

Procédé de préparation d'un substrat pour la fermentation

Domaine de l'invention

La présente invention concerne des procédés de préparation d'un substrat utilisable en fermentation à partir d'une légumineuse qui émettent de faibles émissions de gaz à effet de serre et des substrats de fermentation obtenus par de tels procédés.

Arrière-plan technique

L'industrie de fermentation telle que la production d'éthanol, d'acides organiques, d'acides aminées ou encore de vitamines, nécessite des substrats riches en glucose ou saccharose. Le glucose est l'aliment de base des microorganismes nécessaires à la production des produits cités plus haut.

Pour obtenir ce glucose, la matière première utilisée est principalement une céréale riche en carbohydrate telle que le blé et maïs ou, lorsque le substrat contient du saccharose, la betterave ou la canne à sucre. Lorsque la matière première contient du saccharose, celui-ci est de manière classique extrait de la plante pour obtenir le jus sucré qui servira de substrat à la fermentation. Lorsque la matière première contient de l'amidon, le procédé typique de production de glucose comprend une première étape consistant à produire une farine de cette matière première, suivie d'une étape de liquéfaction (ou hydrolyse) pour obtenir un lait riche en amidon, suivie d'une saccharification pour convertir l'amidon en glucose fermentescible qui servira comme ingrédient d'un substrat de fermentation.

Plus précisément, lorsque le blé est utilisé comme source de glucose pour un procédé de production d'éthanol, le grain est préalablement broyé afin de séparer le son de la farine. La farine est ensuite diluée dans de l'eau afin d'atteindre environ 30 % de matière sèche, et une enzyme tel qu'une α -amylase est ajoutée dans ce mélange. Le lait ainsi obtenu est introduit dans une cuve contenant des cannes d'injection de vapeur. Par l'injection de vapeur, la température du lait va augmenter jusqu'à atteindre environ 95°C, afin que les granules d'amidon contenues dans la farine éclatent et libèrent

dans le milieu les chaînes d'amidon. L'amidon est un polymère de glucose composé d'un mélange de deux homopolymères : l'amylose, qui est un polymère de glucose sous forme linéaire dans lequel les unités de glucose sont liées par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$, et l'amylopectine, qui est un polymère de glucose sous une forme dite « branchée » ou ramifiée, dans lequel la présence de liaisons $\alpha(1\rightarrow6)$ (en plus de liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$) engendre des ramifications en grand nombre. La présence d' α -amylase va permettre d'hydrolyser ces chaînes en plus petits fragments appelés dextrines. La taille de la cuve est généralement dimensionnée afin d'obtenir un temps de résidence de 1 à 2 heures, de sorte à laisser un temps de contact suffisant pour que l'enzyme ait suffisamment dégradé les chaînes d'amidon en dextrines. Selon une première variante du procédé, la solution de dextrines alors obtenue est refroidie à 60°C avant transfert dans une autre cuve. Une autre enzyme telle qu'une glucoamylase est ajoutée afin d'hydrolyser les dextrines en glucose. Cette opération nommée pré-saccharification prend typiquement entre 3 et 4 heures selon le dosage de l'enzyme, et permet d'obtenir un niveau de glucose minimum nécessaire à la croissance des micro-organismes. La solution de glucose ainsi obtenue est refroidie de nouveau pour atteindre une température de 30°C environ et est ensuite transférée dans une cuve dite de fermentation. Dans le cas de la production d'éthanol, des levures sont ajoutées dans la cuve. Ces microorganismes vont consommer le glucose et produire de l'éthanol, destiné en particulier à l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et pour la chimie verte.

Selon une deuxième variante du procédé, on n'effectue pas de pré-saccharification mais une étape de propagation. La solution de dextrine obtenue après liquéfaction est directement refroidie à 30°C pour être injectée dans une cuve. Dans le même temps, sont injectées la levure et la glucoamylase. La température étant à 30°C, la glucoamylase a une activité réduite mais suffisante pour apporter le glucose nécessaire à la croissance des levures.

Dans les cas où le glucose provenant du blé est utilisé dans la production d'acides organiques, de vitamines ou d'acides aminés, le procédé d'obtention du glucose est généralement différent. Après l'étape de liquéfaction, la saccharification des dextrines doit être complète, contrairement au procédé utilisé pour la production d'éthanol. Le temps de saccharification est compris entre 40 et 60 heures afin que la totalité des dextrines aient été converties en glucose. En fin de saccharification, le taux de glucose doit être supérieur à 95 % sur matière sèche. Pour ces productions d'acides organiques, vitamines ou acides aminés, la solution de glucose doit être

débarrassée de toutes espèces insolubles et contenir un taux d'espèces solubles autres que le glucose (telles que protéines, matières grasses, minéraux et autres matières organiques) le plus bas possible pour être utilisée comme substrat de fermentation. Des étapes de purification sont donc usuellement effectuées sur la solution de glucose, telles que des étapes de filtration, d'échanges d'ions et d'adsorption.

Lorsque la matière première est la betterave, le procédé d'extraction du sucre commence par un lavage de la racine visant à ôter les radicelles puis la betterave lavée est coupée en petite baguettes appelées cossettes. Celles-ci sont introduites dans un appareil, appelé diffuseur, contenant un volume d'eau qui circule à contre-courant et chauffé à 80°C. Au cours de cette opération, les composés solubles de la betterave migrent dans l'eau par un processus d'osmose. L'eau enrichie en composés solubles (le "*jus de diffusion*") sort en tête de diffuseur et les cossettes appauvries de leur sucre sortent en queue de diffuseur sous forme de pulpes. Les jus de diffusion sont ensuite soumis à un traitement à la chaux (ou chaulage) afin de précipiter une partie des impuretés présentes dans les jus. Le chaulage est généralement suivi d'une double carbonatation (ajout de CO₂) pour précipiter la chaux restant dans le jus. Les impuretés et la chaux précipitées sont alors séparées du jus par filtration. Le jus épuré est ensuite soumis à une étape d'évaporation permettant de le concentrer jusqu'à l'obtention d'un sirop ayant une concentration en sucre proche de la saturation. L'évaporation a typiquement lieu dans un évaporateur « à *multiple effets* » (plusieurs évaporateurs successifs) dans lequel la pression est abaissée d'effet en effet afin de réduire le point d'ébullition du jus concentré. Le sirop obtenu peut alors être utilisé dans un procédé de fermentation qui est le plus souvent destiné à la production d'éthanol.

Les procédés décrits ci-dessus sont très émetteurs de gaz à effet de serre et notamment de dioxyde de carbone et de protoxyde d'azote, en raison des procédés décrits précédemment et des plantes utilisées. En effet, ces plantes ont besoin de trouver dans le sol des quantités significatives d'azote minéral pour pousser (2 à 3 kg pour 100 kg de maïs ou de blé). Cet azote est alors apporté par des engrais azotés, qui constituent la principale cause des émissions de gaz à effet de serre liées à la culture de ces plantes en raison des émissions importantes qu'implique la production d'azote de synthèse (procédé Haber-Bosch) et de la volatilisation de protoxyde d'azote résultant de l'application des engrais.

Il existe donc un réel besoin de développer un procédé de préparation d'un substrat utilisable en fermentation, notamment pour la production d'éthanol ou autres composés organiques à l'échelle industrielle, ayant une émission de gaz à effet de serre réduite.

Résumé de l'invention

L'invention concerne en premier lieu un procédé de préparation d'un substrat de fermentation, comprenant les étapes suivantes :

- la fourniture d'au moins une graine de légumineuse comprenant de l'amidon et des protéines ;
- la micronisation de ladite au moins une graine, de manière à obtenir une fraction micronisée ;
- la purification de la fraction micronisée, de manière à collecter une fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine ;
- le mélange de la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine avec un liquide, de manière à former un fluide d'amidon ;
et
- l'hydrolyse de l'amidon par mélange de vapeur d'eau avec le fluide d'amidon, de manière à obtenir un fluide d'amidon hydrolysé.

Dans des modes de réalisation, le procédé comprend en outre une étape d'introduction dans le fluide d'amidon hydrolysé d'au moins une enzyme choisie dans le groupe constitué des glucosidases, de préférence d'au moins deux enzymes choisies dans le groupe constitué des glucosidases, plus préférentiellement d'au moins une α -1,4-glucosidase et une amylo- α -1,6-glucosidase.

Dans des modes de réalisation, le procédé comprend en outre une étape d'introduction dans le fluide d'amidon d'au moins une enzyme choisie dans le groupe constitué des saccharidases, de préférence une α -amylase.

