



HAL
open science

Modélisation de l'hydrolyse enzymatique de substrats lignocellulosiques par bilan de population

Noureddine Lebaz

► **To cite this version:**

Noureddine Lebaz. Modélisation de l'hydrolyse enzymatique de substrats lignocellulosiques par bilan de population. Biotechnologies. INSA de Toulouse, 2015. Français. NNT : 2015ISAT0030 . tel-01307913

HAL Id: tel-01307913

<https://theses.hal.science/tel-01307913v1>

Submitted on 27 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Discipline ou spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par Nouredine LEBAZ

Le 26/10/2015

Titre : *Modélisation de l'hydrolyse enzymatique de substrats lignocellulosiques par bilan de population*

JURY

Paul COLONNA	Directeur de l'Institut Carnot 3BCar	Président du Jury
François PUEL	Professeur, Ecole Centrale de Paris	Rapporteur
Alain RAPAPORT	Directeur de recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
Marc MAESTRACCI	R&D, ADISSEO	Invité
Mathieu SPERANDIO	Professeur, INSA Toulouse	Directeur de thèse
Jérôme MORCHAIN	Maitre de conférences, HDR, INSA Toulouse	Co-directeur de thèse
Arnaud COCKX	Maitre de conférences, HDR, INSA Toulouse	Co-directeur de thèse

Ecole doctorale : Mécanique, Energétique, Génie civil & Procédés (MEGeP)

Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques
et des Procédés (LISBP)

Directeur(s) de Thèse : Mathieu Spérandio, Jérôme Morchain et Arnaud Cockx

Rapporteurs : François Puel et Alain Rapaport

Quand je regarde en arrière, je n'ai nul regret, je n'aurai pas voulu vivre autrement ... De toutes façons, un fantasme n'est jamais que cela. Je ne me dis pas : J'aurais voulu être un citoyen d'Athènes au temps de Périclès, ni un citoyen de Grenade sous les Abencérages, ni un bourgeois de la Vienne des valse. Je suis né dans un canton écarté de haute montagne, d'une vieille race qui, depuis des millénaires n'a pas cessé d'être là, avec les uns, avec les autres ... qui, sous le soleil ou la neige, à travers les sables garamantes ou les vieilles cités du Tell, a déroulé sa saga, ses épreuves et ses fastes, qui a contribué dans l'histoire, de diverses façons, à rendre plus humaine la vie des hommes.

Les tenants d'un chauvinisme souffreteux peuvent aller déplorant la trop grande ouverture de l'éventail : Hannibal a conçu sa stratégie en punique ; c'est en latin qu'Augustin a dit la cité de Dieu, en arabe qu'Ibn Khaldoun a exposé les lois des révolutions des hommes. Personnellement, il me plaît de constater dès le début de l'histoire cette ample faculté d'accueil. Car il se peut que les ghettos sécurisent, mais qu'ils stérilisent c'est sûr.

C'est par là que je voudrais finir. Ceux qui, pour quitter la scène, attendent toujours d'avoir récité la dernière réplique à mon avis se trompent : il n'y a jamais de dernière réplique - ou alors chaque réplique est la dernière - on peut arrêter la noria à peu près à n'importe quel godet, le bal à n'importe quelle figure de la danse. Le nombre de jours qu'il me reste à vivre, Dieu seul le sait. Mais quelque soit le point de la course où le terme m'atteindra, je partirai avec la certitude chevillée que quelque soient les obstacles que l'histoire lui apportera, c'est dans le sens de sa libération que mon peuple - et avec lui les autres - ira. L'ignorance, les préjugés, l'inculture peuvent un instant entraver ce libre mouvement, mais il est sûr que le jour inévitablement viendra où l'on distinguera la vérité de ses faux semblants. Tout le reste est littérature.

Mouloud Mammeri (1917-1989)

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP, UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792). Je tiens donc à remercier Nic Lindley, directeur du LISBP, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Mes remerciements vont aussi à *Toulouse White Biotechnology* (TWB, UMS INRA/INSA/CNRS), à sa tête le Pr. Pierre Monsan, pour le financement et le suivi de ce projet.

Je remercie très sincèrement Paul Colonna, directeur de l'institut Carnot 3BCar, de m'avoir fait l'honneur d'être le président du jury.

Mes remerciements vont ensuite à François Puel, professeur à l'Ecole Centrale de Paris, et à Alain Rapaport, directeur de recherche INRA à SupAgro Montpellier pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, pour leur lecture attentive de ce mémoire et leurs remarques pertinentes.

J'adresse également mes remerciements à Marc Maestracci, R & D Adisseo, pour le suivi du travail, la lecture du manuscrit et toutes les remarques constructives.

Ces travaux de recherche ont été menés sous la direction d'Arnaud Cockx, Mathieu Spérandio et Jérôme Morchain. Je tiens ici à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre confiance, votre disponibilité, votre patience, vos conseils et tout cela toujours dans la bonne humeur. J'ai eu beaucoup de chance de travailler avec un trio aussi brillant et dynamique. Merci Arnaud pour tes conseils, tes idées très originales et la vue d'ensemble que tu avais du projet et de ses retombées. Merci Mathieu pour le suivi, tes remarques très judicieuses et ton aide précieuse notamment pour le côté expérimental, on a toujours quelques chose à apprendre avec toi. Jérôme, tu as été magistral durant cette thèse. En m'attaquant à la modélisation, je ne pensais pas tomber sur quelqu'un avec autant de patience et de gentillesse. Merci pour ton soutien, tes encouragements, tes idées intarissables et ton implication avec beaucoup de passion. Merci aussi pour tous les moments inoubliables que nous avons partagé à Lyon, Nice, San Diego et Los Angeles. Chapeau bas mes chefs!

Je remercie également le Professeur Alain Liné pour toutes les discussions et son aide précieuse sur les bilans de population.

Dans tout travail comportant une partie expérimentale, le soutien de l'équipe technique est salvateur. Ainsi, je tiens à remercier José, Bernard, Mansour, Manon, Nathalie et Aurore pour le temps qu'ils m'ont consacré aussi bien sur la partie recherche que pour les enseignements.

J'ai eu la chance de travailler dans deux équipes du LISBP à savoir TIM et SYM-BIOSE. Je remercie l'ensemble du personnel de ces équipes pour leur soutien, les discussions, les animations scientifiques et les moments partagés. Merci à Maria Aurora Fernandez, Jean-Stéphane Pic, Stéphane Mathe et Nicolas Dietrich pour leur aide sur la partie enseignement.

J'ai croisé beaucoup de monde pendant ces trois années d'intense activité. Je souhaite remercier les aînés qui m'ont accueilli dans la "firme des geeks" : Mélanie, Mélody, Alexandre et Lucie ; ceux et celles avec qui j'ai commencé cette aventure : Robin, David B., Claire, Mathias, Mourad, Adèle, Lucas et Anil ; et ceux et celles qui sont arrivés plus tard : David L., Naïla, Elsa, Maxime, Lucie, Florence, Ana, Alan, Paul, Angélica et Noémie. Mes remerciements vont également à Daniel, Lucia, Loïc, Aurélie, Manel, Inès, Zaïneb, Mathieu et Matthieu. J'en oublie certainement : que tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à cette aventure trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes pensées vont aussi à mes amis de longue date, ceux que j'ai côtoyé sur les bancs de l'école et qui sont à présent éparpillés un peu partout. Je les remercie chaleureusement pour les moments partagés même si les retrouvailles s'espacent de plus en plus.

Enfin, je ne saurais oublier ma famille au sens large ; mes grands-parents, mes parents, mes frères et sœurs en particulier pour leur soutien depuis si longtemps. Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection.

Résumé

L'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique est une voie prometteuse pour la bioconversion des matières végétales en sucres fermentescibles en vue de la production du bioéthanol de seconde génération. En général, des cocktails enzymatiques contenant différentes familles d'activités, caractérisées par des modes d'action différents, sont utilisés comme biocatalyseurs. L'essentiel des travaux de modélisation de ce procédé abordent la question via des approches cinétiques où les aspects particuliers et dynamique d'évolution des propriétés du substrat/biocatalyseur/système ne sont pas pris en compte. De plus, ce type de modèles, visant à reproduire les cinétiques de production des sucres simples, traite uniquement le cas de la mise en contact simultanée des enzymes et de la matière à hydrolyser (substrat). Dès lors, les questions relatives au design/optimisation du procédé telles que le mode d'alimentation (batch/continu) ou l'ajout séquentiel des enzymes et/ou du substrat ne peuvent pas être abordées avec ces modèles. Dans ce travail, une approche de modélisation par le formalisme du bilan de population est proposée. Le modèle est basé sur une hétérogénéité structurale du substrat à savoir la distribution de taille des chaînes/particules. Comme première approche numérique, la méthode des classes est utilisée dans le cas de l'hydrolyse de chaînes polymères subissant des attaques endoglucanases (rupture aléatoire) et exoglucanases (coupure d'un dimère en bout de chaîne). En deuxième lieu, la méthode des moments a été adoptée pour traiter du cas d'un substrat particulaire. Ici la rupture s'opère sous l'effet des contraintes hydrodynamiques tandis que l'hydrolyse enzymatique modifie la cohésion des particules. Par ailleurs, la nécessité de confronter les résultats numériques issus de la méthode des moments avec les distributions expérimentales a motivé un travail sur les méthodes de reconstruction des distributions à partir de leurs moments. Parallèlement à ce travail de modélisation, plusieurs métrologies nécessaires à la caractérisation de ces systèmes ont été mises en œuvre. Trois techniques granulométriques (Morpho-granulométrie, Focused Beam Reflectance Measurement Technique (FBRM) et Granulométrie laser) ont été utilisées pour accéder à l'évolution de la distribution de taille des particules au cours de l'hydrolyse d'une cellulose microcristalline (Avicel). De plus, les concentrations en sucres réducteurs et en sucres simples (glucose et cellobiose) ont été mesurées.

Les modélisations proposées combinent ainsi les aspects de cinétique homogène et de catalyse hétérogène. Intégrées dans une approche de type bilan de population multivariable, elles permettent d'accéder à l'évolution de la distribution de taille des chaînes/particules du substrat ainsi qu'aux cinétiques de conversion en sucres simples.

Abstract

The enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass is a promising approach for the bioconversion of organic matter into fermentable sugars aiming ultimately to produce second generation biofuel. Globally, enzymatic cocktails, containing different activities which are characterized by their specific mechanisms, are used as biocatalysts. Most of the studies devoted to the modelling of this process address the problem via kinetic approaches in which the particulate aspects and the dynamic evolution of the properties of the substrate/biocatalyst/system are not taken into account. Moreover, such models aim to reproduce the kinetics of release of simple sugars and treat only the case where the enzymes and the substrate are simultaneously mixed at the beginning of the hydrolysis reaction. Therefore, issues related to the design/optimization of the process such as the supplying mode (batch/continuous) and the sequential adding of the enzymes/substrate cannot be addressed with these models. In this work, a population balance formalism is proposed as modelling approach. The model is based on a structural heterogeneity of the substrate namely the chain/particle size distribution. As a first numerical approach, the method of classes is used in the case of polymer chains undergoing endoglucanase (random breakage) and exoglucanase (chain-end scission) attacks. Secondly, the method of moments is adopted to solve the same problem and then adapted to the case of a particulate substrate by introducing the particle cohesion effect which depends on the enzymatic attacks as well as on the hydrodynamic shear stress. Finally, the confrontation of the numerical results from the method of moments to the experimental distributions motivated the development of reconstruction methods in order to restore distributions from a finite sequence of their moments. Alongside this modelling work, the suitable metrology has been developed for the characterization of these systems. Three different granulometric techniques (MorphoGranulometry, Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM) technique and Laser Diffraction Particle Size Analysis) are used to reach the time-evolution of the particle size distribution of microcrystalline cellulose (Avicel). In this context, numerical tools used for the analysis and the comparison of the different experimental distributions are proposed. In addition, the concentrations of reducing and simple sugars (glucose and cellobiose) are measured all along the hydrolysis reactions.

The modeling of enzymatic hydrolysis developed here combines the concepts of homogeneous and heterogeneous catalysis. Integrated into the framework of multivariable population balance model, these allow the chain/particle size distribution evolution during the reaction and the kinetics of simple sugars release to be predicted.

Table des matières

Remerciements	iii
Résumé	vi
Sommaire	xv
Table des figures	xxi
Liste des tableaux	xxiii
Liste des symboles	xxxix
Introduction générale	1
I Revue Bibliographique	7
I.1 Hydrolyse enzymatique de la lignocellulose	7
I.2 Facteurs limitants liés au substrat	8
I.2.1 Composition chimique du substrat	9
I.2.1.1 Répartition de la lignine	9
I.2.1.2 Répartition de l'hémicellulose	10
I.2.2 Structure/morphologie du substrat	10
I.2.2.1 Le degré de polymérisation	11
I.2.2.2 Le taux de cristallinité	11
I.2.2.3 L'accessibilité	12
I.2.2.4 La surface spécifique / taille des particules	13
I.3 Facteurs liés au biocatalyseur	15

I.3.1	Activité et synergie du cocktail enzymatique	16
I.3.2	Adsorption des enzymes	17
I.3.3	Inhibition des cellulases	18
I.3.4	Désactivation des cellulases	20
I.4	Facteurs liés aux conditions opératoires	21
I.5	Conclusion	21
I.6	Outils de caractérisation	22
I.6.1	Outils analytiques	23
I.6.1.1	Sucres réducteurs	23
I.6.1.2	Sucres simples	24
I.6.2	Caractérisation physique et physico-chimique du substrat	24
I.6.2.1	Composition du substrat	24
I.6.2.2	Degré de polymérisation et distribution de taille	26
I.6.2.3	Cristallinité	28
I.7	Approches de modélisation	30
I.7.1	Approches cinétiques	30
I.7.1.1	Modèles empiriques	31
I.7.1.2	Modèles de Michaelis-Menten	31
I.7.1.3	Modèles prenant en compte l'adsorption	34
I.7.2	Approches mécanistiques	37
I.7.2.1	Modèles de chaînes polymères	37
I.7.2.2	Modèles à cœur rétrécissant	38
I.7.2.3	Modèles stochastiques	38
I.7.2.4	Modèles de bilan de population	38
I.8	Synthèse, position du problème et objectif de l'étude	40
II	Matériel et méthodes expérimentales	45
II.1	Dispositif expérimental	45
II.2	Substrats et enzymes	47
II.2.1	Substrats	47
II.2.2	Enzymes	47
II.3	Analyses biochimiques	47
II.3.1	Dosage des sucres réducteurs	48

II.3.2	Dosage des sucres simples	48
II.4	Analyses physiques	49
II.4.1	Rappels théoriques	49
II.4.1.1	Taille d'une particule	49
II.4.1.2	Distribution de taille	49
II.4.2	Morpho-granulométrie optique	51
II.4.3	La granulométrie par diffraction laser	52
II.4.4	Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)	53
II.4.5	Comparaison des trois techniques	54
II.5	Synthèse	56
III	Analyse de la modélisation classique	59
III.1	Modélisation de l'hydrolyse enzymatique par une approche cinétique	59
III.2	Base de données expérimentales	61
III.3	Analyse des données expérimentales	62
III.4	Identification des paramètres	67
III.5	Exemple de la littérature	71
III.6	Synthèse et conclusion	73
IV	Outils et méthodes numériques	77
IV.1	Le formalisme du bilan de population	77
IV.1.1	Généralités	77
IV.1.2	La fonction densité en nombre	78
IV.1.3	L'équation générale du bilan de population	79
IV.1.4	Terme source dans le cas de l'hydrolyse	80
IV.2	Méthodes de résolution	81
IV.2.1	Méthode des classes	82
IV.2.1.1	Technique des pivots fixes	84
IV.2.1.2	Technique des pivots glissants	87
IV.2.2	Méthode des moments	89
IV.2.2.1	Méthode de quadrature des moments (QMOM)	90
IV.2.2.2	Méthode de quadrature des moments directe (DQMOM)	91
IV.2.3	Reconstruction d'une distribution à partir de ses moments	93

