,105	\$96,057	\$97,422	\$98,379	\$99,048	\$0
Cash Flow Statement																						
Exploitation Activities																						
Net profit		\$652,822	\$1,208,989	\$803,781	\$520,136	\$321,584	\$182,598	\$85,307	\$17,204	\$21,632	\$45,325	\$61,911	\$73,520	\$81,647	\$87,336	\$91,318	\$94,105	\$96,057	\$97,422	\$98,379	\$99,048	\$0
CCA		\$794,525	\$1,350,693	\$945,485	\$661,839	\$463,288	\$324,301	\$227,011	\$158,908	\$111,235	\$77,865	\$54,505	\$38,154	\$26,708	\$18,695	\$13,087	\$9,161	\$6,412	\$4,489	\$3,142	\$2,199	\$1,540
Investment Activities																						
FCI		\$5,296,834																				
Salvage																						
Fiscal effect of salvage																						\$0
Working Capital																						
Working Capital		\$65,245																				\$65,245
Financing Activities																						
Net Cash Flow		\$5,362,079	\$141,703	\$141,703	\$141,703	\$141,703	\$141,703	\$141,703	\$141,703	\$132,868	\$123,190	\$116,416	\$111,674	\$108,355	\$106,031	\$104,405	\$103,266	\$102,469	\$101,911	\$101,521	\$101,247	\$67,826

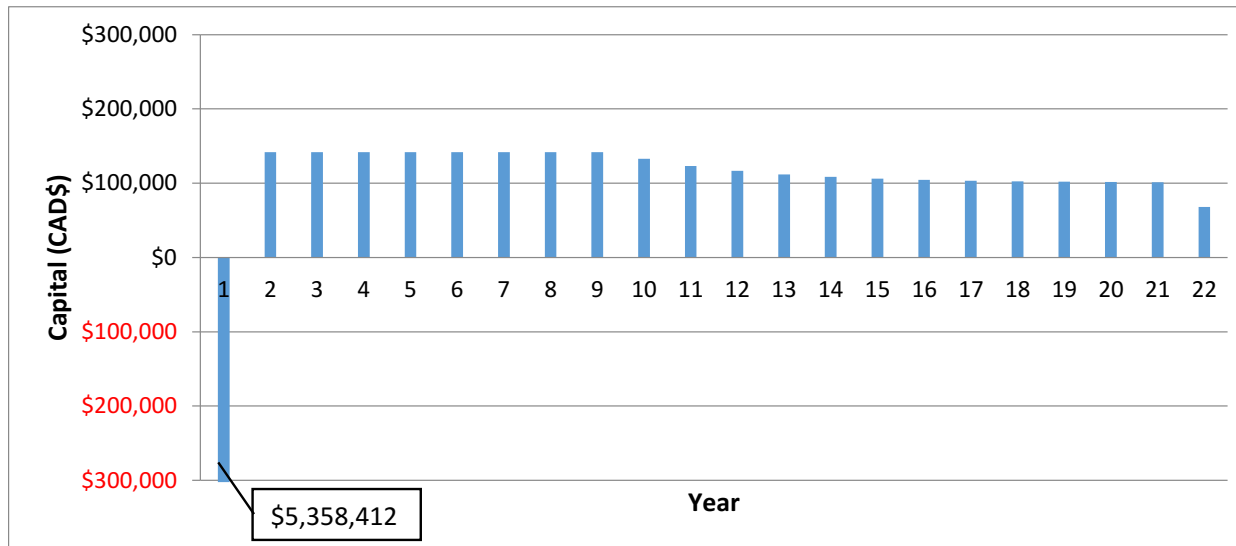


15.6. Détail des TCI, TCP, état des résultats et flux de trésorerie pour la configuration #9

Level	Total Capital Investment (TCI)	Chosen SP (% of f.o.b.)	Actual (\$CAD)
1.2.2	Direct Costs		
	Equipment (f.o.b.)	100.0%	\$1,445,037
	Sapres	3.3%	\$47,686
	Shipping	5.0%	\$72,252
	Installation	34.0%	\$491,313
	Piping	57.0%	\$823,671
	Electrical	20.0%	\$289,007
	Instrumentation & Control system	16.0%	\$231,206
	Service facilities	6.0%	\$86,702
	Site Preparation & Yard Improvements	3.0%	\$43,351
1.2.1	Indirect Costs		
	Engineering & Supervision	34.0%	\$491,313
	Construction expenses	35.0%	\$505,763
	Legal expenses	3.0%	\$43,351
	Contractor's fee	13.0%	\$187,855
	Health, Safety and Environnement functions	2.0%	\$28,901
	Contingency	35.0%	\$505,763
1.2	Fixed Capital Investment (FCI)		\$5,293,171
1.1	Working Capital Investment (WCI)	1/12*TCP	\$65,240
1	Total Capital Investment (TCI)		\$5,358,412