Dans des modes de réalisation, la graine de légumineuse comprend une pellicule, et le procédé comprend une étape de dépelliculage de la graine préalablement à la micronisation.

Dans des modes de réalisation, l'hydrolyse de l'amidon est effectuée à l'aide d'un dispositif d'injection directe de vapeur en mode continu.

Dans des modes de réalisation, la purification de la fraction micronisée comprend une étape de séparation aéraulique, de préférence au moyen d'un cyclone avec sélecteur.

Dans des modes de réalisation, la légumineuse est choisie dans le groupe des haricots, des pois, des fèves, des lentilles, des pois chiches et des mélanges de ceux-ci.

Dans des modes de réalisation, le procédé génère une émission de gaz à effet de serre inférieure à 100, de préférence 60, kg de CO₂ équivalent pétrole par tonne de graine de légumineuse utilisée.

L'invention concerne également un substrat de fermentation obtenu par un procédé tel que décrit ci-dessus.

L'invention concerne également un procédé de fermentation comprenant la mise en contact d'un substrat de fermentation tel que décrit ci-dessus avec au moins un microorganisme.

L'invention concerne également un procédé de production d'un produit de fermentation, comprenant les étapes suivantes :

- la préparation d'un substrat de fermentation selon un procédé tel que décrit ci-dessus ; et
- la mise en contact dudit substrat de fermentation avec au moins un microorganisme, de manière à obtenir un produit de fermentation.

Dans des modes de réalisation, le produit de fermentation produit par le procédé ci-dessus comprend au moins un composé choisi dans le groupe constitué des alcools, de préférence l'éthanol, des acides organiques, des acides aminés, des vitamines et des mélanges de ceux-ci.

Dans des modes de réalisation, le microorganisme est choisi dans le groupe constitué des levures, des bactéries et des combinaisons de ceux-ci.

L'invention concerne également un produit de fermentation obtenu par un procédé tel que décrit ci-dessus.

Dans des modes de réalisation, le produit de fermentation comprend au moins un composé choisi dans le groupe constitué des alcools, de préférence l'éthanol, des acides organiques, des acides aminés, des vitamines et des mélanges de ceux-ci.

La présente invention permet de répondre au besoin exprimé ci-dessus. Elle fournit plus particulièrement un procédé de préparation d'un substrat de fermentation plus respectueux de l'environnement, et plus particulièrement à faibles émissions de gaz à effet de serre, tout en permettant la production d'un substrat riche en nutriments pour la fermentation, et en particulier en glucose, et en étant susceptible d'être produit à l'échelle industrielle.

Cela est accompli grâce à l'utilisation d'une matière première spécifique, à savoir une légumineuse, et à la combinaison d'une étape de micronisation de ladite légumineuse avec une étape de purification de la

légumineuse micronisée permettant l'obtention d'une fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine.

Brève description des figures

La figure 1 représente une représentation schématique d'un exemple de dispositif d'injection directe de vapeur en mode continu utilisable dans l'invention. Les flèches représentent la direction d'écoulement des flux.

Description détaillée

L'invention est maintenant décrite plus en détail et de façon non limitative dans la description qui suit.

Sauf indication contraire, tous les pourcentages sont des pourcentages massiques.

Dans le présent texte, les quantités indiquées pour une espèce donnée peuvent s'appliquer à cette espèce selon toutes ses définitions (telles que mentionnées dans le présent texte), y compris les définitions plus restreintes.

L'invention concerne un procédé de préparation d'un substrat à partir d'au moins une graine de légumineuse.

Par « *légumineuse* », on entend les plantes de la famille des *Fabacées*. Les graines de légumineuse comprennent, notamment, de l'amidon et des protéines. Elles présentent l'avantage d'être riches en glucides (elles peuvent comprendre environ 60 % de glucide), essentiellement sous forme d'amidon.

Toutes les légumineuses sont adaptées à l'invention. A titre d'exemples de légumineuse utilisable dans l'invention, on peut citer en particulier les haricots, les pois, les fèves, les lentilles, les pois chiches et les mélanges de ceux-ci.

L'utilisation de légumineuses en tant que matière première est avantageux car leur culture résulte en de faibles émissions de gaz à effet de serre. En effet, les légumineuses sont les seules plantes capables de fixer l'azote de l'air dans le sol grâce à leur association symbiotique avec des bactéries du genre *Rhizobium* via la formation de nodosités, ce qui permet l'apport à la plante de l'azote nécessaire à sa croissance. La capacité des légumineuses à fixer l'azote provenant de l'air permet d'éviter l'utilisation d'engrais azotés qui, appliqués en excès, nuisent à la biodiversité des sols et donc à leur fertilité. De plus, l'application d'engrais azotés rejette une grande quantité de protoxyde d'azote qui est un gaz à effet de serre. En outre, l'azote de l'air fixé par les légumineuses est restitué à la culture suivante via la décomposition des résidus de culture (parties aériennes et souterraines) par

les bactéries *Rhizobium*, les résidus les plus facilement dégradables (feuilles, tiges peu ligneuses au rapport carbone/azote faible) se décomposant et libérant de l'azote en quelques semaines tandis que les parties ligneuses (tiges, racines) minéralisent plus lentement. Plus particulièrement, les émissions de carbone liées à la culture de légumineuse sont estimées à 200 kg de CO₂ équivalent pétrole par tonne de légumineuse. Lorsque la culture de légumineuse est associée à des cultures de céréales dans un processus de rotation des cultures (par exemple, alternance des cultures de pois, blé et avoine), l'apport d'engrais azotés est diminué, ce qui peut permettre de réduire les émissions de carbone de 189 kg de CO₂ équivalent pétrole par tonne de légumineuse : la culture des légumineuses a donc dans ce cas un bilan net quasi neutre de 11 kg de CO₂ équivalent pétrole par tonne de légumineuse.

Les graines de légumineuse sont un matériau végétal comprenant une pellicule et une amande. Toutefois, dans le présent texte, le terme « *graine* » peut désigner de manière générale la graine totale ainsi que toute partie de la graine (par exemple l'amande), sauf indication contraire.

De préférence, on utilise comme matière première de départ une graine de légumineuse comprenant une pellicule et une amande.

De manière avantageuse, le procédé selon l'invention comprend une étape de retrait de la pellicule (ou dépelliculage) des graines de légumineuse. En effet, la pellicule est composée majoritairement de fibres non solubles qui ne sont pas consommées par les microorganismes de fermentation. De plus, la majorité des contaminants de la graine de légumineuse se trouvent dans la pellicule, son retrait permet ainsi de réduire les risques de contamination du substrat préparé. En outre, la présence de fibres augmente aussi la viscosité du substrat de fermentation préparé, ce qui limite la teneur de matière sèche de ce substrat. La quantité massique de fibres peut par exemple représenter 8 à 10 % de la matière sèche de la graine totale de légumineuse.

De préférence le dépelliculage est un dépelliculage mécanique, effectué par exemple par abrasion, compression, impact, cisaillement ou tout autre action mécanique appropriée.

Avantageusement, le dépelliculage est effectué par broyage de la graine puis séparation des particules obtenues en fonction de leur taille. Pour le broyage, on peut utiliser tout type de broyeur adapté, notamment tout broyeur utilisant une des forces mécaniques mentionnées ci-dessus. En particulier, un broyeur pendulaire utilisant la force de compression peut être utilisé. A l'issue du broyage, on obtient un mélange de fragments de pellicule et de poudre d'amande (appelé également farine dans le présent texte).

L'étape de séparation des particules obtenues est de préférence effectuée par tamisage. En particulier, les particules peuvent être séparées par passage sur un tamis de maillage adapté permettant de séparer les fragments de pellicule de la farine. Par exemple, les particules d'une taille inférieure à une taille comprise entre 200 et 600 µm peuvent être séparées des fragments de pellicule d'une taille supérieure ou égale à une telle taille.

La graine de légumineuse, de préférence la graine dépelliculée, plus préférentiellement la farine, est soumise à une étape de broyage et une fraction broyée est collectée.

De manière particulièrement avantageuse, le broyage comprend, ou est, une micronisation, de préférence par voie sèche. La fraction broyée obtenue est alors une fraction micronisée.