IV.2.3.1	Méthode des splines	95
IV.2.3.2	Méthode de reconstruction pas la fonction densité de noyau bêta	98
IV.2.3.3	Méthode du maximum d'entropie	101
IV.3	Validation numérique des méthodes de résolution du BP	102
IV.3.1	Résolution analytique de l'équation de BP	102
IV.3.2	Validation de la méthode des classes	104
IV.3.3	Validation de la méthode des moments	105
V	Résultats	107
V.1	Résultats numériques dans le cas d'un substrat soluble	107
V.1.1	Résolution par la méthode des classes	107
V.1.1.1	Introduction	108
V.1.1.2	<u>Article 1</u> : Population balance approach for the modelling of enzymatic hydrolysis of cellulose	109
V.1.1.3	Conclusion sur la méthode des classes	133
V.1.2	Résolution par la méthode des moments	134
V.1.2.1	Reconstruction des PDFs à partir des moments	134
V.1.2.2	<u>Article 2</u> : Reconstruction of a distribution from a finite number of its moments : a comparative study in the case of depolymerization process	136
V.1.2.3	Conclusion sur la reconstruction	165
V.1.2.4	Méthode DQMOM pour l'hydrolyse enzymatique de la cel- lulose	167
V.1.2.5	<u>Article 3</u> : Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose : I. Case of soluble substrate	168
V.1.2.6	Conclusion	197
V.2	Résultats numériques dans le cas d'un substrat particulaire	198
V.2.1	Introduction	198
V.2.2	<u>Article 4</u> : Application of the Direct Quadrature Method of Mo- ments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose : II. Case of insoluble substrate	199

V.2.3	Conclusion	227
V.3	Résultats expérimentaux	228
V.3.1	Analyse au morpho-granulomètre	232
V.3.2	Analyse avec la sonde FBRM	236
V.3.2.1	Test à blanc du substrat Avicel PH-101	237
V.3.2.2	Analyse des résultats d'une expérience type	238
V.3.2.3	Exploitation des résultats de la sonde FBRM	241
V.3.3	Analyse au granulomètre laser	244
V.3.4	Conclusion sur les outils expérimentaux	250
	Conclusion et perspectives	253
	A Transformation d'une PSD en CLD et inversement	259
A.1	PSD-CLD : Solution analytique	259
A.1.1	Cas de particules sphériques	261
A.1.2	Modèle CLD-PSD : Problème inverse	261
A.1.3	Résultats numériques	263
A.2	PSD-CLD : Traitement d'image	263
A.2.1	Principe de la technique	264
A.2.2	Validation de la technique	265
	B Algorithme Produit-Différence (PD)	267
B.1	Principe de l'algorithme	267
B.2	Exemple : une distribution gaussienne	268
	References	271

Table des figures

I.1	<i>Structure et composition de la lignocellulose (Rubin, 2008)</i>	8
I.2	<i>Cinétiques de conversion de celluloses pures ayant différentes tailles initiales (Yeh et al., 2010)</i>	14
I.3	<i>Illustration des trois activités principales d'un cocktail cellulolytique (Bubner et al., 2013)</i>	16
I.4	<i>Données d'adsorption (symboles) à différents taux de conversion fittés par des isothermes de Langmuir (continu) pour un substrat de type Avicel PH-101 et un cocktail de <i>T. reesei</i> (Bansal, 2011).</i>	19
I.5	<i>Hydrolyse enzymatique du papier filtre à deux charges différentes en matière sèche (DM : Dry Matter) avec et sans ajout du glucose initialement (Kristensen et al., 2009). Les conversions finales (en %) sont données à droite.</i>	20
I.6	<i>Évolution de la conversion en sucres simples et de la vitesse apparente durant l'hydrolyse enzymatique d'un substrat de type Avicel PH-101 (Chauve, 2011)</i>	22
I.7	<i>Schéma illustratif de la diffraction laser (lumières bleue et rouge) à l'encontre de particules en suspension</i> ¹	27
I.8	<i>Spectre de diffraction aux rayons X d'une cellulose microcristalline (Avicel PH-101) illustrant la méthode d'évaluation du taux de cristallinité par la hauteur des pics (Park et al., 2010)</i>	28
I.9	<i>Spectres FTIR d'une cellulose microcristalline (Avicel PH-101) avant et après prétraitement (Ciolacu et al., 2011)</i>	29

I.10	<i>Structure de la microfibrille et de la fibrille élémentaire simulées dans le modèle de (Kumar & Murthy, 2013) avec les trois activités enzymatiques prises en compte. Les parties cristallines sont en rouge et en noir les parties amorphes.</i>	39
I.11	<i>Schéma d'une particule cylindrique avec des chaînes surfaciques accessibles ($p_S(x)$) et des chaînes internes inaccessibles ($p_i(x)$)(Griggs et al., 2012a)</i>	40
I.12	<i>Schéma global de l'hydrolyse enzymatique : conséquences sur le substrat et les enzymes.</i>	42
II.1	<i>Dispositif expérimental utilisé pour la conduite des expériences d'hydrolyse</i>	46
II.2	<i>Pics de glucose et de cellobiose à différentes concentrations</i>	48
II.3	<i>Image d'un morpho-granulomètre Mastersizer G3S²</i>	51
II.4	<i>Schéma global du traitement d'images avec Morphologi v7.21</i>	52
II.5	<i>Schéma du principe de fonctionnement de la sonde FBRM²</i>	54
II.6	<i>Schéma global du suivi expérimental d'une réaction d'hydrolyse</i>	57
III.1	<i>Évolution des concentrations en glucose (rouge/rond) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 1 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$)</i>	62
III.2	<i>Évolution des concentrations en glucose (rouge/rond) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 2 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=60 \text{ FPU}$ et expérience 3 : $S=5 \text{ g.L}^{-1}$, $E=30 \text{ FPU}$)</i>	63
III.3	<i>Évolution des concentrations en glucose (rouge/rond) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 4 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, $C_{C_0}=3 \text{ g.L}^{-1}$ et expérience 5 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, $C_{G_0}=3 \text{ g.L}^{-1}$)</i>	64
III.4	<i>Évolution des concentrations en glucose (rouge/rond) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 6 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, ajout de substrat à $t=144 \text{ h}$, expérience 7 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, ajout d'enzymes à $t=144 \text{ h}$)</i>	65
III.5	<i>Comparaison entre les données expérimentales de l'expérience 1 et le résultat de la régression</i>	67
III.6	<i>Comparaison entre les données expérimentales (Expériences 2 et 3) et le résultat de la régression : effet des concentrations en enzymes et en substrat</i>	68

III.7	<i>Comparaison entre les données expérimentales (Expériences 4 et 5) et le résultat de la régression : effet d'inhibition par les sucres simples</i>	69
III.8	<i>Comparaison entre les données expérimentales (Expériences 6 et 7) et le résultat de la régression : effet du rajout de charges fraîches de substrat et d'enzymes</i>	70
III.9	<i>Schéma global d'hydrolyse proposé par (Kadam et al., 2004)</i>	71
III.10	<i>Comparaison entre les données expérimentales de l'Avicel PH-105 et les prédictions du modèle</i>	74
III.11	<i>Schéma global de la démarche de modélisation proposée</i>	76
IV.1	<i>Représentation schématique de la redistribution d'une nouvelle particule qui tombe entre deux pivots dans la technique des pivots fixes</i>	85
IV.2	<i>Solution analytique pour une distribution initiale gaussienne dans le cas d'une rupture pure</i>	104
IV.3	<i>Comparaison entre la solution analytique (en continu) et la résolution par la méthode des classes (en ronds) à différents instants</i>	105
IV.4	<i>Comparaison de l'évolution des moments analytiques (en continu) et des moments résolus via QMOM et DQMOM (en ronds) avec une quadrature à $N = 3$</i>	106
V.1	<i>Schéma global de la résolution du PBE via la méthode des moments avec reconstruction simultanée des distributions et l'éventuel couplage avec la partie expérimentale</i>	166
V.2	<i>Schéma global de la démarche de modélisation par le bilan de population couplée aux outils de caractérisation physique et biochimique du substrat/-réaction</i>	229
V.3	<i>Évolution des concentrations en sucres réducteurs (ronds) et en sucres simples (glucose + cellobiose : *) durant l'expérience 1</i>	231
V.4	<i>Image de particules d'Avicel PH-101 sous microscope avec un grossissement $\times 50$ obtenue avec le Mastersizer G3S</i>	232
V.5	<i>Image composite d'une dispersion de particules d'Avicel PH-101 après seuillage et détection avec un grossissement $\times 10$ (Mastersizer G3S)</i>	233

V.6	<i>Distribution de taille en nombre de particules d'Avicel PH-101 en voie sèche avec une optique $\times 5$ (Mastersizer G3S)</i>	234
V.7	<i>Distribution du ratio d'aspect des particules d'Avicel PH-101 dispersées en voie sèche et analysées avec une optique $\times 5$ (Mastersizer G3S)</i>	234
V.8	<i>Données fournies par la sonde FBRM G400 : Evolution des propriétés moyennes et des classes de cordes (haut), évolution de la distribution de cordes (bas) et estimation des propriétés moyennes et du nombre de cordes détectées dans chaque classe (droite)</i>	236
V.9	<i>Évolution de la distribution de cordes des particules d'Avicel PH-101 dans l'eau et sous agitation mécanique</i>	237
V.10	<i>Évolution de la distribution de cordes des particules d'Avicel PH-101 durant l'hydrolyse (expérience 1)</i>	238
V.11	<i>Évolution de la distribution de cordes normée des particules d'Avicel PH-101 durant l'hydrolyse (expérience 1)</i>	239
V.12	<i>Évolution du nombre total de cordes détectées durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)</i>	239
V.13	<i>Évolution du nombre total de cordes détectées par intervalles de tailles durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)</i>	240
V.14	<i>Évolution de la corde moyenne en nombre durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)</i>	241
V.15	<i>Comparaison de la distribution de taille des particules d'Avicel PH-101 (morpho-granulomètre) avec sa distribution de cordes associée (sonde FBRM)</i>	242
V.16	<i>Génération analytique d'une distribution de cordes associée à une distribution de taille dans le cas de particules de forme sphérique (voir Annexe A)</i>	243
V.17	<i>Distributions de taille (morpho-granulomètre) et leurs distributions de cordes associées (sonde FBRM) de trois différentes familles de particules sphériques</i>	243

V.18	<i>Images de particules sphériques monodisperses et de même taille (à droite) avec leurs distributions de taille (au milieu) et leurs distributions de cordes mesurées avec la sonde FBRM (à gauche) : (A) particules transparentes, (B) particules noires de surface lisse, (C) particules noires de surface rugueuse (Scheler, 2013)</i>	245
V.19	<i>Évolution de la distribution de taille exprimée en fractions volumiques durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)</i>	246
V.20	<i>Évolution des tailles moyennes ($d_{4,3}$ et $d_{3,2}$) des particules d'Avicel PH-101 durant son hydrolyse enzymatique (expérience 1)</i>	246
V.21	<i>Évolution des moments réduits d'ordre 3, 4, 5 et 6 de la distribution de taille durant l'hydrolyse (expérience 1)</i>	248
V.22	<i>Évolution des moments réduits d'ordre 0, 1, 2 et 3 de la distribution de taille durant l'hydrolyse (expérience 1)</i>	249
V.23	<i>Prédiction de l'évolution des moments d'ordre inférieur à partir des moments expérimentaux d'ordre supérieur</i>	249
A.1	<i>Projection 2D d'une particule sphérique</i>	262
A.2	<i>Génération de la CLD d'une PSD et inversement dans le cas de particules de forme sphérique</i>	264
A.3	<i>Schéma global de l'algorithme de génération des cordes à partir du traitement d'images de particules</i>	265
A.4	<i>Comparaison des CLDs issues de la solution analytique (rouge) et par traitement d'images (bleu)</i>	266
B.1	<i>Abscisses et poids calculés via l'algorithme PD pour une distribution gaussienne</i>	269

Liste des tableaux

II.1	<i>Définitions des diamètres équivalents d'une particule (Allen, 1997)</i>	50
II.2	<i>Définitions des diamètres moyens d'une distribution de taille</i>	50
II.3	<i>Comparaison entre les trois techniques granulométriques</i>	55
III.1	<i>Récapitulatif des différentes expériences d'hydrolyse effectuées</i>	61
III.2	<i>Exemple de deux ensembles de huit paramètres optimaux</i>	70
III.3	<i>Incertitudes sur les différents paramètres du modèle de (Kadam et al., 2004) selon l'analyse statistique de (Sin et al., 2010)</i>	72
III.4	<i>Estimation des paramètres cinétiques selon différentes études (Angarita et al., 2015)</i>	73

Liste des symboles

Abréviations

ATR	Attenuated Total Reflectance
BET	Bennet-Emmit-Teller, mesure de la surface spécifique
BGL	β -glucosidase
BKDF	Bêta Kernel Density Function
BP	Bilan de Population
CBD	Carbohydrate Binding Domain
CBH	Cellobiohydrolase
CD	Catalytic Domain
CED	Cupri-Éthylène-Diamine
CFD	Computational Fluid Dynamics
CLD	Chord Length Distribution
CP	Cross-Polarization
CrI	Crystallinity Index
DNS	Acide Dinitrosalicylique
DP	Degré de Polymérisation
DP _n	Degré de Polymérisation moyen
DQMOM	Direct Quadrature Method Of Moments

DS	Degré de Synergie
EG	Endoglucanase
erf	Fonction erreur
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
FPU	Filter Paper Unit
FTIR	Fourier Transform InfraRed Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	InfraRouge
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KDF	Kernel Density Function
LSQLIN	Linear Least-Squares
MALLS	Multi-Angle Laser Light Scattering
MAS	Magic Angle Spinning
ME	Maximum Entropy
MM	Michaelis-Menten
MMD	Molar Mass Distribution
NDF	Number Density Function
NNLS	NonNegative Least-Squares
PBE	Popualtion Balance Equation
PD	Algorithme Produit Différence
PDF	Probability Density Function
pH	Potentiel Hydrogène
PSD	Particle Size Distribution
PVC	Polychlorure de Vinyle
QMOM	Quadrature Method Of Moments

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SEC	Size Exclusion Chromatography
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
UV	UltraViolet
WAXS	Wide-Angle X-ray Scattering

Lettres grecques

$\beta(v, v')$	Fonction de fragmentation
$\dot{\xi}(\xi, \mathbf{r}, Y, t)$	Vitesse de déplacement des propriétés dans l'espace-phase
Γ	Fonction Gamma
ξ	Vecteur des propriétés
δ	Fonction delta de Dirac
δ'	Première dérivée de la fonction delta de Dirac
η	Viscosité intrinsèque ($mL.g^{-1}$)
$\Gamma(v)$	Fréquence de rupture d'une particule de volume v
κ	Paramètre de la fonction Bêta
λ	Paramètre de la fonction Bêta
μ	Moyenne de la distribution normale
∇	Opérateur gradient
ν	Exposant prenant les valeurs 0 ou 1
Ω	Domaine des coordonnées
σ	Ecart-type de la distribution normale
φ_j	Multiplicateur de Lagrange
ζ	Exposant prenant les valeurs 0 ou 1