Level	Total Product Costs (TPC)	Cost	Comment
1.3.4.7	Raw Material		
	Purchase cost of LCH	\$462,828	
	LCH transport	\$0	
	Yeasts (LOGM1)	\$211,560	
	Urea	\$3,570	
	Yeast Essential Nutrients (YEN)	\$10,017	
	Lactrol	\$1,316	
	Corn Mash	\$0	
1.3.4.6	Operating Labor	\$0	
1.3.4.5	Operating supervision	\$0	
1.3.4.4	Utilities		
	Electricity	\$4,147	
	Steam	\$5,146	
	Vapor Effect	\$0	
	<u>Waste Treatment and Disposal</u> <u>(Stillage)</u>		
	<i>for WW treated at Biomethanisation Varennes plant</i>	\$0	
	<i>for WW or PW shipped back to CRB's plant for recycling</i>	\$0	
	Water, Process (new)	\$373	
	Water, Cooling	\$125	
1.3.4.3	Maintenance & Repairs	\$72,252	
1.3.4.2	Operating supplies		
	Acid/Base (pH control)	\$0	
	NaOH 50% (CIP)	\$11,550	
1.3.4.1	Laboratory charges	\$0	
1.3.4	Variable Production costs	\$782,883	
1.3.3	Fixed Charges	\$0	*Depreciation excluded
1.3.2	Depreciation (CCA)	ND	*Calculated separately below using 30% and half year rule
1.3.1	Plant Overhead	\$0	
1.3	Manufacturing costs	\$782,883	
1.2	General Expenses	\$0	
1.1	Contingency	ND	*Calculated as a reduction in yearly OP hours of 5.2% (or 2.7 weeks); reducing yearly production capacity of the same amount. Thus annual OP hours are set to 8305h/yr for this case study.
1	Total Product Costs (TPC)	\$782,883	

Year	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Income Statement																						
Revenue		\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640	\$924,640
Expenses																						
Variable Production costs		\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883	\$782,883
Fixed Charges		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Depreciation (CCA)		\$793,976	\$1,349,759	\$944,831	\$661,382	\$462,967	\$324,077	\$226,854	\$158,798	\$111,158	\$77,811	\$54,468	\$38,127	\$26,689	\$18,682	\$13,078	\$9,154	\$6,408	\$4,486	\$3,140	\$2,198	\$0
Plant Overhead		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
General Expenses		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0
Gross profit		\$652,219	\$1,208,002	\$803,075	\$519,625	\$321,211	\$182,321	\$85,097	\$17,041	\$30,598	\$63,946	\$87,289	\$103,629	\$115,067	\$123,074	\$128,679	\$132,602	\$135,348	\$137,271	\$138,617	\$139,559	\$0
Income Tax (29%)		\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$0	\$8,873	\$18,544	\$25,314	\$30,052	\$33,370	\$35,691	\$37,317	\$38,455	\$39,251	\$39,809	\$40,199	\$40,472	\$0
Net profit		\$652,219	\$1,208,002	\$803,075	\$519,625	\$321,211	\$182,321	\$85,097	\$17,041	\$21,725	\$45,401	\$61,975	\$73,577	\$81,698	\$87,383	\$91,362	\$94,148	\$96,097	\$97,462	\$98,418	\$99,087	\$0
Cash Flow Statement																						
Exploitation Activities																						
Net profit		\$652,219	\$1,208,002	\$803,075	\$519,625	\$321,211	\$182,321	\$85,097	\$17,041	\$21,725	\$45,401	\$61,975	\$73,577	\$81,698	\$87,383	\$91,362	\$94,148	\$96,097	\$97,462	\$98,418	\$99,087	\$0
CCA		\$793,976	\$1,349,759	\$944,831	\$661,382	\$462,967	\$324,077	\$226,854	\$158,798	\$111,158	\$77,811	\$54,468	\$38,127	\$26,689	\$18,682	\$13,078	\$9,154	\$6,408	\$4,486	\$3,140	\$2,198	\$1,539
Investment Activities																						
FCI		\$5,293,171																				
Salvage																						
Fiscal effect of salvage																						\$0
Working Capital																						
Working Capital		\$65,240																				\$65,240
Financing Activities																						
Net Cash Flow		\$5,358,412	\$141,757	\$141,757	\$141,757	\$141,757	\$141,757	\$141,757	\$141,757	\$132,883	\$123,212	\$116,443	\$111,704	\$108,387	\$106,065	\$104,440	\$103,302	\$102,505	\$101,948	\$101,558	\$101,285	\$67,820



16. Annexe I : Dossiers de simulation du procédé LCH

Plusieurs sections de ce rapport reposent sur les données obtenues grâce à la simulation du procédé LCH. Tel que mentionné précédemment, cette simulation a pour but principal de calculer la valeur nominale des différents flux massiques et énergétiques. Afin d'obtenir ces bilans de masse et d'énergie, le logiciel de simulation de procédé chimique ChemCAD et le logiciel de calcul Microsoft Excel ont été conjointement utilisés.

- ✓ Le fichier ChemCAD remis en pièce jointe à ce rapport se nomme : « Simulation procede LCH (final).cc6 ».
- ✓ Le fichier compagnon MSE se nomme remis en pièce jointe à ce rapport se nomme : « Simulation procede LCH (compagnion).xls ».