Les légumineuses possèdent un taux de protéines sur matière sèche bien supérieur aux plantes classiquement utilisées comme matière première dans les industries de fermentation (céréales, betteraves et cannes à sucre). La teneur en protéines des légumineuses peut par exemple atteindre jusqu'à environ 30 % en poids sur matière sèche contre environ 10 à 12 % en poids pour les céréales et même considérablement moins en ce qui concerne la betterave et la canne à sucre. Une telle teneur élevée en protéine cause certaines difficultés dans les procédés de préparation classiques. Tout d'abord, lors de l'étape d'hydrolyse de l'amidon, la température appliquée entraîne la coagulation des protéines qui deviennent donc insolubles. Une quantité importante de protéines insolubles en combinaison avec la présence de fibres peut entraîner la formation d'un magma difficile à transférer d'une étape à l'autre et engendrer un risque de création d'un bouchon bloquant le passage dans les tuyauteries. De plus, la formation d'un magma restreint les technologies utilisables lors de l'étape d'hydrolyse, en compliquant ou en empêchant l'utilisation de certains dispositifs, en particulier d'injection directe de vapeur en mode continu. En effet, dans de tels dispositifs, la formation d'un bouchon de protéines et fibres peut entraîner une augmentation très importante de la pression dans le dispositif et causer l'endommagement du dispositif (en particulier l'explosion des joints), voire son explosion, ce qui peut de plus blesser un opérateur présent à proximité. En outre, une quantité importante de protéines entraîne aussi un taux d'acides aminés libres élevé. Lors de la fermentation, ce taux élevé d'acides aminés libres peut favoriser la croissance de microorganismes non désirés tels que par exemple des bactéries acétiques au lieu de levures dans le cas de la production d'éthanol.

L'étape de micronisation en combinaison avec l'étape subséquente de purification permettent de pallier les inconvénients mentionnés ci-dessus causés par une quantité importante de protéine. L'étape de micronisation permet de désolidariser les protéines des granules d'amidons pour permettre leur séparation ultérieure.

Par « *micronisation* », on entend un broyage permettant l'obtention de particules de diamètre médian en volume inférieur à 100 μm , de préférence inférieur à 50 μm , de préférence encore inférieur à 30 μm . Le diamètre médian en volume (D50) des particules peut être mesurée selon la norme NF ISO 13320-1.

La micronisation peut être effectuée par tout broyeur adapté (notamment, tout broyeur utilisant des forces mécaniques d'abrasion, de compression, d'impact ou de cisaillement). Par exemple, on peut utiliser un broyeur utilisant la force d'impact.

La micronisation est de manière très préférée effectuée à température ambiante (soit entre 15 et 30 °C).

La micronisation présente l'avantage supplémentaire d'être peu émettrice de gaz à effet de serre, celle-ci étant de préférence effectuée à température ambiante et par voie sèche.

Le procédé selon l'invention comprend une étape de purification de la fraction micronisée. Avantageusement, cette purification comprend une étape de séparation des granules d'amidon des protéines.

A l'issue de la purification, une fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine est collectée. On récupère aussi de préférence une fraction enrichie en protéine et appauvrie en amidon. Par « *fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine* », on entend une fraction dans laquelle le rapport des proportions molaires amidon / protéine (sur matière sèche) est supérieur à celui de la fraction soumise à la purification. Par « *fraction enrichie en protéine et appauvrie en amidon* », on entend une fraction dans laquelle le rapport des proportions molaires amidon / protéine (sur matière sèche) est inférieur à celui de la fraction soumise à la purification.

Compte tenu de la différence de taille entre les protéines et les granules d'amidon (D50 d'environ 1 à 5 μm pour les protéines et d'environ 10 à 30 μm pour les granules d'amidon) et de densité, on peut avantageusement utiliser une séparation basée sur une différence de taille, de densité ou de poids des particules. De préférence, la séparation est une séparation aéraulique. Par « *séparation aéraulique* », on entend toute technologie de séparation utilisant un jet de gaz (de préférence d'air) entraînant au moins une partie des

particules à séparer. De manière plus préférée, la séparation est une séparation cyclonique. Elle peut être effectuée au moyen d'un cyclone, avantageusement associé à un sélecteur. Par « *sélecteur* », on entend tout élément rotatif à vitesse variable et équipé de pales radiales installé dans une partie (de préférence la partie supérieure) d'un séparateur cyclonique. Cet équipement permet d'augmenter l'efficacité de séparation des particules en fonction de leur densité. L'utilisation d'un appareil de séparation aéraulique permet la récupération des particules les plus légères, entraînées par le flux de gaz, à une extrémité de l'appareil (fraction enrichie en protéine et appauvrie en amidon) tandis que les particules plus lourdes sont collectées à une autre extrémité (fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine).

De préférence, la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine comprend une quantité de glucides supérieure ou égale à 40 % en poids, de préférence une quantité de 40 à 90 % en poids, de préférence encore de 50 à 80 % en poids, plus préférentiellement de 60 à 80 % en poids (par rapport au poids total de matière sèche de la fraction). En particulier, la quantité de glucides dans la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine récupérée peut comprendre de 40 à 50 % en poids, ou de 50 à 60 % en poids, ou de 60 à 65 % en poids, ou de 65 à 70 % en poids, ou de 70 à 75 % en poids, ou de 75 à 80 % en poids, ou de 80 à 90 % en poids, par rapport au poids total de matière sèche de la fraction.

De préférence, la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine comprend une quantité de protéine inférieure ou égale à 30 % en poids, de préférence une quantité de 0,5 à 30 % en poids, de préférence encore de 3 à 20 % en poids, plus préférentiellement de 5 à 15 % en poids (par rapport au poids total de matière sèche de la fraction). Dans des modes de réalisation, la quantité de protéine dans la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine récupérée peut valoir, par rapport au poids total de matière sèche de la fraction, de 0,5 à 3 % en poids, ou de 3 à 5 % en poids, ou de 5 à 7 % en poids, ou de 7 à 10 % en poids, ou de 10 à 12 % en poids, ou de 12 à 15 % en poids, ou de 15 à 20 % en poids, ou de 20 à 30 % en poids.

De préférence, la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine comprend une quantité de fibre inférieure ou égale à 10 % en poids, de préférence une quantité de 0,5 à 10 % en poids, de préférence encore de 1 à 6 % en poids, par rapport au poids total de matière sèche de la fraction ; en particulier la fraction peut comprendre une quantité de fibre de 0,5 à 2 % en poids, ou de 2 à 4 % en poids, ou de 4 à 6 % en poids, ou de 6 à 8 % en poids, ou de 8 à 10 % en poids, par rapport au poids total de matière sèche de la

fraction. On entend par « *fibre* », toutes les molécules polymériques végétales, solubles ou insolubles, autres que l'amidon et les fragments d'amidon. Les fibres incluent en particulier la cellulose, l'hémicellulose, la lignine, les β -glucanes et la pectine.

De préférence, la fraction amidon collectée comprend une quantité de matière grasse (lipides) inférieure ou égale à 5 % en poids, de préférence une quantité de 0,5 à 5 % en poids, de préférence encore de 0,5 à 3 % en poids, par rapport au poids total de matière sèche de la fraction ; en particulier la fraction peut comprendre une quantité de matière grasse de 0,5 à 1 % en poids, ou de 1 à 2 % en poids, ou de 2 à 3 % en poids, ou de 3 à 4 % en poids, ou de 4 à 5 % en poids, par rapport au poids total de matière sèche de la fraction.

Selon le procédé de l'invention, la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine est ensuite mélangée à un liquide pour former un fluide d'amidon (c'est-à-dire un fluide comprenant de l'amidon). Le liquide est de préférence de l'eau. Le fluide d'amidon est de préférence sous forme d'une dispersion, de préférence encore il s'agit d'un lait d'amidon. Par « *lait d'amidon* », on entend une suspension d'amidon dans l'eau (ladite suspension pouvant comprendre d'autres composants, solubilisés dans l'eau ou pas).

De préférence, le fluide d'amidon (de préférence le lait d'amidon) comprend une teneur en matière sèche de 10 à 50 % en poids, de préférence de 20 à 40 % en poids, plus préférentiellement de 25 à 35 % en poids, par exemple de 10 à 15 %, ou de 15 à 20 % en poids, ou de 20 à 25 % en poids, ou de 25 à 30 % en poids, ou de 30 à 35 % en poids, ou de 35 à 40 % en poids, ou de 40 à 45 % en poids, ou de 45 à 50 % en poids.