Lettres latines

\bar{D}_i	Diamètre représentatif de la classe i
-------------	---

\bar{L}_j	Corde représentative de la classe j
\bar{x}	Paramètre pour le calcul des moments décalés
$\dot{\mathbf{R}}(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t)$	Vecteur des vitesses de déplacement dans l'espace physique des coordonnées externes
\mathbf{R}, \mathbf{r}	Vecteur des coordonnées externes
\tilde{B}_k	Moment décalé d'ordre k d'une fonction densité de noyau Bêta
\tilde{m}_k	Moment décalé d'ordre k
\tilde{m}_k^+	Moment décalé d'ordre k de la reconstruction
A	Matrice de taille $(2N, 2N)$ apparaissant dans la méthode DQMOM
a, b	Bornes de l'intervalle de définition de la fonction densité de probabilité
a_i	Dérivée temporelle du poids w_i
b_i	Dérivée temporelle du produit $w_i L_i$
$B_k(x_*)$	Moment d'ordre k d'une fonction densité de noyau Bêta
C	Concentration en cellulose ($g.kg^{-1}$)
$c(L)$	Distribution de cordes
C_C	Concentration en cellobiose ($g.kg^{-1}$)
C_G	Concentration en glucose ($g.kg^{-1}$)
c_i	Produit $w_i L_i$
c_j	Fraction de nombre de cordes de la classe j
C_X	Concentration en xylose ($g.kg^{-1}$)
C_{eff}	Concentration en cellulose disponible ($g.kg^{-1}$)
d	Vecteur des inconnues $(2N)$ pour la méthode DQMOM
d_a	Diamètre moyen en surface projetée (m)
d_F	Diamètre de Feter (m)
d_M	Diamètre de Martin (m)

d_s	Diamètre moyen en surface (mv)
d_v	Diamètre moyen en volume (m)
D_{min}, D_{max}	Diamètres minimal et maximal d'une population de particules
$d_{p,q}$	Diamètre moyen, p et q des entiers (m)
d_{St}	Diamètre moyen de Sauter (m)
d_{sv}	Diamètre moyen surface-volume (m)
E	Concentration en enzymes ($g.kg^{-1}$)
E_b	Concentration d'enzymes adsorbée ($g.kg^{-1}$)
E_f	Concentration d'enzymes libres en solution ($g.kg^{-1}$)
E_{max}	Masse d'enzyme maximale adsorbable (g protéine. g^{-1} substrat)
EP	Concentration en complexes enzyme-produit ($g.kg^{-1}$)
ES	Concentration en complexes enzyme-substrat ($g.kg^{-1}$)
$f(x)$	Fonction densité de probabilité
$f_1(v), f_2(v)$	Propriétés de la fonction densité
f_M	Densité de probabilité reconstruite via la technique du maximum d'entropie
$G(v)$	Vitesse de dissolution des particules
H	Concentration en hémicellulose ($g.kg^{-1}$)
h	Paramètre d'étalement de la fonction densité de noyau
$h(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t)$	Vitesse d'apparition et de disparition d'entités dans le système
$H[f]$	Entropie de Shannon
I	Nombre de fonctions densité de noyau utilisées pour la reconstruction
I_i	Classe i
K	Taille du vecteur des propriétés
k	Ordre du moment m_k

$K(x; x_i, h)$	Fonction densité de noyau centrée sur x_i
k_i	Constante de vitesse de la réaction i
K_m	Constante de Michaelis spécifique de l'enzyme ($g.kg^{-1}$)
K_p	Constante d'inhibition ($g.kg^{-1}$)
K_{ad}	Constante de dissociation (g protéine. g^{-1} substrat)
K_{iIC}	Constante d'inhibition du cellobiose ($g.kg^{-1}$)
K_{iIG}	Constante d'inhibition du glucose ($g.kg^{-1}$)
K_{iIX}	Constante d'inhibition du xylose ($g.kg^{-1}$)
L	Taille (m)
l	Ordre du spline
L_i	Abscisse du point i de la quadrature de Gauss
L_{min}, L_{max}	Cordes minimale et maximale d'une population de particules
Lg	Concentration en lignine ($g.kg^{-1}$)
M_c	Nombre total de cordes détectées
M_i	Masse molaire du polymère de taille i ($g.mol^{-1}$)
m_k	Moment d'ordre k
M_k^*	Moment normalisé d'ordre k d'une distribution expérimentale
m_k^*	Moment d'ordre k d'une distribution expérimentale
m_k^+	Moment d'ordre k de la reconstruction
M_n	Masse molaire moyenne en nombre ($g.mol^{-1}$)
M_w	Masse molaire moyenne en volume ($g.mol^{-1}$)
$M_{\bar{L}j}$	Nombre de cordes dans la classe j
N	Nombre de points de la quadrature de Gauss
$n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t)$	Fonction densité en nombre
$N(\mathbf{r}, t)$	Concentration totale en nombre

n_i	fraction en nombre
$N_i(t)$	Concentration en particules dans la classe I_i
$n_{i,k}$	Contribution de la rupture des particules de la taille x_k au i^{me} pivot
P	Concentration en produits ($g.kg^{-1}$)
p_i	Coefficients de pondération
P_M	Vecteur des pivots
q	Raison d'une suite arithmétique/géométrique
R_B	Terme de naissance de particules suite à la rupture
R_D	Terme de disparition des particules suite à leur rupture
r_i	Vitesse de la réaction i ($g.kg^{-1}.h^{-1}$)
R_S	Réactivité du substrat
S	Concentration en substrat ($g.kg^{-1}$)
$S(\xi, t)$	Terme source relatif aux processus continus et discontinus
$s_i''(x)$	Dérivée seconde du polynôme $s_i(x)$
$s_i'(x)$	Dérivée première du polynôme $s_i(x)$
$s_i(x)$	Polynôme approximant la PDF dans la classe i
$s_{i,j}$	Coefficients du polynôme $s_i(x)$
t	Temps
u_0	Premier terme de la suite géométrique
v	Volume des particules (m^3)
V_m	Vitesse initiale maximale ($g.kg^{-1}.h^{-1}$)
w_i	Poids du point i de la quadrature de Gauss
x	Variable continue
x_*	Paramètre de la fonction densité de noyau Bêta
x_i	Pivot i (m^3)
$Y(\mathbf{r}, t)$	Vecteur représentant la phase continue

Introduction générale

La croissance de la demande en énergie, la raréfaction – et donc l’augmentation des prix – des énergies fossiles ainsi que les enjeux environnementaux ont suscités un engouement sans précédent pour les énergies renouvelables et les produits biosourcés. En effet, la demande globale en énergie ne cesse de progresser du fait de la croissance de la démographie mondiale et des modes de consommation de plus en plus énergivores alors que les ressources fossiles (principalement le pétrole, le gaz naturel et le charbon), constituant la majeure partie du bouclier énergétique mondial actuel, sont limitées d’une part et sont responsables des émissions de gaz à effet de serre à grande échelle d’autre part. Différentes alternatives pour aller vers des énergies renouvelables à faible impact environnemental existent et l’une des voies prometteuse est l’utilisation de la biomasse végétale comme matière première renouvelable en vue de la production de biocarburants et de diverses molécules d’intérêt.

La biomasse végétale communément appelée *lignocellulose* est la source de carbone renouvelable la plus abondante sur terre ([Chang & Holtzaple, 2000](#)). Elle se présente sous différentes formes (résidus agricoles, déchets forestiers . . .) et est constituée essentiellement de cellulose, d’hémicellulose et de lignine dans des proportions différentes. Globalement, plus de 75% en masse de la biomasse végétale sont des polysaccharides ([Jørgensen et al., 2007](#)) qui peuvent être transformés en sucres simples fermentescibles en vue de la production de biocarburant, par exemple le bioéthanol de seconde génération. Contrairement au bioéthanol de première génération produit généralement à partir des plantes sucrières et amylacées, ce qui pose un problème éthique quant à l’utilisation des produits alimentaires, le bioéthanol de seconde génération ne concerne que les parties moins nobles des plantes et ne présente, de ce fait, aucune compétition directe avec la production

alimentaire.

Le fractionnement de la biomasse lignocellulosique et sa transformation en sucres simples peut se faire par voie chimique ou biochimique. La voie chimique est, comme son nom l'indique, basée sur l'utilisation de produits chimiques (généralement des acides forts) pour attaquer et dissoudre les parois végétales. Malgré ses rendements élevés, ce procédé a une empreinte écologique considérable. La voie biochimique, quant à elle, utilise des cultures microbiennes et/ou des cocktails enzymatiques (biocatalyseurs) dans des conditions douces (pH et température) pour dégrader le substrat et a, de ce fait, un faible impact environnemental. Par ailleurs, le coût élevé des enzymes reste un verrou majeur pour son industrialisation.

La transformation de la lignocellulose par voie biochimique en utilisant des cocktails enzymatiques se fait en plusieurs étapes successives. Une première étape de prétraitement du substrat est nécessaire pour le préparer et faciliter ainsi l'action du biocatalyseur. Ces prétraitements peuvent être physiques (e.g. broyage), chimiques (e.g. acides dilués), physico-chimiques (e.g. explosion à la vapeur d'eau) et/ou biologiques (e.g. enzymes spécifiques) et visent généralement à éliminer la fraction lignine et améliorer ainsi l'accessibilité aux fractions hydrolysables (Alvira *et al.*, 2010). L'étape d'*hydrolyse* est le cœur du procédé, les polysaccharides sont réduits en monosaccharides (hexoses ou pentoses) par l'intermédiaire du biocatalyseur. Ces monosaccharides sont séparés ou directement transformés en produit final, selon le procédé adopté, en dernière étape.

Il est admis que l'hydrolyse enzymatique est l'étape limitante du procédé global de transformation biochimique de la lignocellulose puisqu'elle conditionne la vitesse de la conversion (Chauve, 2011). En effet, cette réaction complexe fait partie de la biocatalyse hétérogène et sa vitesse dépend d'un nombre important de paramètres liés aux propriétés compositionnelles et structurales du substrat, à la nature et à la composition du cocktail enzymatique ainsi qu'aux conditions opératoires. L'ensemble de ces paramètres agissent à différentes échelles et selon différents mécanismes et sont responsables, *in fine*, du ralentissement progressif de la vitesse de conversion. Cela se traduit par une transformation partielle du substrat même sur des temps de réaction longs (plusieurs jours).

L'amélioration des rendements de la réaction d'hydrolyse enzymatique passe par une meilleure compréhension des mécanismes élémentaires mis en place pour dégrader le substrat d'une part et l'élucidation des interactions entre les paramètres physiques et biochi-

miques d'autre part. Par ailleurs, la complexité du système et la nécessité d'une extrapolation à l'échelle d'un *procédé* industriel requièrent le développement de modèles fiables, capables de prédire le comportement d'un tel système. Les enjeux auxquels la modélisation doit apporter des éléments de réponse peuvent être résumés à :

- La prédiction de la production dynamique des sucres simples
- L'évolution des propriétés physico-chimiques du milieu réactionnel
- L'effet des actions combinées des différentes activités enzymatiques
- Les effets des prétraitements sur la dynamique d'évolution des propriétés du substrat et sur sa conversion
- Les effets des hétérogénéités (spatiales par exemple) dans un réacteur

Une littérature abondante relative à la modélisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique est disponible mais très peu variée. En effet, l'essentiel des études abordant ce sujet se basent sur des schémas cinétiques simples où la description du système se réduit à une variable globale, facilement accessible expérimentalement, qui est généralement la concentration en substrat. Cela est le cas, par exemple, du modèle de Michaelis-Menten développé initialement pour les cinétiques en phase homogène et extrapolé par la suite aux systèmes hétérogènes en gardant sa forme mathématique initiale. La validation du modèle passe par la régression de données expérimentales typiques de l'hydrolyse (concentrations en sucres simples produits) pour une identification paramétrique. Néanmoins, ce type d'approches simplificatrices ne prend pas en compte la dynamique d'évolution des propriétés du substrat/biocatalyseur/système. Ce défaut structurel majeur réduit la pertinence et le caractère prédictif des modèles simplifiés.

L'objectif de cette étude est de proposer une approche de modélisation capable, d'un point de vue structurel, de supporter et de traduire la complexité des systèmes enzymes/-substrat à différentes échelles. Pour cela, le formalisme de *bilan de population* est adopté. Cet outil de modélisation des systèmes dispersés est suffisamment avancé pour prendre en compte aussi bien les hétérogénéités au sein d'une propriété donnée que plusieurs propriétés distribuées à la fois. De plus, il permet d'intégrer les processus élémentaires ayant lieu à l'échelle particulière pour prédire l'évolution globale du système, ce qui est particulièrement intéressant lors du passage à l'échelle du procédé et les questionnements que cela impose. Finalement, cette approche générique se combine aisément avec les codes de calcul propres à la mécanique des fluides numérique, point non négligeable pour la

modélisation des systèmes comportant des hétérogénéités spatiales.

Dans le cas de l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose, le modèle de bilan de population proposé est monovarié et est basé sur une hétérogénéité structurale du substrat à savoir la distribution de taille des particules. Il est alimenté par les modes d'action des activités enzymatiques principales d'un cocktail et vise à prédire la dynamique d'évolution de la propriété considérée conjointement avec la cinétique de conversion du substrat en sucres simples. Par ailleurs, le développement de métrologies pertinentes pour caractériser le système et alimenter le modèle traduit notre volonté de confronter les aspects théoriques fondamentaux aux approches expérimentales appropriées pour une étude qui se veut être la plus complète possible.

Cette thèse est réalisée dans le cadre d'un projet pré-compétitif porté par *Toulouse White Biotechnology*¹ (TWB, UMS INRA/INSA/CNRS). Les travaux ont été effectués au sein du *Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés* (LISBP, UMR 5504 INSA/CNRS et UMR 792 INSA/INRA), dans les deux équipes *Transfert, Interfaces, Mélange* (TIM) et *Écosystèmes microbiens et bioprocédés d'épuration et de valorisation* (SYMBIOSE) avec un cofinancement de l'*Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) et la *Région Midi-Pyrénées*.

Ce présent mémoire se décline en cinq chapitres :

Le premier chapitre est une revue bibliographique dédiée à l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose au sens large. Il se décline en trois sous-parties. Dans la première sous-partie, une analyse des différents paramètres affectant la réaction d'hydrolyse est détaillée suivie par une description des outils expérimentaux utilisés pour la caractérisation du substrat et de l'avancement de la réaction en deuxième sous-partie. La dernière sous-partie est consacrée au développement des différentes approches de modélisation décrites dans la littérature.

Le deuxième chapitre donne un aperçu sur le matériel et les méthodes expérimentales utilisées dans cette étude. Le dispositif expérimental pour la conduite des expériences d'hydrolyse, les substrats, les biocatalyseurs et l'ensemble des conditions opératoires sont décrits ainsi que les outils de caractérisation physique et biochimique utilisés.

Le troisième chapitre propose une analyse de la modélisation classique basée sur la confrontation de nos propres données expérimentales à un modèle reposant sur un schéma

1. <http://www.toulouse-white-biotechnology.com/>

cinétique simple largement utilisé dans la littérature. Ce modèle est présenté initialement ainsi qu'une analyse de la base de données expérimentales. Les résultats de la confrontation sont détaillés appuyés par des études similaires disponibles dans la littérature.

Le quatrième chapitre est consacré aux outils numériques adoptés dans ce travail. Il est divisé en trois parties : le formalisme de bilan de population est décrit d'une façon générale avant son adaptation au cas spécifique de l'hydrolyse enzymatique dans la première partie. Les méthodes de résolution de l'équation de bilan de population, plus précisément la méthode des classes et la méthode des moments, sont développées dans la seconde partie. La validation numérique des méthodes de résolution par comparaison à une solution analytique est donnée dans la dernière partie.

Le dernier chapitre résume l'essentiel des résultats numériques et expérimentaux obtenus. Dans un premier temps, la méthode des classes est utilisée pour la résolution de l'équation de bilan de population dans le cas de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat soluble. Le même cas est traité par la méthode des moments en passant au préalable par une étude comparative des techniques de reconstruction des distributions via la connaissance d'un nombre fini de leurs moments. Dans un deuxième temps, la méthode des moments est utilisée dans le cas d'un substrat particulaire. En dernier lieu, les résultats expérimentaux concernant notamment la caractérisation physique du substrat au cours de l'hydrolyse sont exposés et commentés.

Une synthèse de l'ensemble des résultats numériques et expérimentaux obtenus dans le cadre de cette étude, des principaux résultats qui en découlent ainsi que les perspectives sur lesquelles ce travail ouvre la voie clôturent le manuscrit.

Chapitre I

Revue Bibliographique

Ce chapitre bibliographique est subdivisé en trois parties. Dans la première partie, nous décrivons les différents facteurs qui interviennent lors de la réaction de transformation de la lignocellulose qu'ils soient liés au substrat, au biocatalyseur ou aux conditions opératoires. Nous nous intéressons dans la seconde partie aux outils expérimentaux qui peuvent être utilisés pour caractériser le substrat et quantifier l'avancement de la réaction. Dans la dernière partie, nous abordons la modélisation de la réaction d'hydrolyse et les différents modèles décrits dans la littérature.

I.1 Hydrolyse enzymatique de la lignocellulose

La transformation de la lignocellulose en sucres simples par voie biochimique est un processus complexe qui fait intervenir un nombre important de facteurs interdépendants à différentes échelles. La composition, la structure et la morphologie du substrat, la nature et le mode d'action des biocatalyseurs ainsi que la nature du milieu réactionnel sont autant de paramètres - dynamiques - qui interagissent et conditionnent la vitesse globale de la réaction d'hydrolyse. Cette complexité se traduit aussi par les hétérogénéités tant au niveau compositionnel que structural d'un substrat à un autre, voire même au sein du même substrat selon la zone géographique, la saison et/ou le mode de culture.

Dès lors, le développement d'un modèle cinétique prédictif devient une nécessité afin de mieux gérer cette complexité et ces hétérogénéités et d'appréhender cette étape de transformation d'un point de vue *procédé*. Cela passe nécessairement par une meilleure

compréhension des interactions entre les différents paramètres et des mécanismes réactionnels mis en œuvre.

I.2 Facteurs limitants liés au substrat

La nature récalcitrante de la lignocellulose est le résultat direct de sa composition et de sa structure développées pour faire face et résister aux micro-organismes qui l'attaquent et la dégradent à l'état naturel (Zhao *et al.*, 2012).

La lignocellulose est composée essentiellement de lignine, d'hémicellulose et de cellulose dans des proportions variables d'une plante à une autre. La cellulose est le constituant majeur (30 à 50% du poids sec de la plante), elle est composée d'un agencement de centaines voire de milliers de molécules de D-glucose via des liaisons glycosidiques $\beta(1 \rightarrow 4)$ pour former des chaînes. Les deux extrémités d'une chaîne ne sont pas chimiquement équivalentes : l'une est réductrice et l'autre est non réductrice. Grâce à des liaisons hydrogène et de van der Waals, ces chaînes de polysaccharides forment des microfibrilles insolubles qui constituent à leur tour des fibres (Figure I.1) (Mohnen *et al.*, 2008).

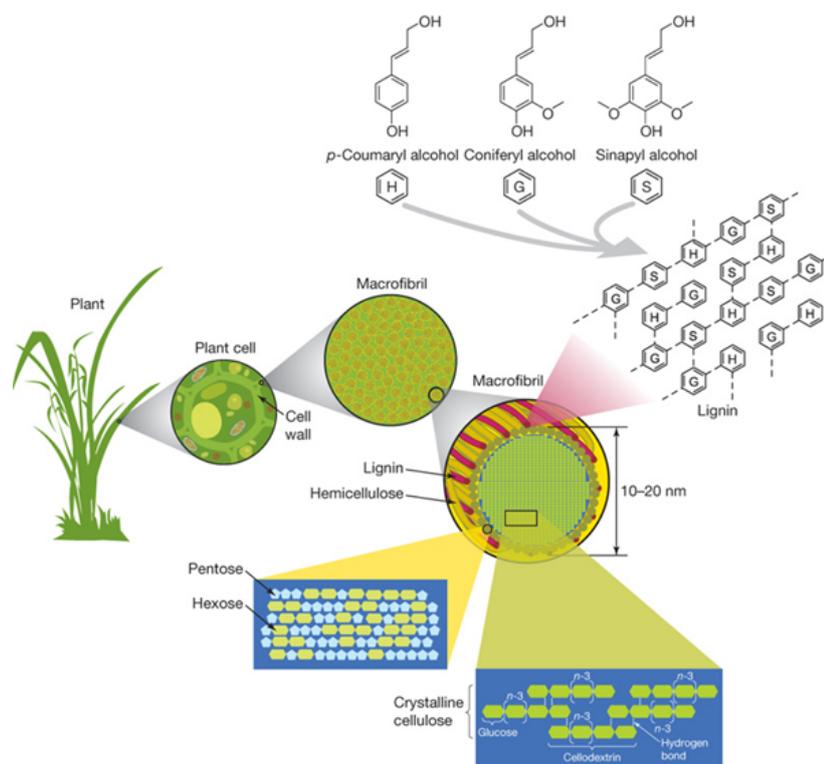


FIGURE I.1 – Structure et composition de la lignocellulose (Rubin, 2008)

L'hémicellulose représente une fraction allant de 20 à 40% du poids sec total, elle est

sous forme de chaînes polymères courtes et branchées dont les monomères constitutifs sont des sucres C_5 (xylose, arabinose) et C_6 (galactose, glucose et mannose) (Balat, 2011).

La lignine, quant à elle, est un biopolymère aromatique connecté au xylane via des liaisons covalentes conférant ainsi une grande rigidité au substrat (Limayem & Ricke, 2012). Elle est composée de trois alcools aromatiques : l'alcool p-coumarique, l'alcool coniférique et l'alcool sinapylique (Figure I.1) (Rubin, 2008).

I.2.1 Composition chimique du substrat

Nous nous intéressons à la conversion des polysaccharides contenus dans la lignocellulose notamment la fraction cellulosique en sucres simples via l'utilisation de cocktails enzymatiques dédiés (cellulases). Il est, de ce fait, évident que la composition du substrat initial aura un impact considérable sur son hydrolysabilité. De plus, il est important de signaler qu'une information sur les fractions de lignine et d'hémicellulose dans le substrat considéré n'est pas toujours pertinente puisque ce qui va impacter considérablement la vitesse de conversion est leur répartition au sein de la matrice lignocellulosique, ce qui est, d'un point de vue pratique, difficilement accessible.

I.2.1.1 Répartition de la lignine

La lignine, de par sa nature, constitue une fraction récalcitrante que les enzymes cellulolytiques ne peuvent pas fractionner. Elle forme une barrière physique réduisant ainsi l'accessibilité du biocatalyseur aux fractions hydrolysables. De ce fait, la délignification du substrat par les différents prétraitements physico-chimiques libère la cellulose et la rend plus accessible aux cellulases (Grethlein *et al.*, 1984; Mansfield *et al.*, 1999).

La lignine ne constitue pas seulement une barrière pour l'accès des cellulases à la cellulose, elle adsorbe irréversiblement les enzymes, ce qui a été rapporté dans la littérature par différents auteurs (Clesceri *et al.*, 1985; Converse *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1994). Cela a un effet direct sur la cinétique d'hydrolyse puisque une partie du biocatalyseur est bloquée par cette adsorption non-réactive.

Expérimentalement, l'accès à la fraction massique de la lignine d'un substrat se fait dans la plupart des cas par une hydrolyse acide complète. Elle peut se faire aussi par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) (Faix, 1988; Stewart *et al.*, 1995b; Emandi *et al.*, 2011). Ces deux techniques seront présentées plus en détail dans la

partie I.6.2.1.

I.2.1.2 Répartition de l'hémicellulose

Comme la lignine, l'hémicellulose joue le rôle d'une barrière physique limitant l'accessibilité des cellulases aux fractions hydrolysables (Zhao *et al.*, 2012), de ce fait, son élimination par les différents prétraitements (acide, à la vapeur d'eau . . .) induit une augmentation de la digestibilité du substrat (Yang & Wyman, 2004; Liao *et al.*, 2005; Öhgren *et al.*, 2007; Mussatto *et al.*, 2008), ce qui a aussi été rapporté en rajoutant aux cocktails cellulolytiques des xylanases capables d'hydrolyser le xylane, l'un des constituants principaux de l'hémicellulose (Tabka *et al.*, 2006; García-Aparicio *et al.*, 2007; Kumar & Wyman, 2009).

Néanmoins, comparée à la lignine, l'hémicellulose est plus facile à éliminer par les prétraitements (Zhu & Pan, 2010), à titre d'exemple, l'utilisation de l'acide sulfurique dilué couplé à une température inférieure à 120 ° C induit une élimination (conversion en sucres simples C_5) de plus de 80% de l'hémicellulose initiale du substrat (Silverstein *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010).

La lignocellulose, en plus des trois fractions majeures qui la constituent (cellulose, hémicellulose et lignine), contient d'autres constituants, en faibles proportions certes mais qui jouent un rôle, pas toujours négatif d'ailleurs, lors de son hydrolyse enzymatique. Les groupements acétyles par exemple ont été montrés du doigt par différents chercheurs comme facteur freinant la conversion (Grohmann *et al.*, 1989; Kong *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 2008). Quant aux protéines contenues dans le substrat, elles sont divisées en celles qui ont une influence positive et celles qui, au contraire, impactent négativement l'hydrolyse (Zhao *et al.*, 2012) et elles ont fait l'objet de différentes recherches (Cosgrove, 2005; Himmel & others, 2009; Lagaert *et al.*, 2009). Notons enfin que ces protéines sont sensiblement affectées par les différents prétraitements et les conditions de stockage.

I.2.2 Structure/morphologie du substrat

La lignocellulose se distingue par son architecture complexe quelque soit l'échelle à laquelle elle est décrite. L'agencement de ses différents constituants lui confère des propriétés structurales qui sont loin d'être complètement élucidées. Nous décrivons dans ce

qui suit les paramètres structuraux et morphologiques les plus importants.

I.2.2.1 Le degré de polymérisation

Le degré de polymérisation (DP) est le nombre de monomères (D-glucose) constitutifs d'une chaîne de cellulose. Il varie sur une large gamme (de <100 à >15000) selon la nature du substrat et les prétraitements qu'il a subi (Zhang & Lynd, 2004). Il est considéré comme un facteur important lors de l'hydrolyse enzymatique étant donné que l'action élémentaire des enzymes a pour conséquence la réduction de la taille des chaînes cellulosiques donc leur degré de polymérisation. De ce fait, il est largement abordé dans la littérature (Chang & Holtzapfle, 2000; Mansfield *et al.*, 1999; Zhang & Lynd, 2004) ainsi que les différentes méthodes utilisées pour sa détermination (Klemm *et al.*, 1998; Striegel, 1997). Selon la nature du substrat et la méthode utilisée, on peut accéder au degré de polymérisation moyen (DP_n) et/ou à une distribution du DP.

Plusieurs auteurs (Zhang & Lynd, 2005; Chen *et al.*, 2007a; Gupta & Lee, 2009) ont rapporté l'évolution du degré de polymérisation des substrats étudiés durant leur hydrolyse mais avec des cinétiques plus ou moins rapides, ce qui est dû à la fois à la nature du substrat étudié et à la nature et au type du biocatalyseur utilisé puisque chaque enzyme est caractérisée par son propre mode d'action comme il sera décrit ultérieurement.

I.2.2.2 Le taux de cristallinité

La cellulose, au niveau de sa structure à l'échelle des chaînes et des microfibrilles, est composée d'une fraction cristalline ordonnée et d'une fraction amorphe moins ordonnée. Cette structure particulière est due aux liaisons hydrogène dont la répartition est loin d'être spatialement homogène, elle est sensible à l'origine de la cellulose et aux prétraitements qu'elle a subies (Sugiyama *et al.*, 1991; Colom *et al.*, 2003; Monlau *et al.*, 2012).

Le taux de cristallinité de la cellulose peut être déterminé par différentes techniques expérimentales telles que la diffraction des rayons X (Mittal *et al.*, 2011; O'Dwyer *et al.*, 2007; Terinte *et al.*, 2011), la résonance magnétique nucléaire RMN ¹³C (Hult *et al.*, 2000; Liitiä *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007), la Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) (Åkerholm *et al.*, 2004; Nelson & O'Connor, 1964; Schwanninger *et al.*,

2004) et la Spectroscopie Raman (Edwards *et al.*, 1997; Schenzel *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2010). En pratique, plusieurs méthodes sont couplées pour accéder à la cristallinité d'un substrat donné (Matuana *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2010; Ciolacu *et al.*, 2011).

Les chercheurs, notamment durant les années 1980, ont avancé que la cristallinité est un facteur défavorable clé dans l'hydrolyse enzymatique de substrats cellulosiques, des modèles cinétiques tenant compte de ce facteur ont été même développés (Fan *et al.*, 1980; Fan *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1983). Si cette hypothèse était valable, le taux de cristallinité augmenterait au cours de l'hydrolyse puisque les fractions amorphes seraient hydrolysées en premier (Betrabet & Paralikar, 1977; Ooshima *et al.*, 1983). Néanmoins, différentes études affirment que le taux de cristallinité ne varie pas au cours de l'hydrolyse (Ohmine *et al.*, 1983; Schurz *et al.*, 1985; Sinitsyn *et al.*, 1989; Lenz *et al.*, 1990). De ce fait, il serait difficile de conclure quant à l'importance de ce facteur pour l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Mansfield *et al.*, 1999; Lynd *et al.*, 2002; Zhang & Lynd, 2004) d'autant plus que des différences notables ont été constatées d'une méthode expérimentale à une autre, ce qui rend la comparaison délicate (Park *et al.*, 2010).

I.2.2.3 L'accessibilité

L'accessibilité des enzymes à la surface du substrat hydrolysable (cellulose amorphe) dépend de la taille, de la forme et de la porosité de ce dernier (Kim *et al.*, 1992) ainsi que de son architecture spatiale. La surface accessible est généralement mesurée par la méthode BET (Bennet-Emmit-Teller) qui repose sur l'adsorption du diazote (Fan *et al.*, 1980). Néanmoins, cette technique présente deux inconvénients majeurs : d'une part, la mesure s'effectue sur un substrat sec, ce qui, de toute évidence, donne un résultat dans des conditions différentes de celles de l'hydrolyse (Mansfield *et al.*, 1999), d'une autre part, les molécules de diazote, ayant une taille inférieure à celle des enzymes, accèdent aux pores et aux cavités interdites aux enzymes. Une autre technique, plus appropriée, est celle de l'exclusion du soluté, qui détermine la surface visible par des molécules de tailles différentes en milieu aqueux (Grethlein, 1985; Wang *et al.*, 2012). La connaissance de la taille des enzymes est nécessaire dans ce cas.

Wong *et al.* ont montré que la différence entre l'hydrolyse d'un bois dur et celle d'un bois tendre peut être expliquée par l'accessibilité des enzymes au substrat (Wong *et al.*,

1988). En effet, les mesures montrent une différence en terme de volume des pores entre les deux types de bois, ce qui a été avancé par (Grethlein *et al.*, 1984). Une étude similaire plus récente portant sur une large gamme de substrats corrobore ces résultats (Arantes & Saddler, 2011).

Récemment, en utilisant des isothermes d'adsorption de Langmuir sur un substrat de type Avicel (cellulose pure) partiellement hydrolysé (12%, 31%, 48% et 66%), Bansal *et al.* ont rapporté une décroissance de la capacité d'adsorption du substrat au fur et à mesure de l'avancement de l'hydrolyse (Bansal *et al.*, 2012) (Figure I.4), ce qui avait été également observé auparavant (Hong *et al.*, 2007). Cela a été expliqué par la décroissance de l'accessibilité tout au long de la réaction comme un résultat direct de l'évolution de l'état du substrat.

Il faut noter toutefois que la notion d'accessibilité est complexe et sa définition diffère d'un auteur à un autre. Elle fait intervenir la surface spécifique du substrat, sa composition et sa structure. Dans l'idéal, nous cherchons à quantifier la surface réactive à laquelle les enzymes ont accès. Or, en pratique, cette information n'est pas disponible en tant que telle. Certes, nous pouvons accéder à la surface spécifique visible par les enzymes dans le meilleur des cas, mais cette surface peut être constituée de composés autres que la cellulose ou de cellulose cristalline non réactive. Dans les deux cas, l'accessibilité telle que nous l'avons définie ne peut pas être véritablement quantifiée.

I.2.2.4 La surface spécifique / taille des particules

L'une des étapes de l'hydrolyse étant l'adsorption des enzymes sur le substrat, il paraît évident que la surface spécifique soit un facteur important mais aussi indissociable de l'accessibilité et de la taille des particules. Nombreuses sont les études qui se sont intéressées à l'influence de la taille initiale des particules du substrat sur la cinétique de l'hydrolyse, les uns considérant cette influence comme faible (Mansfield *et al.*, 1999; Chang & Holtzapple, 2000), d'autres comme importante (Dasari & Berson, 2007; Yeh *et al.*, 2010) selon le type de substrat utilisé et le mode opératoire suivi.

Des études ont rapporté que les cinétiques d'hydrolyse de particules de cellulose microcristalline ayant des tailles moyennes initiales de 38 μm et de 90 μm (Shewale & Sadana,

1979), de particules de coton de 17 μm et de 32 μm (Sinitzyn *et al.*, 1991) sont similaires. Quant à Gan *et al.*, en travaillant avec de la cellulose pure, ils ont constaté qu'en réduisant la taille moyenne des particules de 82 à 38 μm , la vitesse d'hydrolyse a doublé lors des 10 premières heures (Gan *et al.*, 2003). Au bout de 72 heures d'hydrolyse, la réduction de la taille moyenne initiale des particules de cellulose de 590 à 33 μm avait pour conséquence une augmentation de 55 % en glucose produit (Dasari & Berson, 2007). Nous donnons dans la Figure I.2 les cinétiques obtenues par (Yeh *et al.*, 2010) en utilisant une cellulose pure (coton) broyée pour avoir différentes tailles initiales.