De manière très avantageuse, au moins une enzyme est introduite dans le fluide d'amidon (de préférence le lait d'amidon). L'enzyme est de préférence une saccharidase, et plus particulièrement une α -amylase. De manière très préférée, l'enzyme est thermostable, en particulier à des températures de 90 à 130°C. La quantité d'enzyme ajoutée est de préférence de 0,2 à 0,8 kg d'enzyme par tonne de matière sèche d'amidon, de préférence de 0,3 à 0,5 kg d'enzyme par tonne de matière sèche d'amidon. Le pH du fluide d'amidon est de préférence ajusté à un pH entre 3,5 et 6,5, plus particulièrement entre 4,0 et 6,0. Cette gamme de pH permet une efficacité optimale de l'enzyme. Les α -amylases sont des enzymes capables d'hydrolyser l'amidon en dextrines. Toutefois, à ce stade du procédé, l' α -amylases n'a pas accès aux molécules d'amidon qui sont enfermées dans des granules.

Le fluide d'amidon (de préférence le lait d'amidon) est ensuite soumis à une étape d'hydrolyse de l'amidon. Cette étape a pour but de provoquer l'éclatement des granules d'amidon afin de libérer les molécules d'amidon dans le fluide, de manière à permettre l'action des enzymes (cette étape visant à causer l'éclatement des granules d'amidon pouvant également être appelée « *liquéfaction* »). L'éclatement des granules d'amidon est réalisé au moyen d'un chauffage du fluide d'amidon (de préférence du lait d'amidon) à une température permettant l'introduction de liquide dans le granule, causant ainsi le gonflement du granule puis son éclatement. On obtient alors un fluide d'amidon hydrolysé.

Selon l'invention, l'hydrolyse est effectuée par mélange de vapeur d'eau avec le fluide d'amidon, de préférence à l'aide d'un dispositif d'injection directe de vapeur.

De préférence, le fluide d'amidon est chauffé (par mélange avec la vapeur d'eau) à une température (appelée dans le présent texte température d'hydrolyse ou température de liquéfaction) valant de 90 à 130 °C, de préférence de 90 à 100°C.

De manière particulièrement avantageuse, l'hydrolyse est effectuée par mélange d'un flux de vapeur d'eau avec un flux du fluide d'amidon. Par « *flux* », on entend un fluide (gaz ou liquide) en mouvement.

Le mélange des flux est plus préférentiellement opéré en continu, c'est-à-dire que l'introduction d'au moins un fluide à mélanger, et de préférence des deux fluides, dans le mélangeur est effectuée au moins en partie simultanément à la décharge du mélangeur dudit mélange.

Le mélange de vapeur d'eau avec le fluide d'amidon sous forme de flux permet une montée en température du fluide d'amidon très rapide, voire quasi-instantanée. Par rapport à l'utilisation de cuves (de généralement 300 à 500 m³, pour un temps de résidence de 1 à 2h) munies de cannes d'injection de vapeur qui sont classiquement utilisées, le mélange des fluides sous forme de flux en mode continu permet un chauffage plus rapide, une réduction de la consommation de vapeur, et une réduction de la consommation d'énergie. On estime que l'émission de gaz à effet de serre peut être réduite d'environ 40 %. Par conséquent, la mise en œuvre de l'étape d'hydrolyse par mélange en continu de la vapeur d'eau avec le fluide d'amidon sous forme de flux permet une réduction encore plus importante des émissions de gaz à effet de serre du procédé.

De manière particulièrement préférée, l'hydrolyse est effectuée à l'aide d'un dispositif d'injection directe de vapeur en mode continu, de préférence

encore d'un dispositif « *jet-cooker* » (ou « *cuiseur* »). Un exemple d'un tel dispositif est représenté en **figure 1**.

De préférence, le dispositif d'injection directe de vapeur en mode continu comprend une ligne d'amenée du fluide d'amidon 1 pour introduire le fluide dans un tube 3 appelée « *tube de mélange* », et une ligne d'amenée de vapeur d'eau 2 terminée par un injecteur de vapeur 4 pour injecter la vapeur dans le tube de mélange 3. De préférence, les points d'injection de la vapeur d'eau et du fluide d'amidon dans le tube de mélange 3 sont arrangés selon une disposition coaxiale. Avantageusement, l'injecteur de vapeur 4 forme un pointeau dans la ligne d'amenée du fluide d'amidon 1. Les flux de fluide d'amidon et de vapeur d'eau sont mélangés au sein du tube de mélange 3. Le tube de mélange 3 comprend une sortie de fluide 5, reliée à un tuyau de sortie permettant la décharge du mélange. Les flux de fluide d'amidon et de vapeur d'eau peuvent indépendamment l'un de l'autre être ajustés, par exemple au moyen de vannes.

De préférence, la pression du fluide d'amidon injecté dans le tube de mélange est de 0,2 à 1 MPa, de préférence encore de 0,4 à 0,7 Mpa. En particulier, la pression du fluide d'amidon injecté peut être de 0,2 à 0,4 Mpa, ou de 0,4 à 0,5 Mpa, ou de 0,5 à 0,6 Mpa, ou de 0,6 à 0,7 Mpa, ou de 0,7 à 0,8 Mpa, ou de 0,8 à 1 Mpa. La pression de la vapeur d'eau injectée dans le tube de mélange est avantageusement de 0,4 à 1,5 Mpa, de préférence encore de 0,6 à 1 Mpa. Notamment, la pression de la vapeur d'eau injectée peut être de 0,4 à 0,6 Mpa, ou de 0,6 à 0,8 Mpa, ou de 0,8 à 1 Mpa, ou de 1 à 1,2 Mpa, ou de 1,2 à 1,5 Mpa. La pression du mélange en sortie du tube de mélange est de préférence de 0,1 à 0,5 Mpa, de préférence encore de 0,2 à 0,4 Mpa. En particulier, la pression du mélange en sortie du tube de mélange peut être de 0,1 à 0,2 Mpa, ou de 0,2 à 0,3 Mpa, ou de 0,3 à 0,4 MPa, ou de 0,4 à 0,5 MPa. De préférence, la différence de pression entre la pression du mélange en sortie du tube de mélange et la pression du fluide d'amidon injecté dans le tube de mélange vaut de 0,1 à 0,5 Mpa, de préférence de 0,2 à 0,4 Mpa. Cette différence de pression peut par exemple être de 0,1 à 0,2 Mpa, ou de 0,2 à 0,3 Mpa, ou de 0,3 à 0,4 Mpa, ou de 0,4 à 0,5 Mpa. De telles gammes de pression permettent une homogénéisation optimale du mélange vapeur d'eau/fluide d'amidon.

De préférence, le tuyau de sortie a la géométrie suivante :

- un diamètre nominal DN sur une longueur de tuyau de 50 à 200 mm après la sortie de fluide, puis

- un diamètre D1 valant de 1, 5 à 2,5 fois le diamètre DN sur une longueur de tuyau valant de 10 à 30 fois le diamètre DN, puis
- un diamètre D2 valant de 2 à 5 fois le diamètre DN.

Une telle géométrie permet de maîtriser la montée en viscosité engendrée par le gonflement des granules qui a lieu avant leur éclatement et ainsi de limiter les risques de détérioration et d'explosion du dispositif.

Le fluide d'amidon hydrolysé, de préférence non refroidi, peut ensuite être introduit dans une cuve. Le temps de résidence du fluide dans la cuve est de préférence de 1 à 4h. Cette étape, appelée dextrinisation, permet à l'enzyme contenu dans le fluide de continuer à hydrolyser l'amidon. Avantageusement, la dextrinisation est réalisée jusqu'à obtenir un dextrose équivalent (DE) de 12 à 14. Le DE est un indicateur d'hydrolyse de l'amidon. A DE = 0, l'amidon est intact. A DE = 100, l'amidon est totalement transformé en glucose. La méthode utilisée pour la mesure du DE est la méthode Lane-Eynon.

Le fluide d'amidon hydrolysé peut être utilisé en tant que substrat de fermentation, éventuellement après un ou plusieurs traitements supplémentaires.

Le procédé selon l'invention peut en particulier comprendre une étape d'introduction d'au moins une enzyme dans le fluide d'amidon hydrolysé. Cette étape est appelée « *saccharification* » et permet l'hydrolyse des dextrines en glucose. Dans le présent texte, le terme « *saccharification* » est utilisée pour désigner tout processus d'hydrolyse des dextrines en glucose, quel que soit le degré d'hydrolyse atteint ; l'étape de saccharification peut également être appelée « *pré-saccharification* » lorsque l'hydrolyse n'est pas complète ou quasi-complète.

De préférence, préalablement à l'introduction des enzymes, le fluide d'amidon hydrolysé est introduit dans une cuve.