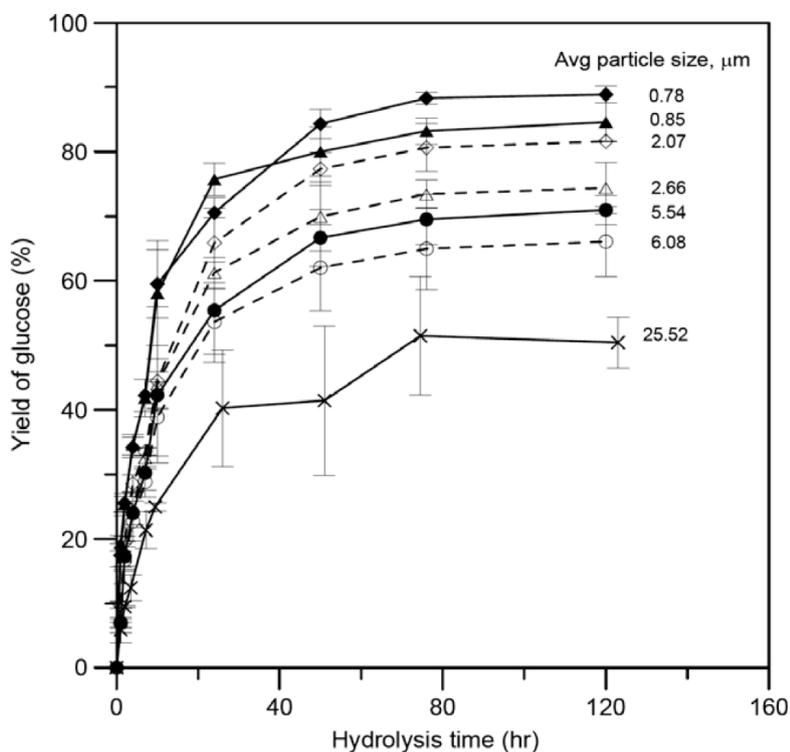


FIGURE I.2 – Cinétiques de conversion de celluloses pures ayant différentes tailles initiales (Yeh *et al.*, 2010)

La conversion en glucose est significativement améliorée avec la réduction de la taille initiale du substrat. Il est important de signaler aussi que de tels résultats doivent être interprétés avec précaution du fait que le procédé utilisé pour réduire la taille initiale des particules peut impacter d'autres paramètres structuraux du substrat tel que sa cristallinité et, de ce fait, la répercussion sur la vitesse d'hydrolyse est la conséquence de plusieurs paramètres, pas uniquement de la taille initiale. Il faut noter aussi que ces études ont été conduites sur des particules de cellulose pure et non pas sur de la lignocellulose. En effet, les fractions de lignine et d'hémicellulose et leur répartition changent avec la réduction de

la taille des particules (Zhang & Lynd, 2004), ce qui complique encore l'interprétation. Vidal et al. ont résumé les différentes études portant sur la taille initiale des particules de substrat et son impact sur la conversion (Jr et al., 2011).

Si l'influence de la taille initiale des particules de substrat sur la conversion a été largement abordée dans la littérature, l'évolution de la taille des particules au cours de la réaction n'a pas suscité, quant à elle, un grand intérêt. Wang et al. ont observé une forte diminution de la taille des particules de cellulose après plusieurs heures d'hydrolyse enzymatique grâce à des mesures en microscopie électronique (Wang et al., 2006). Park et al. ont montré que la longueur des particules passait de 2.5 mm à 0.33 mm après 4 heures d'hydrolyse à forte concentration en enzymes (Park et al., 2007).

Si l'évolution des propriétés morphologiques du substrat au cours de sa conversion n'est pas bien décrite dans la littérature, cela revient en grande partie aux contraintes expérimentales que de telles études suscitent. En effet, avoir une information fiable sur l'évolution de la taille ou de la forme des particules dans le milieu réactionnel est une tâche très délicate.

I.3 Facteurs liés au biocatalyseur

Un cocktail hydrolytique classique contient principalement trois activités cellulolytiques : l'activité cellobiohydrolase (CBH) appelée aussi exoglucanase, l'activité endoglucanase (EG) et enfin l'activité β -glucosidases (BGL). Les deux premières activités hydrolysent aussi bien les substrats solides que solubles tandis que les β -glucosidases agissent uniquement sur le cellobiose soluble qui est un dimère de glucose (Figure I.3).

L'action des CBH se fait au niveau des extrémités des chaînes cellulosiques d'une façon processive et libère du cellobiose (dimère de glucose). La souche *Trichoderma reesei* sécrète deux types de cellobiohydrolases : des CBHI agissant sur les bouts réducteurs et des CBHII attaquant les bouts non réducteurs (Teeri et al., 1998). Ces enzymes sont constituées d'un domaine qui leur permet de s'adsorber et de se fixer sur le substrat appelé CBD (Cellulose Binding Domain) et un domaine catalytique (CD) pour agir au niveau de la liaison osidique (Hilden & Johansson, 2004).

Les EG sont connues pour attaquer aléatoirement les liaisons osidiques, permettant

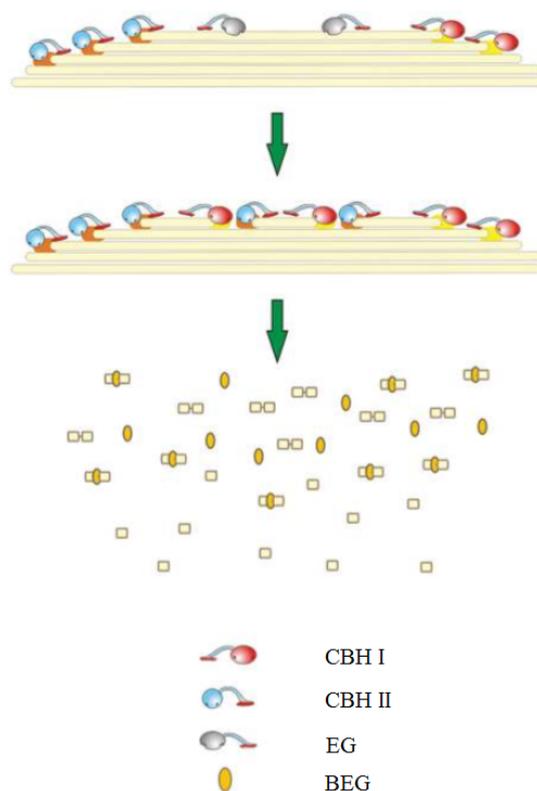


FIGURE I.3 – Illustration des trois activités principales d'un cocktail cellulolytique (Bubner et al., 2013)

ainsi de générer de nouvelles extrémités de chaînes. Comme les CBH, elles sont caractérisées par un CD et un CBD dont les conformations sont différentes leur conférant cette capacité d'agir le long des chaînes (Lynd et al., 2002; Chauve, 2011).

Les BGL hydrolysent le cellobiose produit par les CBH en glucose. La fraction de BGL dans le cocktail sécrété par *Trichoderma reesei* est faible, de ce fait, il est généralement supplémenté par les BGL produites par *Aspergillus niger* (Chauve et al., 2010) pour un meilleur pouvoir hydrolytique du cocktail.

I.3.1 Activité et synergie du cocktail enzymatique

La présence de différentes activités enzymatiques (au sens du type de réaction réalisée) dans un cocktail hydrolytique dans des proportions distinctes a une influence directe sur la vitesse d'hydrolyse. En effet, non seulement chaque type d'activité se caractérise par son propre mode d'action mais leur combinaison induit une *synergie*.

L'activité d'un cocktail (ou d'une enzyme) est une grandeur quantitative qui caracté-

rise son pouvoir hydrolytique. Une unité d'activité correspond à la production d'une μmol de sucres réducteurs par minute dans des conditions contrôlées de température et de pH sur un substrat spécifié.

La synergie entre deux ou plusieurs enzymes se rencontre lorsque l'action combinée de ces enzymes conduit à une activité supérieure à la somme des activités des enzymes utilisées séparément (Wood T. M. & McCrae Sheila I., 1979; Wood & Garcia-Campayo, 1990; Walker & Wilson, 1991), on définit alors le degré de synergie (DS) comme le rapport entre l'activité d'un cocktail et la somme des activités des enzymes le constituant. Deux types de synergies ont été mis en évidence dans la littérature : la synergie entre les EG et les CBH appelée Endo-Exo et la synergie entre les CBH appelée Exo-Exo (Wood & Garcia-Campayo, 1990; Chauve, 2011). La synergie Endo-Exo s'explique par l'attaque aléatoire des EG qui libèrent des extrémités de chaînes qui seront disponibles pour l'action des CBH (Medve *et al.*, 1997; Nidetzky *et al.*, 1994). La synergie Exo-Exo a également été observée mais aucun mécanisme n'a été clairement établi pour l'expliquer et plusieurs théories sont proposées (Kim *et al.*, 1998; Kim & Hong, 2001; Chauve, 2011).

D'autres types de synergies existent mais la plus étudiée reste l'Endo-Exo vue son importance dans le cas de l'hydrolyse de la cellulose. Zhang *et al.* ont résumé les différentes études qui lui ont été consacrées (Zhang & Lynd, 2004). Ce type de synergie dépend à la fois des propriétés du substrat (degré de polymérisation, cristallinité) et des conditions expérimentales (concentration en enzymes, importance de l'inhibition) (Hoshino *et al.*, 1997; Våljamäe *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2002; Eriksson *et al.*, 2002).

Dès lors que les différentes activités n'agissent pas indépendamment les unes des autres, on voit à quel point la composition et la nature du cocktail sont un facteur déterminant. On peut agir directement sur ce facteur lors de la formulation des cocktails (notamment à l'échelle industrielle).

I.3.2 Adsorption des enzymes

Les EG et CBH de par leur mode d'action ne peuvent agir qu'une fois adsorbées sur le substrat via leur CBD. Cela montre à quel point cette étape d'adsorption est essentielle pour l'hydrolyse et doit être, de ce fait, prise en compte pour toute modélisation de cette réaction.

L'adsorption est considérée comme rapide devant le temps nécessaire à la réaction

(Lynd *et al.*, 2002). L'équilibre d'adsorption est généralement représenté par l'isotherme de Langmuir. Dans ce cas, la concentration en enzymes adsorbées E_b ($g.kg^{-1}$) est donnée en fonction de la concentration en enzymes libres en solution E_f ($g.kg^{-1}$) par :

$$E_b = \frac{E_{max}K_{ad}E_fS}{1 + K_{ad}E_f} \quad (I.1)$$

K_{ad} est la constante de dissociation (g protéine. g^{-1} substrat), S la concentration en substrat ($g.kg^{-1}$), E_{max} la capacité maximale adsorbable (g protéine. g^{-1} substrat).

Ce type d'isotherme est largement utilisé grâce à sa simplicité pour comparer les propriétés cinétiques de différents systèmes cellulase-cellulose néanmoins, les hypothèses sur lesquelles le modèle repose ne sont pas satisfaites dans tous les cas vu les spécificités du système : l'irréversibilité partielle de l'adsorption des cellulases (Palonen *et al.*, 1999), les interactions entre les cellulases adsorbées, surtout à forte concentration (Jeoh *et al.*, 2002), le piégeage des enzymes par les pores du substrat (Lee *et al.*, 1983), les différents types de cellulases caractérisés par différentes constantes (Beldman *et al.*, 1988). Comme alternatives, d'autres modèles sont proposés, on peut citer le modèle de Langmuir à deux sites (Ståhlberg *et al.*, 1991; Medve *et al.*, 1997; Medve *et al.*, 1998; Kim & Hong, 2001), l'isotherme de Freundlich et les modèles combinés Langmuir-Freundlich (Medve *et al.*, 1997).

Au final, il faut noter que le mécanisme d'adsorption des cellulases est complexe vu l'hétérogénéité des substrats en termes de composition chimique (fractions lignine et hémicellulose) et de propriétés structurales (cristallinité, surface accessible) (Mansfield *et al.*, 1999). Cette hétérogénéité a un caractère dynamique puisque le substrat est en interaction avec le milieu réactionnel, ce qui rajoute un niveau de complexité qui n'est pas des moindres. En effet, comme montré par (Bansal, 2011) (Figure I.4), l'adsorption des cellulases et donc les paramètres de l'isotherme utilisée pour sa modélisation varient d'une façon notable durant la conversion.

I.3.3 Inhibition des cellulases

Comme toutes les réactions enzymatiques, les cellulases sont inhibées principalement par leurs propres produits (Ladisich *et al.*, 1983; Saddler, 1986; Holtzaple *et al.*, 1990).

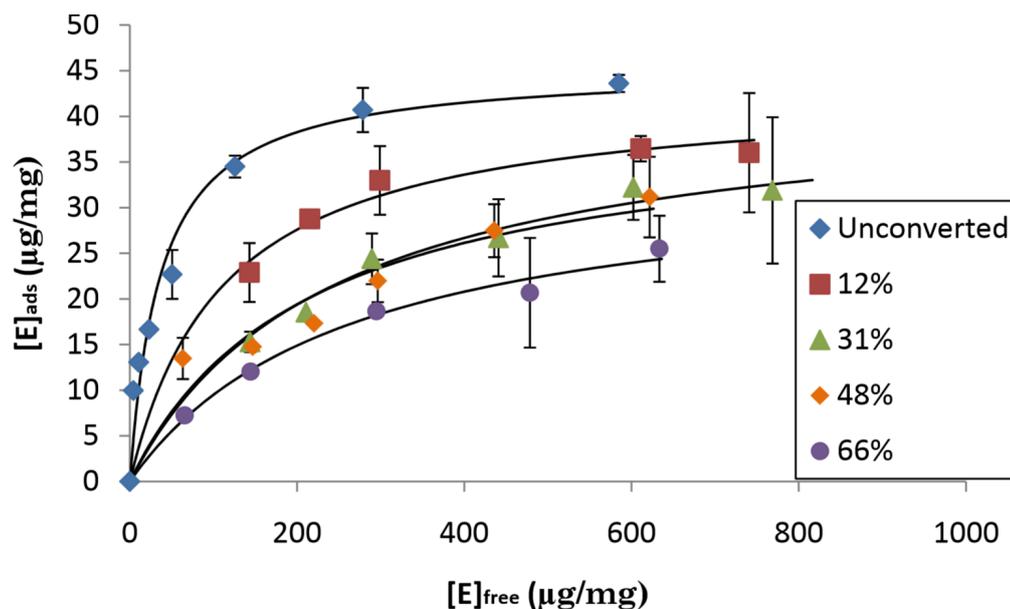


FIGURE I.4 – Données d'adsorption (symboles) à différents taux de conversion fittés par des isothermes de Langmuir (continu) pour un substrat de type Avicel PH-101 et un cocktail de *T. reesei* (Bansal, 2011).

Ainsi, les CBH et les EG sont inhibées par l'accumulation du cellobiose (Lee & Fan, 1983; Gregg & Saddler, 1995). Nombre de chercheurs affirment que ces deux types de cellulases sont même sensibles à la présence du glucose dans le milieu réactionnel (Holtzapple *et al.*, 1984; Holtzapple *et al.*, 1990; Xiao *et al.*, 2004) mais avec un effet beaucoup moins important que le cellobiose. Quant aux BGL, elles sont inhibées par le glucose (Holtzapple *et al.*, 1990). Comme conséquence directe, l'inhibition provoque une chute de la vitesse d'hydrolyse et donc des taux de conversion faibles. Cet effet est illustré dans la Figure I.5 où du papier filtre à 5 % et 20 % massique est hydrolysé avec et sans ajout de glucose initialement (Kristensen *et al.*, 2009). La présence du glucose dans le réacteur provoque l'inhibition des cellulases et par conséquent le taux de conversion chute considérablement notamment pour la réaction à faible charge en substrat.

Pour juguler cet effet, conséquence de l'accumulation rapide des sucres produits, différentes techniques sont proposées telles que l'utilisation de concentrations élevées en enzymes, l'ajout séquentiel des BGL (Avramidis & Siau, 1987; Breuil *et al.*, 1990) ou bien la fermentation des sucres dès leur production (procédé SSF : Simultaneous Saccharification and Fermentation) (Saddler *et al.*, 1982; Mes-Hartree *et al.*, 1987; Szczodrak & Targoński, 1989). Andrić *et al.* ont récapitulé les différents travaux concernant ce facteur important (Andrić *et al.*, 2010; Andrić *et al.*, 2010).