La ou les enzymes introduites sont de préférence choisies dans le groupe constitué des glucosidases. De manière plus préférées, au moins 2 enzymes sont introduites dans le liquide d'amidon hydrolysé, de préférence encore au moins une α -1,4-glucosidase et une amylo- α -1,6-glucosidase sont introduites dans le liquide d'amidon hydrolysé. L' α -1,4-glucosidase hydrolyse les liaisons α -(1,4) impliquées dans les chaînes linéaires de glucose des dextrines ; l'enzyme amylo- α -1,6-glucosidase (appelée également « *enzyme débranchante* ») hydrolyse les liaisons impliquées dans les ramifications des chaînes. Avantageusement, le pH est ajusté à une valeur de 3,5 à 5,0, de préférence de 4,0 à 4,5. La température du milieu est de préférence fixée entre

50 à 70°C, de préférence entre 55 à 65°C. Ces conditions permettent un fonctionnement optimal des enzymes. La quantité d'enzymes introduites peut être de 0,2 à 0,6 kg par tonne de matière sèche d'amidon.

Dans des modes de réalisation, la durée de la saccharification vaut de 2 à 6h, de préférence de 3 à 4h (dans ces modes de réalisation, cette étape est plus particulièrement qualifiée de « *pré-saccharification* »).

Dans d'autres modes de réalisation, la durée de la saccharification vaut de 30 à 70h, de préférence de 40 à 60h. De manière avantageuse, la quantité de glucose dans le milieu après une telle étape de saccharification vaut de 90 à 99 % en poids, de préférence de 92 à 97% en poids. La quantité de glucose est déterminée selon la norme NF EN ISO 10504.

On obtient un milieu enrichi en glucose, utilisable en tant que substrat de fermentation, tel quel ou après d'éventuels traitements supplémentaires, par exemple de purification, en particulier de filtration et/ou de déminéralisation. Par « *milieu enrichi en glucose* », on entend un milieu dans lequel la concentration en glucose est supérieure à celle du fluide hydrolysé avant la saccharification.

De préférence, lorsque le substrat subi une étape de pré-saccharification de 2 à 6h, il n'est pas soumis à une purification ultérieure.

De préférence, lorsque le substrat subi une étape de saccharification de 30 à 70h, il subit au moins une étape de purification subséquente, de préférence une filtration et une déminéralisation, de préférence au moyen de résines d'échange d'ions.

Avantageusement, le procédé de préparation d'un substrat de fermentation selon l'invention génère une émission de gaz à effet de serre inférieure à 100 kg de CO₂ équivalent pétrole (CO₂eq) par tonne de graine de légumineuse utilisée, de préférence inférieure à 60 kg de CO₂eq par tonne de graine de légumineuse utilisée, plus préférentiellement inférieure à 40 kg de CO₂eq par tonne de graine de légumineuse utilisée (par exemple, le procédé de préparation d'un substrat de fermentation selon l'invention peut générer une émission de gaz à effet de serre de 0 à 20, ou de 20 à 30, ou de 30 à 40, ou de 40 à 50, ou de 50 à 60, ou de 60 à 80, ou de 80 à 100, kg de CO₂eq par tonne de graine de légumineuse utilisée). Les émissions de gaz à effet de serre peuvent être déterminée comme indiqué dans la section Exemples ci-dessous.

L'invention concerne également un substrat de fermentation obtenu par, ou susceptible d'être obtenu par un procédé de préparation tel que décrit ci-dessus.

Le substrat de fermentation selon l'invention comprend avantageusement une ou plusieurs des caractéristiques suivantes (en particulier lorsqu'il est obtenu par un procédé incluant une étape de pré-saccharification) :

- une quantité de protéine, par rapport au poids total de matière sèche du substrat, de 5 à 25 % en poids, de préférence de 15 à 20 % en poids, par exemple de 5 à 10 % en poids, ou de 10 à 15 % en poids, ou de 15 à 20 % en poids, ou de 20 à 25 % en poids ;
- une quantité de glucide, par rapport au poids total de matière sèche du substrat, de 40 à 80 % en poids, de préférence de 60 à 75 % en poids, par exemple de 40 à 50 % en poids, ou de 50 à 60 % en poids, ou de 60 à 70 % en poids, ou de 70 à 80 % en poids ;
- une quantité de matière grasse (lipides), par rapport au poids total de matière sèche du substrat, de 0,5 à 5 % en poids, de préférence de 0,5 à 3 % en poids, par exemple de 0,5 à 1 % en poids, ou de 1 à 2 % en poids, ou de 2 à 3 % en poids, ou de 3 à 4 % en poids, ou de 4 à 5 % en poids ;
- une quantité de fibre, par rapport au poids total de matière sèche du substrat, de 2 à 10 % en poids, de préférence de 3 à 6 % en poids, par exemple de 2 à 4 % en poids, ou de 4 à 6 % en poids, ou de 6 à 8 % en poids, ou de 8 à 10 % en poids.

Les quantités de protéine, glucide, matière grasse et fibre peuvent être déterminée comme indiqué ci-dessus.

Alternativement, substrat de fermentation selon l'invention peut avantageusement comprendre une ou plusieurs des caractéristiques suivantes (en particulier lorsqu'il est obtenu par un procédé incluant une étape de saccharification de de 30 à 70h) :

- une quantité de glucide, par rapport au poids total de matière sèche du substrat supérieure ou égale à 90 % en poids, de préférence supérieure ou égale à 95 % en poids ;
- une quantité de protéine, par rapport au poids total de matière sèche du substrat, inférieure ou égale à 500 ppm en poids, de préférence inférieure ou égale à 200 ppm en poids, plus préférentiellement inférieure ou égale à 100 ppm en poids ;
- une quantité de cendre (c'est-à-dire l'ensemble des minéraux, dont NaCl et CaCl₂), par rapport au poids total de matière sèche du substrat, inférieure ou égale à 200 ppm en poids, de préférence

inférieure ou égale à 100 ppm en poids, plus préférentiellement inférieure ou égale à 50 ppm en poids.

L'invention concerne également un procédé de fermentation comprenant la mise en contact d'un substrat de fermentation tel que décrit ci-dessus avec au moins un microorganisme. Le microorganisme est de préférence choisi dans le groupe constitué des levures, des bactéries et des combinaisons de ceux-ci.

Dans des modes de réalisation, le micro-organisme est mis en contact avec, en tant que substrat, un milieu enrichi en glucose (c'est-à-dire ayant subi l'étape de saccharification) tel que décrit ci-dessus. Pour cela, de préférence, le substrat est introduit dans une cuve et le microorganisme est ajouté dans la cuve. De manière préférée, le substrat a été refroidi à une température de 20 à 40°C, plus préférentiellement de 25 à 35°C, encore plus préférentiellement de 26 à 30°C préalablement à sa mise en contact avec le microorganisme.

Dans d'autres modes de réalisation, le micro-organisme, de préférence une ou plusieurs levures, est mis en contact avec, en tant que substrat, un fluide d'amidon hydrolysé (c'est-à-dire n'ayant pas subi l'étape de saccharification) tel que décrit ci-dessus. De préférence, le fluide d'amidon hydrolysé est préalablement refroidi à une température de 20 à 40°C, de préférence encore de 25 à 35°C, plus préférentiellement de 26 à 30°C. De préférence, le substrat est mis en contact avec le microorganisme et avec au moins une enzyme, plus préférentiellement au moins deux enzymes, de préférence choisie(s) dans le groupe constitué des glucosidases. De manière particulièrement préférée, le substrat est mis en contact avec le microorganisme et avec au moins une α -1,4-glucosidase et une amylo- α -1,6-glucosidase. Cette étape est appelée « *étape de propagation* ». De manière avantageuse, le substrat est introduit dans une cuve et le microorganisme et les enzymes sont ajoutés dans la cuve. Les quantités d'enzyme et le pH sont avantageusement tels que décrits ci-dessus en relation avec l'étape de saccharification.

L'invention concerne également un procédé de fermentation, ou un procédé de production d'un produit de fermentation, comprenant les étapes de :

- préparation d'un substrat de fermentation selon le procédé décrit ci-dessus ; et
- mise en contact du substrat de fermentation avec au moins un microorganisme.

L'étape de mise en contact du substrat de fermentation avec au moins un microorganisme peut être telle que décrite ci-dessus. Elle correspond à une étape de fermentation.

La mise en contact du substrat de fermentation avec le ou les microorganismes résulte avantageusement en l'obtention d'un produit de fermentation, en particulier tel que décrit ci-dessous.

L'invention concerne également un produit de fermentation obtenu par, ou susceptible d'être obtenu par un procédé de fermentation, ou de production d'un produit de fermentation, tel que décrit ci-dessus. De préférence, le produit de fermentation comprend (ou consiste en) au moins un composé choisi dans le groupe constitué des alcools, de préférence l'éthanol, des acides organiques, des acides aminés, des vitamines et des mélanges de ceux-ci.