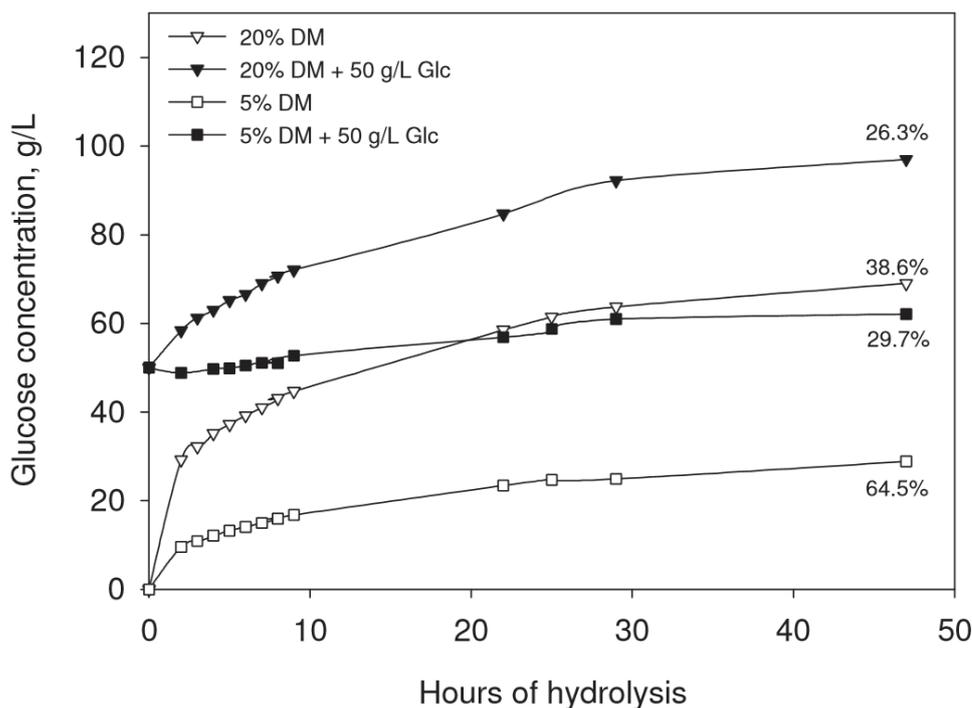


FIGURE I.5 – *Hydrolyse enzymatique du papier filtre à deux charges différentes en matière sèche (DM : Dry Matter) avec et sans ajout du glucose initialement (Kristensen et al., 2009). Les conversions finales (en %) sont données à droite.*

I.3.4 Désactivation des cellulases

Il est généralement admis que les cellulases sont sensibles à des degrés différents selon leur nature et peuvent être désactivées en contact d'une interface gaz-liquide (Reese & Ryu, 1980). Elles peuvent être thermiquement instables et/ou désactivées mécaniquement par le mélange ainsi que par le pH du milieu réactionnel (Ganesh *et al.*, 2000; Naidu & Panda, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Une fois encore, il est difficile de quantifier chaque phénomène puisque non seulement chaque enzyme selon sa nature aura une sensibilité différente mais si elle est désactivée en contact d'une interface gaz-liquide, le mélange va accentuer ce phénomène en ramenant continuellement à la surface de nouvelles enzymes. Dans ce cas, si on s'intéresse uniquement au mélange, on pourra vite conclure qu'il provoque la désactivation des enzymes, ce qui n'est pas vraiment le cas. Ainsi, la notion de l'âge des enzymes pourrait contribuer à minimiser cet effet et apporter des solutions au niveau *procédé* en optimisant l'ajout séquentiel d'enzymes à titre d'exemple.

I.4 Facteurs liés aux conditions opératoires

La réaction d'hydrolyse, en plus des paramètres relatifs au substrat et aux biocatalyseurs utilisés, est sensible aux conditions opératoires, essentiellement la température, le pH et le mélange.

Toutes les enzymes, en tant que protéines, sont sensibles à la température et généralement caractérisées par un intervalle d'optimalité autour de 40 à 50 ° C. Des températures élevées les dénaturent complètement tandis que les températures basses les inhibent (Andreas *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2013). Les enzymes sont aussi sensibles au pH de la solution où elles évoluent, et selon leur nature, elles n'ont pas nécessairement le même pH pour une activité optimale (Chen *et al.*, 2012). Néanmoins, très peu d'études sont consacrées à ces deux paramètres pour des cinétiques à longue durée.

L'effet de l'agitation sur la vitesse d'hydrolyse se pose généralement lors du changement d'échelle et le passage à des volumes importants ainsi que lors de l'utilisation de charges importantes en substrat. Différentes études ont montré que l'agitation a un effet direct sur la vitesse de conversion (Sakata *et al.*, 1985; Lavenson *et al.*, 2012). Le mélange favorise le contact enzymes-substrat et donc l'adsorption des enzymes, il homogénéise les concentrations des produits et réduit de ce fait l'effet d'inhibition en limitant l'accumulation des produits au voisinage de la zone d'activité des enzymes. Il peut jouer aussi au niveau de la structure particulaire du substrat en favorisant la rupture et donc l'augmentation de la surface disponible pour les enzymes (Kadić *et al.*, 2014). De ce fait, différentes stratégies de mélange ont été testées, soit à différentes vitesses d'agitation ou en alternant plusieurs vitesses afin d'optimiser à la fois la conversion et la consommation énergétique (Ingesson *et al.*, 2001; Pal & Chakraborty, 2013; Palmqvist *et al.*, 2011). En contre partie, des contraintes de cisaillement élevées peuvent provoquer une désactivation des enzymes (Ganesh *et al.*, 2000).

I.5 Conclusion

L'ensemble des facteurs que nous venons d'évoquer, qu'ils soient liés à la nature et aux propriétés du substrat, à la nature du biocatalyseur ou aux conditions opératoires, sont combinés les uns aux autres d'où la difficulté de quantifier l'effet d'un seul paramètre sans tenir compte de la totalité du système. A titre d'exemple, un prétraitement visant

à modifier la composition chimique du substrat telle que la délignification aura pour conséquence une modification d'un paramètre structural qui est l'accessibilité des enzymes aux fractions hydrolysables et affecte aussi la distribution de taille des pores (Mansfield *et al.*, 1999). De même, le broyage du substrat induit une diminution de la taille moyenne des particules mais aussi une modification de sa cristallinité et une augmentation de sa surface spécifique.

Il convient de signaler aussi que la plupart de ces facteurs évoluent au cours de la réaction d'hydrolyse avec des interactions mutuelles modifiant l'état du substrat (taille des particules, DP, l'accessibilité, ...) et les enzymes perdent progressivement leur pouvoir hydrolytique (inhibition, désactivation, adsorption non productive, ...), ce qui a comme conséquence la diminution progressive de la vitesse globale de la réaction et donc une hydrolyse partielle du substrat en dépit du temps de la réaction et de la charge en enzymes élevés (Figure I.6).

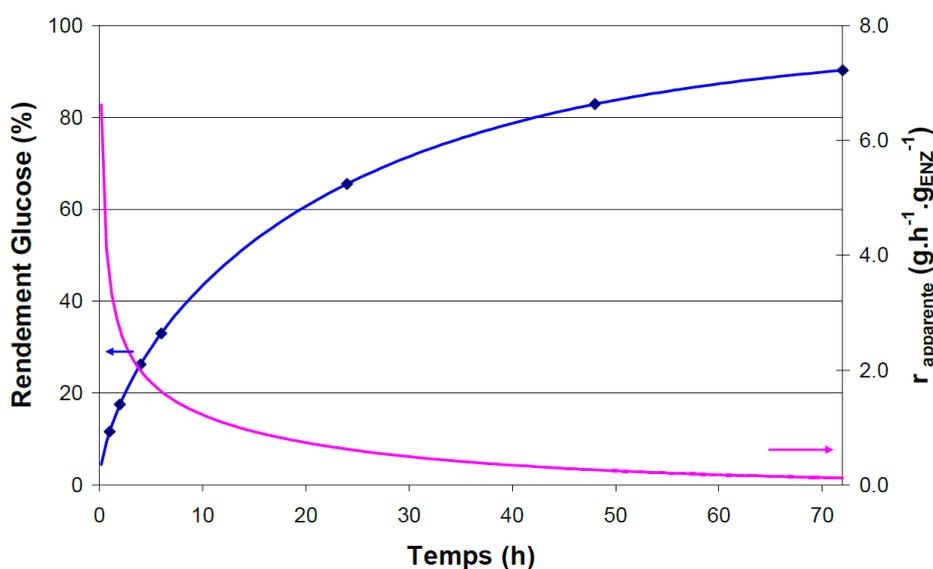


FIGURE I.6 – Évolution de la conversion en sucres simples et de la vitesse apparente durant l'hydrolyse enzymatique d'un substrat de type Avicel PH-101 (Chauve, 2011)

I.6 Outils de caractérisation

Pour caractériser à la fois le substrat initial et l'évolution de ses différentes propriétés durant l'hydrolyse enzymatique mais aussi l'avancement de la réaction au sens large

(conversion en sucres simples), un nombre important de techniques expérimentales existe dans la littérature. Nous abordons dans cette section les techniques les plus répandues.

I.6.1 Outils analytiques

La façon la plus simple de suivre dans le temps une activité enzymatique sur un substrat donné est de quantifier les produits de la réaction en question, c'est à dire les sucres réducteurs et/ou simples. Pour cela, différentes techniques sont utilisées et généralement combinées pour avoir une information la plus complète et précise possible.

I.6.1.1 Sucres réducteurs

Les extrémités réductrices des sucres sont des fonctions aldéhydes qui peuvent être oxydées en fonctions carboxyliques en présence d'un oxydant tel que l'acide dinitrosalicylique (DNS) en milieu chaud et alcalin. Le DNS initialement de couleur jaune vire en orangé-rouge après réaction, dosable par spectrophotométrie (Miller, 1959; Ghose, 1987).

Le protocole DNS est simple à mettre en place, très peu coûteux et rapide et peut même être automatisé (Decker *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2010), raisons pour lesquelles il est largement utilisé à la fois pour le suivi de la réaction d'hydrolyse et pour caractériser l'activité des cellulases. Néanmoins, la précision et la fiabilité de cette méthode sont remises en cause. En effet, la gamme d'étalonnage lors du dosage est souvent basée sur du glucose alors que dans les échantillons analysés, tous les polysaccharides (avec différents poids moléculaires) réagissent. De plus, les volumes des réactifs utilisés, le temps d'incubation et la longueur d'onde (pour la spectrophotométrie) sont autant de paramètres qui affectent considérablement la qualité des résultats et de ce fait, doivent être optimisés, ce qui n'est pas toujours le cas (Coward-Kelly *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2012).

La méthode dite de Nelson et Somogyi (Nelson & others, 1944; Somogyi, 1952) est plus précise et permet de combler un certain nombre d'inconvénients de la méthode DNS (Gusakov *et al.*, 2011). Elle est basée sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les polysaccharides réducteurs en milieu alcalin. Les ions Cu^+ ainsi formés réagissent à leur tour avec un réactif arséno-molybdique pour donner une coloration bleue. Comme le DNS, un dosage spectrophotométrique permet la quantification des sucres réducteurs.

D'autres méthodes existent telles que l'utilisation du ferricyanide de potassium (Cole, 1933) ou l'acide 4-hydroxybenzoïque hydrazide (Lever, 1972) mais elles sont moins répandues.

I.6.1.2 Sucres simples

Pour quantifier les oligosaccharides ($DP = 1 - 6$) produits durant la réaction d'hydrolyse, des méthodes chromatographiques sont utilisées telles que la Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) ou la chromatographie échangeuse d'ions (Cataldi *et al.*, 2000). Ces techniques basées sur l'interaction entre les oligosaccharides et la phase stationnaire couplées avec des détecteurs spécifiques permettent la séparation et la quantification des sucres avec une grande précision.

Dans le cas où l'objectif est uniquement la concentration en glucose, des méthodes plus simples peuvent être utilisées. On peut citer à titre d'exemple le glucostat dont le principe est basé sur l'oxydation du glucose avec l'enzyme glucose oxidase. La mesure de la quantité d'oxygène consommée permet l'accès à la concentration du glucose (Chauve, 2011).

I.6.2 Caractérisation physique et physico-chimique du substrat

Comme discuté dans la première partie, la nature et les propriétés du substrat jouent un rôle capital lors de l'hydrolyse enzymatique, raison pour laquelle une caractérisation fine et multi-échelle est nécessaire. Une panoplie de techniques expérimentales issues de différents domaines scientifiques sont adaptées et utilisées.

I.6.2.1 Composition du substrat

Pour remonter à la composition d'un substrat (fractions lignine, hémicellulose et cellulose), une hydrolyse acide complète (à l'acide sulfurique) est généralement réalisée (suivant le protocole décrit dans (Sluiter *et al.*, 2007) par exemple). L'hydrolysate est analysé par HPLC pour la détermination des concentrations en sucres simples et donc la teneur en cellulose et hémicellulose. La fraction insoluble est constitué majoritairement de lignine (en plus des cendres et des protéines insolubles). La partie de lignine solubilisée est déterminée par spectroscopie UV-visible (Chauve, 2011). Cette méthode destructive donne une information exclusivement quantitative sur la composition du substrat et

nécessite des temps longs (au minimum un jour).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une alternative prometteuse qui attire de plus en plus de recherches. Cette technique d'analyse non destructive est basée sur l'interaction rayonnement-matière dans le domaine infrarouge (IR : longueur d'onde entre 0.7 et 50 μm) puisque la majorité des molécules organiques et inorganiques vibrent à des fréquences identiques à celles de l'IR (généralement dans le moyen IR : longueur d'onde entre 2.5 et 25 μm). La substance étudiée est irradiée avec un faisceau ayant des longueurs d'onde connues et le faisceau réfléchi ou transmis est analysé. Les éléments chimiques de la substance (composition et nature des liaisons inter- et intra-moléculaires) absorbent à des longueurs d'onde spécifiques et laissent ainsi leur empreinte sur le faisceau en sortie (Essendoubi, 2007). Dans le cas de la lignocellulose (substrat solide), l'analyse par réflexion (généralement en mode ATR : Attenuated Total Reflectance) est utilisée.

Adapa et al. proposent une étude bibliographique sur les fréquences d'absorption des constituants de lignocelluloses d'origines différentes (pailles de blé et d'orge, sons de maïs et d'avoine, ...) (Adapa et al., 2009). Les composés aromatiques de la lignine absorbent autour d'une fréquence de 1510 cm^{-1} (Stewart et al., 1995a; Yu, 2005) alors qu'une multitude de fréquences sont caractéristiques de la cellulose (selon la liaison considérée et le type de vibration) (Chen et al., 1997; Yu, 2005; Schulz & Baranska, 2007). Très peu d'études sont dédiées par contre à l'hémicellulose (Chen et al., 1997; Schulz & Baranska, 2007). Si la majorité des études sont qualitatives, une poignée tente d'exploiter l'intensité des pics d'absorption caractéristiques avec différentes méthodes pour remonter aux fractions des trois constituants notamment le taux de lignine (Faix, 1988; Emandi et al., 2011).

Les atouts de cette méthode sont sa rapidité, les quantités négligeables de substrat qu'elle nécessite et la simplicité du protocole expérimental. En contre partie, l'exploitation des spectres est une tâche complexe. L'information produite concerne la composition en surface en un point, ce qui peut poser problème dans le cas d'un substrat hétérogène.

I.6.2.2 Degré de polymérisation et distribution de taille

Le degré de polymérisation moyen d'un substrat cellulosique peut être déterminé en mesurant sa viscosité intrinsèque une fois dissout dans un solvant organo-métallique tel que la cupri-éthylène-diamine (CED). Evans et al. donnent le DP moyen en fonction de la viscosité intrinsèque selon la corrélation suivante (Evans & Wallis, 1989) :

$$DP^{0.9} = 1.65 \cdot [\eta] \quad (\text{I.2})$$

Avec η la viscosité intrinsèque en $mL.g^{-1}$.

Dans le cas d'un substrat soluble, la distribution de la masse molaire des chaînes cellulosiques (MMD : Molar Mass Distribution) donne une information complète sur les tailles des polymères présents en solution et peut être atteinte en utilisant la chromatographie d'exclusion stérique (SEC : Size-Exclusion Chromatography). Cette technique de séparation des macromolécules en solution est généralement couplée à différents types de détecteurs (réfractomètre différentiel, spectromètre UV, détecteur à diffusion de lumière multi-angles MALLS, ...) (Saake *et al.*, 2001; Schult *et al.*, 2002; Eremeeva, 2003). Cette technique peut être utilisée pour le suivi de l'évolution de la MMD durant la réaction d'hydrolyse enzymatique (Kleman-Leyer *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2007b; Zhang *et al.*, 2011). A partir de la MMD, la masse molaire moyenne en nombre (équation I.3) et/ou en volume (équation I.4) peuvent être estimées, ce qui permet de remonter au DP moyen via la masse molaire du motif élémentaire.

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (\text{I.3})$$

$$M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} \quad (\text{I.4})$$

Avec M_i la masse molaire du polymère i et n_i sa fraction en nombre.

Dans le cas d'un substrat particulaire, la distribution de taille est accessible expérimentalement avec les différentes techniques d'analyses granulométriques.

En voie sèche et avec une plage de tailles de quelques centaines de micromètres à quelques millimètres, le tamisage peut être utilisé pour caractériser la granulométrie

du substrat initial (Del Rio *et al.*, 2012). Néanmoins cette technique nécessite de grandes quantités de substrat et n'est donc pas adéquate pour un suivi continu dans le cas de l'hydrolyse. De plus, elle est limitée à des tailles relativement grandes ($>100 \mu\text{m}$).

Une technique de plus en plus répandue est la granulométrie laser dont le principe est basé sur la diffraction de la lumière incidente à l'encontre d'une particule en suspension (Figure I.7). L'intensité et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules, de leur indice de réfraction et de la concentration du milieu. Le fondement théorique est donné par la théorie de Fraunhofer complétée par la théorie de Mie. L'intervalle de détection varie entre quelques dizaines de nanomètres à quelques centaines de micromètres avec l'hypothèse de la sphéricité des particules et le résultat brut est donné en fractions volumiques de diamètres équivalents. Cette technique est largement utilisée pour sa simplicité et sa rapidité mais ne donne aucune information sur la forme des particules ni leur concentration (Silva *et al.*, 2012; Khullar *et al.*, 2013).

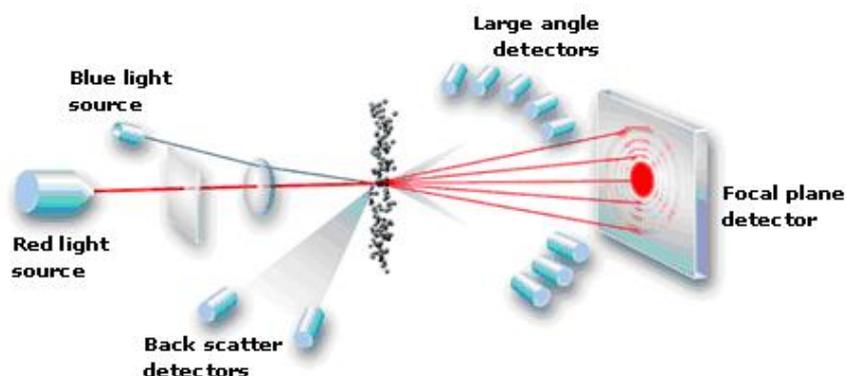


FIGURE I.7 – Schéma illustratif de la diffraction laser (lumières bleue et rouge) à l'encontre de particules en suspension ¹

Pour avoir une idée sur la forme des particules et suivre l'évolution de leurs propriétés morphologiques durant l'hydrolyse, des techniques de visualisation couplées avec un traitement d'images approprié sont de plus en plus utilisées. Ces techniques sont développées à la fois en voie sèche et en voie liquide suivant différents dispositifs expérimentaux selon le besoin (Chinga-Carrasco *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2013; Kinnarinen & Häkkinen, 2014).

1. ©Malvern Instrument Ltd

I.6.2.3 Cristallinité

Pour caractériser la microstructure d'un substrat solide, la technique de diffraction des rayons X (WAXS : Wide-Angle X-ray Scattering) est la plus utilisée. L'exploitation du spectre de diffraction pour remonter à l'indice de cristallinité du substrat analysé peut se faire moyennant différentes méthodes analytiques (Bansal *et al.*, 2010). Segal et al. proposent la corrélation (équation I.5) pour estimer la fraction cristalline (CrI) à partir de la hauteur de deux pics (relatifs aux fractions cristalline et amorphe) par rapport à une ligne de base (Segal *et al.*, 1959).

$$CrI(\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \cdot 100 \quad (I.5)$$

I_{002} est le maximum d'intensité du pic pour $2\theta = 22^\circ$ (fraction cristalline) et I_{am} le minimum d'intensité du pic pour $2\theta = 18^\circ$ (fraction amorphe) comme illustré sur la Figure I.3 (Park *et al.*, 2010).

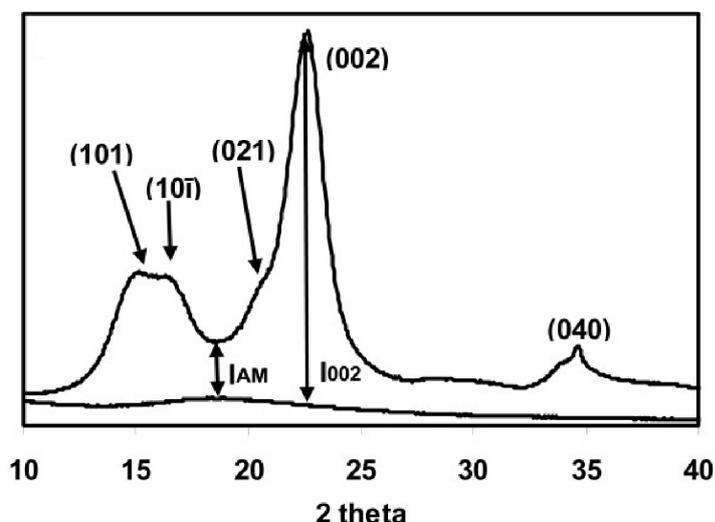


FIGURE I.8 – Spectre de diffraction aux rayons X d'une cellulose microcristalline (Avicel PH-101) illustrant la méthode d'évaluation du taux de cristallinité par la hauteur des pics (Park *et al.*, 2010)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (^{13}C -RMN) en phase solide en utilisant les techniques de l'angle magique (MAS : Magic Angle Spinning) et de la polarisation croisée (CP : Cross-Polarization) est aussi largement utilisée (Hult *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2009). Cette technique permet l'étude de la nature des liaisons chimiques présentes dans l'échantillon analysé et donc remonter à la cristallinité du substrat

(Berlitz, 2007). Elle donne des résultats précis mais nécessite des temps d'acquisition longs pour avoir une bonne résolution et perd sa précision pour des substrats à faible taux de cristallinité (Bansal *et al.*, 2010).

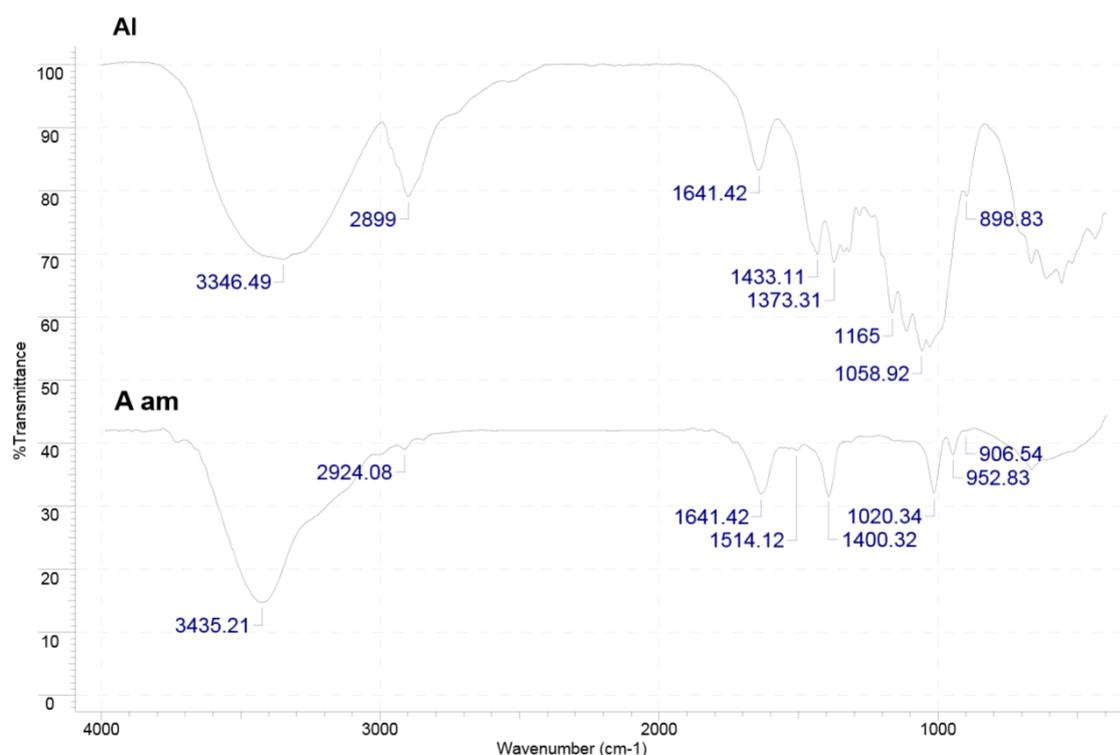


FIGURE I.9 – Spectres FTIR d'une cellulose microcristalline (Avicel PH-101) avant et après prétraitement (Ciolacu *et al.*, 2011)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est aussi utilisée pour quantifier le taux de cristallinité d'un substrat. Différents pics sont utilisés du fait du polymorphisme de la cellulose qui dépend de sa nature et des prétraitements appliqués (O'Sullivan, 1997). O'Connor *et al.* proposent d'utiliser le ratio des pics $1429\text{ cm}^{-1}/894\text{ cm}^{-1}$ (O'Connor *et al.*, 1958). Nelson et O'Connor utilisent le ratio surfacique $1372\text{ cm}^{-1}/2900\text{ cm}^{-1}$ qu'ils valident par comparaison avec la méthode de diffraction des rayons X (Nelson & O'Connor, 1964). Ciolacu *et al.* ont utilisé ces deux ratios sur différents types de substrats avec et sans prétraitement puis comparé les résultats avec la méthode de diffraction des rayons X (Ciolacu *et al.*, 2011). Nous donnons à titre d'exemple les spectres FTIR d'une cellulose microcristalline avant et après prétraitement visant à la rendre amorphe (Figure I.4).

Comme la FTIR, la spectroscopie Raman (éventuellement à transformée de Fourier)

est aussi de plus en plus utilisée et peut compléter la FTIR dans certain cas ([Schenzel et al., 2005](#); [Adapa et al., 2009](#)).

Nous avons donné ici une analyse très rapide de quelques techniques expérimentales utilisées pour la caractérisation des substrats à différentes échelles. Ces techniques sont dans la plupart des cas complémentaires et permettent le suivi de l'évolution des propriétés du substrat et de sa conversion durant la réaction d'hydrolyse.

I.7 Approches de modélisation

Une littérature abondante relative à la modélisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique de la (ligno)-cellulose existe, elle a fait l'objet de plusieurs reviews ([Zhang & Lynd, 2004](#); [Bansal et al., 2009](#); [Sousa Jr et al., 2011](#)). Cette réaction hétérogène s'effectue en plusieurs étapes ([Hosseini & Shah, 2011b](#)) :

1. Transfert de l'enzyme de la phase continue à la surface des particules du substrat
2. Adsorption de l'enzyme sur le substrat et formation d'un complexe enzyme-substrat
3. Transfert d'une molécule d'eau au complexe formé
4. Rupture d'une liaison glycosidique
5. Désorption complète de l'enzyme (EG) ou du CD uniquement (CBH)
6. Transfert du produit de la réaction dans le milieu continu
7. Hydrolyse du produit (cellobiose) en glucose par les BGL

La complexité du mécanisme réactionnel en plus des différents paramètres décrits auparavant qui interviennent à un moment ou à un autre font de la modélisation de cette réaction une tâche délicate. Différents modèles sont proposés, ils peuvent être divisés en deux grandes classes : les modèles cinétiques et les modèles mécanistiques.

I.7.1 Approches cinétiques

Cette classe englobe les modèles décrivant l'évolution de la conversion du substrat (concentrations en sucres simples : cellobiose, glucose et éventuellement xylose) en mode batch à partir de la connaissance de la concentration initiale globale du substrat quelque soit l'expression mathématique utilisée. On distingue les modèles empiriques, les modèles

basés sur l'équation de Michaelis-Menten et les modèles qui prennent en compte l'adsorption des enzymes.

I.7.1.1 Modèles empiriques

Les modèles empiriques sont basés sur des corrélations reliant la vitesse d'hydrolyse en termes de production de sucres ou de conversion à une ou plusieurs caractéristiques du substrat, du biocatalyseur et/ou du milieu réactionnel. Ces modèles aident à mieux comprendre et à quantifier l'effet d'un paramètre donné sur la cinétique globale de la réaction. Ainsi, toute une série de facteurs a été passée en revue : degré de cristallinité (Chang & Holtzapple, 2000; Laureano-Perez *et al.*, 2005), taux de lignine (Gharpuray *et al.*, 1983; Kim & Holtzapple, 2006), concentrations en enzymes (Park *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2009), température et pH (Vásquez *et al.*, 2007)... etc.

Le grand handicap de ce type de modèles réside dans le fait qu'ils ne peuvent pas être extrapolés au-delà des conditions qui ont permis leur développement néanmoins, dans le cas où des banques de données importantes existent sur l'effet d'un paramètre par exemple, des modèles statistiques peuvent être développés (O'Dwyer *et al.*, 2007).

I.7.1.2 Modèles de Michaelis-Menten

Le modèle de Michaelis-Menten (MM) a été développé initialement pour décrire des réactions en phase homogène (Michaelis & Menten, 1913), donc il est plus adapté pour décrire les cinétiques enzymatiques d'un substrat soluble telle que l'action des β -glucosidases sur le cellobiose. Il repose sur le schéma réactionnel suivant :



E : Enzymes libres

S : Substrat

ES : Complexe Enzyme/Substrat

P : Produit

k_1 : Constante de formation du complexe ES

k_{-1} : Constante de dissociation du complexe ES

k_2 : Constante de formation du produit P

En mode batch, la vitesse de formation du produit P peut s'écrire comme :

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (\text{I.7})$$

où $[]$ désigne la concentration.

En appliquant l'hypothèse de l'état quasi-stationnaire au complexe ES , nous avons :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] + k_2[ES] = 0 \quad (\text{I.8})$$

d'où :

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}[E][S] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (\text{I.9})$$

Par ailleurs, nous avons à partir du bilan de matière sur les enzymes :

$$[E]^0 = [E] + [ES] \quad (\text{I.10})$$

En combinant les équations (I.9) et (I.10), nous obtenons :

$$[ES] = \frac{[E]^0[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{I.11})$$

L'équation de la vitesse (I.7) s'exprime alors comme :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]^0[S]}{\frac{k_{-1}+k_2}{k_1} + [S]} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (\text{I.12})$$

Pour caractériser la capacité hydrolytique d'une enzyme ou d'un cocktail d'enzymes donné, il conviendrait de se mettre dans des conditions favorables à l'activité des enzymes, en d'autres termes éviter les phénomènes d'inhibition par les produits, de désactivation et de perte en activité sur des temps longs, cela reviendrait donc à ne s'intéresser qu'aux temps initiaux où tous ces phénomènes indésirables sont négligeables. Les constantes du modèle pour un cocktail donné s'obtiennent alors en faisant varier la concentration initiale du substrat et en linéarisant l'équation (I.12).