De préférence, lorsque le produit de fermentation est ou comprend un composé choisi parmi les acides organiques, les acides aminés, les vitamines et les mélanges de ceux-ci, on utilise dans le procédé de fermentation (ou de production d'un produit de fermentation) un substrat ayant été préparé par un procédé comprenant une étape de saccharification de 30 à 70h.

De préférence, lorsque le produit de fermentation est ou comprend un composé choisi parmi les alcools, et est en particulier l'éthanol, on utilise dans le procédé de fermentation (ou de production d'un produit de fermentation) un substrat ayant été préparé par un procédé comprenant une étape de pré-saccharification ou on utilise en tant que substrat un fluide d'amidon hydrolysé (dans ce dernier cas, le procédé de fermentation ou de production d'un produit de fermentation comprend très préférentiellement une étape de propagation telle que décrite ci-dessus).

Exemples

Les exemples suivants illustrent l'invention sans la limiter.

Un procédé de production d'éthanol par fermentation utilisant un substrat préparé à partir de légumineuse (pois) selon l'invention a été comparé à un procédé de production d'éthanol par fermentation utilisant un substrat préparé à partir de céréale (blé) et à un procédé de production d'éthanol par fermentation utilisant un substrat préparé à partir de betterave.

Procédé de production d'éthanol à partir de betterave

Une fois récoltées, les betteraves sont rapidement transportées et transformées. Les betteraves sont ensuite lavées à l'eau afin d'éliminer toutes traces de terres, herbes ou rocaillles provenant de la récolte.

Sorties du lavoir les betteraves sont découpées en cossettes (dont la forme rappelle les frites). La taille des cossettes est de 5 à 6 cm de long pour 2 à 3 mm de large. Cette coupe se fait à l'aide d'un coupe racine de type Modèle 2000 – 600 – 60 de la société MAGUIN.

Les cossettes sont acheminées ensuite vers la diffusion, dans laquelle elles circulent à contre-courant avec de l'eau chaude à 80°C, dans laquelle les composés solubles de la betterave migrent pour donner un jus de diffusion sortant en tête de diffuseur. Les cossettes sortent en queue de diffuseur sous forme de pulpes et une partie de l'eau qu'elles contiennent est éliminée par pressage ou déshydratation pour être recyclée. Les pulpes peuvent être ensuite utilisées dans l'alimentation animale.

Le jus de diffusion subit ensuite une épuration par un traitement à la chaux vive aboutissant à la précipitation d'une partie des impuretés. La chaux vive est obtenue par calcination à 900°C de pierre de calcaire à raison de 4,6 kg de pierre par tonne de betterave. Le CO₂ produit pendant cette opération est par la suite utilisé dans le jus de diffusion afin de précipiter la chaux éteinte (Ca(OH)₂) en carbonate de calcium. Les impuretés et la chaux précipitées sont séparées du jus par filtration au moyen d'un filtre presse.

Le jus épuré contient 85 % d'eau en poids. Il est soumis à une évaporation afin d'être concentré, jusqu'à obtenir un sirop ayant une concentration en saccharose proche de la saturation, soit de 60 à 70 % en poids. L'évaporation a lieu dans un évaporateur à multiple effets, la pression étant abaissée d'effet en effet afin de réduire la température d'ébullition du jus concentré, ce qui permet d'éviter sa cuisson. La concentration du jus permet d'éviter la fermentation du sucre et de pouvoir ainsi stocker le jus avant qu'il soit acheminé dans l'atelier de distillerie.

L'étape de fermentation commence par la préparation de la pré-fermentation. Le sirop est dilué à 7 % en poids de sucre (saccharose) par ajout d'eau puis est introduit dans une cuve appelé pré-fermenteur avec une solution de levures *Saccharomyces cerevisiae*. La quantité de levures est de 6 g par tonne de sucre. De l'urée, à raison de 1,3 kg par tonne de sucre, est ajouté, ainsi que de l'acide nitrique afin de maintenir le pH entre 5,0 et 5,5. La température est ajustée entre 30 et 35°C. Le temps de résidence est fixé entre 4 et 5h et un flux continu d'air est injecté dans le milieu au moyen d'un diffuseur installé en bas de cuve.

Lorsque le degré d'alcool (notamment, éthanol) a atteint une valeur entre 6 et 8 % en poids (tel que mesuré à l'aide d'un densimètre), le moût dit faible est introduit dans une cuve de fermentation. Une solution de sucre de

concentration entre 20 et 25 % (moût fort) est ajoutée dans une proportion valant de 30 à 50 % en poids du moût faible. La fermentation alcoolique qui est exothermique continue tandis que la température est maintenue entre 30 et 35°C au moyen d'un échangeur de chaleur à plaques qui est lui-même relié à une tour de refroidissement. La fermentation a lieu pendant une durée entre 30 et 40h. Pendant cette fermentation, le pH a tendance à diminuer. Une solution d'hydroxyde de sodium est donc ajoutée au fil du temps afin de maintenir le pH entre 5,0 et 5,5. Lorsque la totalité du sucre est transformé en éthanol et dioxyde de carbone, le taux d'alcool dans le fermenteur est entre 10 et 14 % en poids.

Le moût de fermentation est ensuite soumis à une étape de distillation consistant à séparer la fraction alcool du moût de fermentation. Ce dernier est introduit au milieu d'une colonne de distillation sous vide contenant plusieurs plateaux pour ensuite tomber en bas de colonne. Le fluide est alors chauffé jusqu'au point d'ébullition du mélange eau et éthanol, à une température entre 82 et 85°C au moyen d'un échangeur thermique alimenté par de la vapeur provenant d'une chaudière. Les vapeurs d'alcool sont collectées en haut de colonne avec un degré d'alcool entre 93 et 95 % en poids.

Le distillat obtenu contient beaucoup d'impuretés telles que des composés volatils et d'autres types d'alcool tel le méthanol, et est donc purifié en passant par les différentes colonnes suivantes, qui prises ensemble forment l'étape de rectification :

- Colonne d'extraction : Dans la colonne, de l'eau est ajoutée au distillat provenant de la colonne de distillation. La différence de volatilité des composés présents dans le distillat permet de les séparer. Les composés très volatils et peu solubles dans l'eau sont entraînés vers le haut de la colonne, tandis que l'éthanol et le méthanol solubles dans l'eau sont entraînés en bas de colonne.
- Colonne de rectification : Le mélange alcool-eau provenant de la colonne d'extraction est à nouveau distillé jusqu'à atteindre quasiment le mélange azéotrope alcool/eau (97 % en poids d'alcool) en bas de colonne tandis que les impuretés seront collectées au haut de colonne (distillat). Les impuretés récupérées de la colonne précédente sont introduites dans ce distillat.
- Colonne de déméthylation : Cette colonne de grande taille et contenant un très grand nombre de plateau permet de séparer le méthanol et autres impuretés de l'éthanol. Le produit obtenu est dit

« *alcool surfin* ». Le résidu contenant le méthanol est mélangé avec les impuretés collectées de l'étape précédente.

- Colonne de tête : L'ensemble des impuretés provenant des colonnes précédentes sont passées sur cette colonne afin de les purifier pour produire les huiles de fusel. L'éthanol récupéré en bas de colonne est recyclé dans la colonne d'extraction ou la colonne de rectification afin d'améliorer le rendement de purification de l'éthanol. Les huiles de fusels sont collectées en haut de colonne.

L'ensemble des opérations de la rectification font appel au procédé de séparation liquide par fractionnement par vaporisation-condensation.

Lors de l'étape de distillation, un résidu non soluble est collecté avec l'eau non évaporée. Ce résidu est appelé vinasse. La matière sèche est d'environ 6 % en poids. Cette matière sèche étant trop faible, le résidu est introduit dans un évaporateur tubulaire à flux tombant. L'évaporation se fait sous vide (0,02 MPa de pression) avec injection de vapeur. La matière sèche final du résidu est de 30 à 35 % en poids. La vinasse concentrée peut être utilisée en agriculture, en particulier pour la préparation d'un amendement.

Pour une unité de production d'éthanol, la quantité de CO₂ équivalent pétrole (CO₂eq) a été estimée. La quantité de CO₂ équivalent pétrole représente l'ensemble des émissions de gaz à effet de serre (incluant aussi le protoxyde d'azote, le méthane, etc., en plus du CO₂). Son calcul est effectué à l'aide de « *facteurs d'émissions* » dont les valeurs sont obtenues à partir des bases de données suivantes :

- EUROPEAN COMMISSION : Note on the conducting and verifying actual calculations of the GHG emission savings, 2015 ;
- INSTITUT FÜR ENERGIE- UND UMWELTFORSCHUNG HEIDELBERG (IFEU) : Biograce. Harmonized calculations of biofuel greenhouse gas emissions in Europe. – www.biograce.net ;
- BUNDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT UND ERNÄHRUNG (BLE): Leitfaden Nachhaltige Biomasseherstellung, 1^{ère} Edition, Bonn, 2010 ;
- IINAS INTERNATIONALES INSTITUT FÜR NACHHALTIGKEITSANALYSEN UND -STRATEGIEN, ÖKO-INSTITUT E. V. INSTITUT FÜR ANGEWANDTE ÖKOLOGIE E.V., Gemis, 2014.

Les résultats pour le procédé de production d'éthanol à partir d'un substrat issu de betterave décrit ci-dessus sont présentés dans le tableau ci-

dessous. La production d'éthanol est de 88830 t/an (à partir de 1189256 t de betterave. Le CO₂eq émis lors de l'extraction du sucre est attribué à raison de 94 % en poids aux production et traitement du jus sucré et à raison de 6 % en poids à la production de la pulpe (ce qui est indiqué sous la mention « *rendement considéré* » dans le tableau ci-dessous).

[Table 1]

	Quantité (A)	Facteur d'émission (kg CO ₂ eq/unité) (B)	kg CO ₂ eq (A x B)
Emissions agricoles			
Semence (kg/Ha/an)	6	3,54	366828
Fertilisant azotés (kg/Ha/an)	119,7	5,88	12155695
Fertilisant P2O5 (kg/Ha/an)	59,7	1,01	1041268
Fertilisant K2O (kg/Ha/an)	134,9	0,58	1351289
Fertilisant CaO (kg/Ha/an)	400	0,13	898073
Pesticides (kg/Ha/an)	1,3	10,97	16703745
Protoxyde d'azote (kg CO2eq/kg N)	119,7	8,08	16703745
Diesel (agriculture) (L/Ha/an)	175,9	3,14	9539021
Diesel (transport) (L/Ha/an)	67	3,14	10424820
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol) Rendement considéré : 94 %	558		
Emissions extraction du sucre			
Gaz naturel (Mj/an)	442377866	0,067	29639317
Electricité (kW/an)	17856000	0,61	10892160

produite par centrale à charbon			
Pierre calcaire (kg/an)	54985000	0,00972	534454
Eau (kg/an)	507018000	0,0004	202807
Traitement de l'eau (kg/an)	763269000	0,00027	206083
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol)	439		
Emissions production éthanol			
Gaz naturel (Mj/an)	731256874	0,067	48994211
Electricité (kW/an)	30153046	0,61	18393358
Acide nitrique à 65 % en poids (kg/an)	144324	1,89	272772
Hydroxyde de sodium à 50 % en poids (kg/an)	731600	0,47	343852
Levures (kg/an)	1193	3,2	3818
Urée (kg/an)	366268	0,81	296677
Eau (kg/an)	137514574	0,0004	55006
Traitement de l'eau (kg/an)	212241923	0,00027	57305
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol)	770		
Procédé total			
Total (kg CO₂eq/t éthanol)	1767		
Total (kg CO₂eq/t éthanol) sans la vinasse	990		

La quantité totale de CO₂eq calculée pour le procédé total se répartit de la manière suivante : 56 % en poids du total est alloué à la production d'éthanol et 44 % en poids du total est allouée à la production du co-produit vinasse. La part des émissions de gaz à effet de serre correspondant à la production

d'éthanol uniquement est indiquée dans le tableau ci-dessus à la ligne « *Total (kg CO₂eq/t éthanol) sans la vinasse* ».

Procédé de production d'éthanol à partir de blé.

Les grains de blé sont récoltés. Contrairement à la betterave, le blé récolté peut être stocké et gardé pendant plusieurs mois. A son arrivée au site industriel, le blé est d'abord nettoyé afin de retirer les pierres et résidus végétaux provenant de la récolte.

Le blé nettoyé est alors broyé au moyen d'un broyeur à compression de type broyeur à cylindres (roller-mill), puis tamisé afin de séparer le son (pellicule du blé) de la farine (poudre de l'amande). Ces étapes jusqu'à la collecte de la farine sont effectuées à sec et à température ambiante.

La farine est ensuite mise en suspension dans de l'eau de manière à avoir une teneur massique en matière sèche entre 25 et 35 %. Le fluide ainsi obtenu est introduit dans une cuve de 80 m³ équipée de cannes d'injection de vapeur. Dans le même temps est ajoutée une enzyme de type alpha amylase (maxamyl HT) en une quantité entre 0,2 et 0,6 kg par tonne de farine. Le pH est ajusté entre 5,0 et 6,5 par ajout d'acide sulfurique. L'injection de vapeur dans le fluide est opérée à l'aide des cannes d'injection jusqu'à ce que le fluide atteigne une température entre 90 et 95°C. Cette température permet à l'eau de s'introduire dans les granules d'amidon jusqu'à l'éclatement de la membrane protectrice des granules. L'amidon libéré dans le fluide est alors hydrolysé par l'enzyme. Le temps de résidence est compris entre 4 et 5h afin que l'amidon soit suffisamment coupé en chaînes de dextrines.

Le moût hydrolysé est envoyé dans une cuve agitée de 50 m³ et l'enzyme Deltazyme GA LE-5, contenant une glucosidase alpha 1-4 et une glucosidase alpha 1-6, est ajoutée pour effectuer la saccharification. Le temps de résidence dans la cuve est de 2h.

Les étapes suivantes (fermentation, distillation et rectification) sont identiques à celles décrites ci-dessus pour le procédé de production d'éthanol à partir de betterave.

La quantité de CO₂ équivalent pétrole émise par le procédé a été estimée comme indiqué ci-dessus et les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. La production d'éthanol est de 23887 t/an (à partir de 80235 t de blé). Le CO₂eq émis jusqu'à l'étape de saccharification (non comprise) est attribuée à raison de 84% aux production et traitement de la farine et à raison de 16% à la production des fibres (le son) (ce qui est indiqué sous la mention « *rendement considéré* » dans le tableau ci-dessous).

[Table 2]

	Quantité (A)	Facteur d'émission (kg CO ₂ eq/unité) (B)	kg CO ₂ eq (A x B)
Emissions agricoles			
Culture du blé (t/an)	80235	300	24070500
Diesel (transport) (L/Ha/an)	15	3,14	539867
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol) Rendement considéré : 84 %	865		
Emissions production substrat de fermentation			
Electricité (kW/an) produite par centrale nucléaire	4477249	0,04	179090
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol)	439		
Emissions production éthanol			
Gaz naturel (Mj/an)	351254862	0,067	23534076
Electricité (kW/an)	12241584	0,04	489663
Acide sulfurique à 96 % en poids (kg/an)	1730122	0,21	363326
Hydroxyde de sodium à 50 % en poids (kg/an)	157204	0,47	73886
Levures (kg/an)	856	3,2	2739
Ammoniac à 24 % en poids (kg/an)	12755	2,7	234439
Eau (kg/an)	226800000	0,0004	90720
Traitement de l'eau (kg/an)	239400000	0,00027	64638
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol)	1032		

Procédé total	
Total (kg CO₂eq/t éthanol)	1904
Total (kg CO₂eq/t éthanol) sans la vinasse	1066

La quantité totale de CO₂eq calculée pour le procédé total se répartit de la manière suivante : 56 % en poids du total est alloué à la production d'éthanol et 44 % en poids du total est allouée à la production du co-produit vinasse. La part des émissions de gaz à effet de serre correspondant à la production d'éthanol uniquement est indiquée dans le tableau ci-dessus à la ligne « *Total (kg CO₂eq/t éthanol) sans la vinasse* ».

Procédé de production d'éthanol à partir de pois.

Une fois récoltés, les pois sont dépelliculés par broyage au moyen d'un broyeur pendulaire utilisant la force de compression, puis les particules produites sont passées sur un tamis afin séparer les pellicules d'une taille inférieur à 500 µm des pellicules d'une taille supérieur ou égale à 500 µm.

Les particules sélectionnées (inférieures à 500 µm) sont ensuite soumises à une étape de micronisation à l'aide d'un broyeur utilisant la force d'impact (de manière à atteindre un diamètre médian en volume (D50) des particules inférieur ou égal à 30 µm). A la sortie du broyeur, la farine obtenue est introduite dans des turbo-cyclones avec sélecteur alimentés par un débit d'air permettant d'activer un effet cyclonique, afin de séparer les particules selon leur densité. Les particules légères (appelées fraction protéine), ayant un D50 de 1 à 5 µm, sont entraînées vers le haut du cyclone tandis que les particules plus lourdes, ayant un D50 de 10 à 30 µm, sont entraînées vers le bas.

La fraction lourde (appelée fraction amidon) est récupérée et mélangée à de l'eau de manière à atteindre un fluide ayant une teneur massique en matière sèche d'environ 30 %. Le pH est ajusté entre 4,0 et 6,0 par de l'acide sulfurique puis une enzyme de type alpha amylase (maxamyl HT) est ajoutée au fluide en une quantité de 0,3 à 0,5 kg par tonne de matière sèche d'amidon.

Afin de provoquer l'éclatement des granules d'amidon qu'il contient, le fluide est ensuite chauffé à 100°C par injection directe de vapeur en mode continu dans un « jet-cooker » (ou cuiseur) de type Hydro-thermal K510. (pression du fluide comprenant les granules d'amidon : 0,6.MPa ; pression de la vapeur d'eau : 0,9Mpa ; pression du mélange fluide/vapeur en sortie du jet-cooker : 0,25 Mpa).

Le fluide est ensuite soumis à une étape de dextrinisation : pour cela, le fluide non refroidi est placé dans une cuve de 30 m³ pendant une durée de 4h Le fluide refroidi à 60°C est ensuite introduit dans une autre cuve pour subir une étape de pré-saccharification. Une α-1,4-glucosidase et une amylo-α-1,6-glucosidase (Deltazyme GA LE-5) sont introduites dans le fluide en une quantité de 0,3 kg par tonne de matière sèche d'amidon, et le pH est ajusté à une valeur entre 4,0 et 4,5 par de l'acide sulfurique. Le fluide est laissé dans la cuve pendant une durée de 3h.

Les étapes suivantes (fermentation, distillation et rectification) sont identiques à celles décrites ci-dessus pour le procédé de production d'éthanol à partir de betterave à l'exception du fait que la colonne de distillation n'est pas chauffée par un échangeur thermique alimenté par de la vapeur provenant d'une la chaudière mais par les buées de l'évaporateur utilisé pour concentrer la vinasse, recomprimées à l'aide d'un re-compresseur mécanique. L'énergie utilisé est dans ce cas de l'électricité et non du gaz.

La quantité de CO₂ équivalent pétrole émise par le procédé a été estimée comme indiqué ci-dessus et les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous. La production d'éthanol est de 7465 t/an (à partir de 32982 t de blé). Le CO₂eq émis jusqu'à l'étape de pré-saccharification (non comprise) est attribuée à raison de 67,2 % en poids aux production et traitement de la fraction amidon, à raison de 24 % en poids à la production de la fraction protéine, et à raison de 8,8 % à la production de fibres (pellicule) (ce qui est indiqué sous la mention « *rendement considéré* » dans le tableau ci-dessous).

[Table 3]

	Quantité (A)	Facteur d'émission (kg CO ₂ eq/unité) (B)	kg CO ₂ eq (A x B)
Emissions agricoles			
Culture du pois (t/an)	32982	200	6596400

Engrais azoté évité	32982	-189	-6233598
Diesel (transport) (L/Ha/an)	6,3	3,14	163112
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol) Rendement considéré de 67,2 %	70		
Emissions production substrat de fermentation			
Electricité (kW/an) produite par centrale nucléaire	6523100	0,04	260924
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol)	35		
Emissions production éthanol			
Gaz naturel (MJ/an)	78659000	0,067	5270153
Electricité (kW/an)	4116000	0,04	164640
Acide sulfurique à 96 % en poids (kg/an)	39900	0,21	8379
Hydroxyde de sodium à 50 % en poids (kg/an)	47161	0,47	22166
Levures (kg/an)	256	3,2	819
Ammoniac à 24 % en poids (kg/an)	38068	2,7	102784
Eau (kg/an)	67200000	0,0004	26880
Traitement de l'eau (kg/an)	84000000	0,00027	22680
Sous-total (kg CO₂eq/t éthanol)	753		
Procédé total			
Total (kg CO₂eq/t éthanol)	858		

Total (kg CO₂eq/t éthanol) sans la vinasse	481
--	------------

La quantité totale de CO₂eq calculée pour le procédé total se répartit de la manière suivante : 56 % en poids du total est alloué à la production d'éthanol et 44 % en poids du total est allouée à la production du co-produit vinasse. La part des émissions de gaz à effet de serre correspondant à la production d'éthanol uniquement est indiquée dans le tableau ci-dessus à la ligne « *Total (kg CO₂eq/t éthanol) sans la vinasse* ».

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (sont considérées les parts des émissions attribuées à la production d'éthanol uniquement) :

[Table 4]

	kg d'équivalent CO ₂ émis par tonne d'éthanol produit		
	Procédé blé (comparatif)	Procédé betterave (comparatif)	Procédé pois (invention)
Procédé jusqu'à la distillation (non comprise)	488	559	60
Procédé à partir de la distillation	578	431	421
Total	1066	990	481

On constate que le procédé de production d'éthanol selon d'invention émet beaucoup moins de gaz à effet de serre que les procédés comparatifs utilisant un substrat préparé à partir de céréale et de betterave.

De plus, en ce qui concerne le procédé jusqu'à la distillation, le procédé selon l'invention produit de très faibles émissions de gaz à effet de serre.

Revendications

1. Procédé de préparation d'un substrat de fermentation, comprenant les étapes suivantes :
 - la fourniture d'au moins une graine de légumineuse comprenant de l'amidon et des protéines ;
 - la micronisation de ladite au moins une graine, de manière à obtenir une fraction micronisée ;
 - la purification de la fraction micronisée, de manière à collecter une fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine ;
 - le mélange de la fraction enrichie en amidon et appauvrie en protéine avec un liquide, de manière à former un fluide d'amidon ; et
 - l'hydrolyse de l'amidon par mélange de vapeur d'eau avec le fluide d'amidon , de manière à obtenir un fluide d'amidon hydrolysé.
2. Procédé selon la revendication 1, comprenant en outre une étape d'introduction dans le fluide d'amidon hydrolysé d'au moins une enzyme choisie dans le groupe constitué des glucosidases, de préférence d'au moins deux enzymes choisies dans le groupe constitué des glucosidases, plus préférentiellement d'au moins une α -1,4-glucosidase et une amylo- α -1,6-glucosidase.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, comprenant en outre une étape d'introduction dans le fluide d'amidon d'au moins une enzyme choisie dans le groupe constitué des saccharidases, de préférence une α -amylase.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel la graine de légumineuse comprend une pellicule, et dans lequel le procédé comprend une étape de dépelliculage de la graine préalablement à la micronisation.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel la purification de la fraction micronisée comprend une étape de

séparation aéraulique, de préférence au moyen d'un cyclone avec sélecteur.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel l'hydrolyse de l'amidon est effectuée à l'aide d'un dispositif d'injection directe de vapeur en mode continu.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel la légumineuse est choisie dans le groupe des haricots, des pois, des fèves, des lentilles, des pois chiches et des mélanges de ceux-ci.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, générant une émission de gaz à effet de serre inférieure à 100 kg de CO₂ équivalent pétrole par tonne de graine de légumineuse utilisée, de préférence 60 kg de CO₂ équivalent pétrole par tonne de graine de légumineuse utilisée.
9. Substrat de fermentation obtenu par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8.
10. Procédé de fermentation comprenant la mise en contact d'un substrat de fermentation selon la revendication 9 avec au moins un microorganisme.
11. Procédé de production d'un produit de fermentation, comprenant les étapes suivantes :
 - la préparation d'un substrat de fermentation selon le procédé selon l'une des revendications 1 à 8 ; et
 - la mise en contact dudit substrat de fermentation avec au moins un microorganisme, de manière à obtenir un produit de fermentation.
12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel le produit de fermentation comprend au moins un composé choisi dans le groupe constitué des alcools, de préférence l'éthanol, des acides organiques, des acides aminés, des vitamines et des mélanges de ceux-ci.

13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, dans lequel le microorganisme est choisi dans le groupe constitué des levures, des bactéries et des combinaisons de ceux-ci.
14. Produit de fermentation obtenu par un procédé selon l'une des revendications 10 à 13.
15. Produit de fermentation selon la revendication 14, comprenant au moins un composé choisi dans le groupe constitué des alcools, de préférence l'éthanol, des acides organiques, des acides aminés, des vitamines et des mélanges de ceux-ci.