Néanmoins, même en s'intéressant aux vitesses initiales, l'utilisation d'un substrat particulière pose problème dès lors que les phénomènes de diffusion (des enzymes et des produits) et d'accessibilité aux fractions hydrolysables interviennent. L'extension de ce modèle pour les cinétiques longue durée où plusieurs phénomènes se superposent est l'une des façons les plus simples pour modéliser la réaction d'hydrolyse enzymatique de la cellulose (Huang, 1975; Beltrame *et al.*, 1984; Nidetzky *et al.*, 1994; Bezerra & Dias, 2005; Shin *et al.*, 2006; Drissen *et al.*, 2007) mais dans ce cas, les constantes cinétiques du modèle perdent leur sens physique et ne sont que des grandeurs apparentes accessibles expérimentalement. En d'autres termes, il ne reste du modèle de Michaelis-Menten que l'expression mathématique.

Dans l'équation (I.12), la concentration du substrat $[S]$ dépend du temps t puisque des fractions sont solubilisées. Pour pouvoir intégrer cette équation, il faudrait expliciter $[S](t)$. En faisant un bilan de matière sur le substrat (dans un système batch), nous avons :

$$[S]^0 = [S] + \alpha[P] \quad (\text{I.13})$$

où $[S]^0$ est la concentration initiale en substrat, α est le coefficient stœchiométrique lors de la formation du produit P (dû à l'hydratation des liaisons β -glycosidiques).

En introduisant l'équation (I.13) dans l'équation (I.12) avec l'hypothèse d'une stœchiométrie unitaire pour simplifier ($\alpha = 1$), nous obtenons :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m ([S]^0 - [P])}{K_m + [S]^0 - [P]} \quad (\text{I.14})$$

L'intégration de l'équation (I.14) donne l'évolution temporelle de la concentration du produit. Il faut noter que dans ce cas précis, la seule limitation est la concentration du substrat, la vitesse de la réaction s'annule une fois la totalité du substrat convertie.

Dès lors qu'on s'intéresse aux cinétiques sur des temps longs, un des phénomènes limitants les plus critiques est l'inhibition des activités enzymatiques par leurs propres produits. Différents mécanismes d'inhibition sont proposés dans la littérature (Andric *et al.*, 2010) classés en trois grandes classes : compétitive, noncompétitive et incompétitive (Chauve, 2011). Le schéma d'une inhibition compétitive est le plus utilisé dans le cas des cellulases.

Il devient alors indispensable d'incorporer ce phénomène dans le modèle de Michaelis-Menten. Dans le cas d'une inhibition compétitive, une étape de complexation de l'enzyme avec le produit se met en place en parallèle avec la réaction principale :



La vitesse d'hydrolyse s'écrit alors comme suit :

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m ([S]^0 - [P])}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_p}\right) + [S]^0 - [P]} \quad (\text{I.16})$$

Où K_p est la constante d'inhibition.

Ce modèle est largement utilisé puisque son expression mathématique simple permet d'ajuster des données expérimentales spécifiques de l'hydrolyse, en identifiant les constantes K_m et V_m .

I.7.1.3 Modèles prenant en compte l'adsorption

Comme mentionné précédemment, l'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose est une réaction hétérogène où l'adsorption des enzymes est une étape clé du mécanisme réactionnel global. En effet, la vitesse de dégradation du substrat dépend directement de la quantité d'enzymes adsorbées actives. Il conviendrait, de ce fait, de tenir compte de cette étape lors de la modélisation de la réaction d'hydrolyse.

Kadam et al. ont développé un modèle d'hydrolyse d'un substrat constitué de cellulose et d'hémicellulose où trois mécanismes réactionnels sont mis en place. Il s'agit de deux réactions hétérogènes où la cellulose est transformée en cellobiose (r_1) et en glucose (r_2) et d'une réaction homogène de conversion du cellobiose en glucose (r_3) (Kadam *et al.*, 2004). L'adsorption des cellulases est modélisée par des isothermes de Langmuir (équation I.1). De plus, une inhibition compétitive des activités enzymatiques par les sucres simples (cellobiose : C_C , glucose : C_G et xylose : C_X) est incorporée via les constantes d'inhibition K_{iC} , K_{iG} et K_{iX} respectivement. La réaction homogène (r_3) suit une loi Michaelienne.

$$r_1 = \frac{k_{1r} E_{1b} R_S S}{1 + \frac{C_C}{K_{1iC}} + \frac{C_G}{K_{1iG}} + \frac{C_X}{K_{1iX}}} \quad (\text{I.17})$$

$$r_2 = \frac{k_{2r}(E_{1b} + E_{2b})R_S S}{1 + \frac{C_C}{K_{2IC}} + \frac{C_G}{K_{2IG}} + \frac{X}{K_{2IX}}} \quad (\text{I.18})$$

$$r_3 = \frac{k_{3r}E_{2f}C_C}{K_{3M} \left(1 + \frac{C_G}{K_{3IG}} + \frac{C_X}{K_{3IX}}\right) + G_2} \quad (\text{I.19})$$

Étant donné la difficulté expérimentale inhérente à l'évaluation des paramètres des isothermes d'adsorption le long du processus de transformation, le problème est réduit à la caractérisation uniquement des propriétés d'adsorption du substrat initial dans la plupart des cas. L'évolution des propriétés du substrat durant la réaction modifie l'équilibre d'adsorption comme montré par Hong et al. qui, en travaillant sur un substrat de type Avicel, ont constaté que la quantité maximale d'enzymes adsorbable E_{max} décroît au fur et à mesure que la réaction avance du fait de la solubilisation du substrat (Hong *et al.*, 2007). De ce fait, un paramètre de réactivité du substrat R_S est rajouté au modèle. Ce paramètre, représentant le caractère dynamique de la transformation, est explicité sous forme d'une fonction mathématique décroissante, soit proportionnelle au rapport $(S(t)/S_0)$ (Kadam *et al.*, 2004; Khodaverdi *et al.*, 2011; Morales-Rodriguez *et al.*, 2011; Angarita *et al.*, 2015) ou une exponentielle négative ($e^{-\lambda t}$) (Ljunggren, 2005; Neto *et al.*, 2013).

Dans la continuité du travail de (Kadam *et al.*, 2004), Liao et al. proposent un modèle de dégradation d'un substrat lignocellulosique en considérant l'ensemble des activités comme une seule réaction inhibée par le glucose en tenant compte de l'adsorption via l'isotherme de Langmuir (Liao *et al.*, 2008).

$$r = \frac{kC_{eff}EC}{1 + \frac{C_G}{K_{IG}}} \quad (\text{I.20})$$

Où C_{eff} est la concentration de la cellulose disponible pour les enzymes donnée par :

$$C_{eff} = \left(\frac{C}{C_0}\right)^\lambda C \quad (\text{I.21})$$

Avec C la concentration en cellulose, C_0 la concentration de la cellulose initiale et λ une constante. EC est la concentration d'enzymes adsorbées par la cellulose donnée par :

$$EC = \frac{E_b}{C + Lg + H}C \quad (\text{I.22})$$

Lg et H sont les concentrations en lignine et en hémicellulose respectivement.

Pour tenir compte de l'évolution de l'état du substrat et donc de ses propriétés d'adsorption durant la réaction, une relation empirique (équation I.23) donne l'évolution de la constante d'adsorption en fonction du temps.

$$K_{ad} = \frac{at}{b + t} \quad (\text{I.23})$$

Où a et b sont des constantes empiriques et t le temps.

Différents travaux ont repris le modèle de (Kadam *et al.*, 2004) en proposant des modifications pour pouvoir l'appliquer à différents types de substrats (Ljunggren, 2005), à des procédés fed-batch (Morales-Rodríguez *et al.*, 2010; Hodge *et al.*, 2009), à des procédés SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) (Morales-Rodríguez *et al.*, 2011) ou pour tenir compte de l'adsorption non-réactive sur la lignine (Zheng *et al.*, 2009).

La description de l'adsorption et de la désorption d'enzymes hors équilibre peuvent être décrites à l'aides d'équations cinétiques (Gan *et al.*, 2003). A titre d'exemple, l'adsorption des enzymes (E) sur la cellulose active (C) est schématisée par :



Elle est traduite par l'équation cinétique suivante :

$$\frac{dEC}{dt} = k_{C1}E \cdot C - k_{C2}EC + k_P EC \quad (\text{I.25})$$

Avec k_{C1} la constante d'adsorption sur la cellulose active, k_{C2} la constante de désorption de la cellulose active et k_P la constante de formation du produit.

Le même schéma est appliqué à la cellulose inactive ainsi qu'à la complexation réversible enzyme-produit. Puisque le substrat est constitué de surfaces active et inactive, la fraction de cellulose inactive est directement remplacée par l'indice de cristallinité

(Fan & Lee, 1983; Gan *et al.*, 2003). Étant donné le renouvellement de la surface du substrat au cours de la réaction, des termes d'évolution des surfaces active et inactive sont indispensables.

Cette étude pointe l'importance à la fois de la structure initiale du substrat (distribution de taille des particules, la cristallinité) et son évolution durant la réaction (évolution de la cristallinité et donc de l'adsorption inactive, évolution de l'accessibilité ...) comme deux éléments qui expliquent en grande partie le comportement macroscopique du système caractérisé par une vitesse de conversion initiale rapide puis un ralentissement progressif. Les modèles cinétiques tentent de traduire l'évolution du substrat au travers de lois macroscopiques s'appuyant sur la concentration totale en substrat sans tenir compte explicitement de l'évolution de la taille des particules.

I.7.2 Approches mécanistiques

Nous désignons par approches mécanistiques toutes les tentatives visant à modéliser la réaction d'hydrolyse sans utiliser la concentration du substrat comme variable globale mais introduisent une description fine du substrat, du mode d'action des enzymes et/ou des interactions accompagnant la conversion. Ces approches prennent en compte une ou plusieurs hétérogénéités du système au niveau structurel du modèle.

I.7.2.1 Modèles de chaînes polymères

L'une des toutes premières tentatives est celle d'Okazaki et Moo-Young qui ont proposé un modèle où la variable est le degré de polymérisation des chaînes cellulosiques qui évoluent suivant une cinétique Michaelienne (Okazaki & Moo-Young, 1978). Les trois principales activités cellulolytiques (EG, CBH et BGL) sont prises en compte ainsi que l'inhibition. Zhang et Lynd ont développé un modèle semblable donnant l'évolution du degré de polymérisation des chaînes suivant un mécanisme d'adsorption puis réaction sans tenir compte de l'activité des BGL ni de l'inhibition mais introduisent un facteur d'accessibilité des cellulases aux liaisons hydrolysables (qui reste constant le long de la réaction) et font la distinction entre les deux activités CBHI et CBHII (Zhang & Lynd, 2006). Les deux modèles traduisent l'effet de synergie Endo-Exo entre les EG et les CBH.

I.7.2.2 Modèles à cœur rétrécissant

Partant du constat que lors de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat particulière la taille des particules diminue durant la réaction, des modèles cinétiques à cœur rétrécissant sont proposés (Movagharnejad *et al.*, 2000; Movagharnejad & Sohrabi, 2003; Movagharnejad, 2005). Dans ce cas, le substrat est assimilé à des cylindres sur lesquels les enzymes d'adsorbent mais uniquement sur la surface externe avec l'hypothèse de l'absence d'une diffusion interne (taille des enzymes supérieure à celle des pores). L'adsorption suit une isotherme de Langmuir, les enzymes sont inhibées et la forme des particules est préservée. Ainsi, durant la réaction, le volume des particules diminue, de même pour leur surface ce qui fait chuter le nombre de sites accessibles et affecte négativement la vitesse de la réaction. Dans ce type de modèles, aucune distinction ne peut être faite entre les différentes activités cellulolytiques puisque leurs mécanismes élémentaires ne sont pas décrits à l'échelle de la particule.

I.7.2.3 Modèles stochastiques

Récemment, des modèles stochastiques basés sur une description fine de l'hydrolyse enzymatique à l'échelle moléculaire sont développés (Asztalos *et al.*, 2012; Kumar & Murthy, 2013). Dans le modèle d'Asztalos *et al.*, la surface réactive est représentée en 2D par un alignement de chaînes de cellulose de même taille liées par des liaisons hydrogènes. Chacune des molécules de glucose constitutives de cette maille est caractérisée par sept paramètres d'état qui évoluent dans le temps en fonction du type d'attaque subie. Les activités considérées sont les EG, CBHI et CBHII (Asztalos *et al.*, 2012). Kumar et Murthy considèrent une structure 3D du substrat cellulosique constitué de microfibrilles caractérisées par un indice de cristallinité (Figure I.10). Dans ce modèle aussi, chaque molécule de glucose est identifiée grâce à une série de paramètres et les trois activités cellulolytiques sont prises en compte (Kumar & Murthy, 2013). La résolution numérique de ces modèles est basée sur des méthodes de Monte-Carlo.

I.7.2.4 Modèles de bilan de population

Dans cette section, l'objectif n'est pas d'aborder les modèles de bilan de population au sens large mais de se limiter uniquement à leur application spécifique dans le cas de l'hydrolyse enzymatique. Si ce type de modèles est assez répandu en génie des procédés, plus

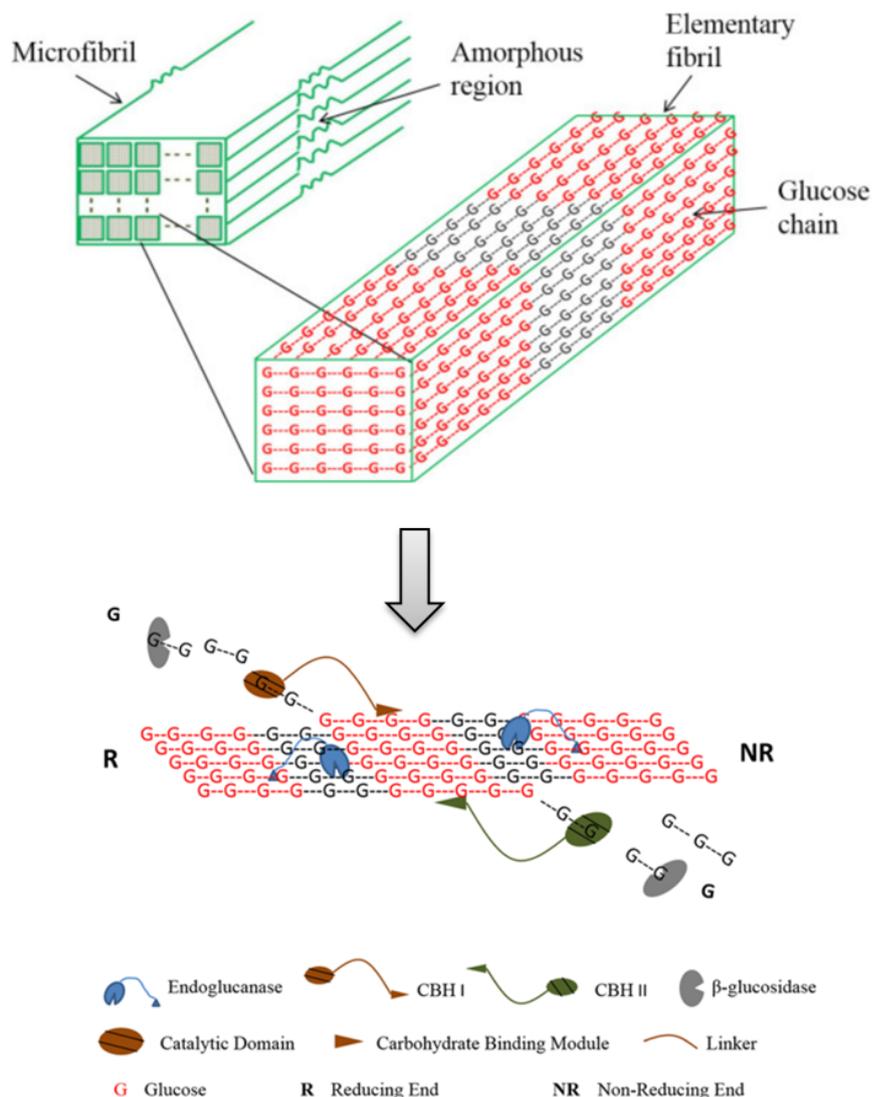


FIGURE I.10 – Structure de la microfibrille et de la fibrille élémentaire simulées dans le modèle de (Kumar & Murthy, 2013) avec les trois activités enzymatiques prises en compte. Les parties cristallines sont en rouge et en noir les parties amorphes.

particulièrement dans le cas des systèmes particuliers/dispersés (e.g cristallisation, flocculation, extraction liquide-liquide), ce n'est pas le cas pour les *bioprocédés*, moins encore dans l'application qui nous intéresse. Les quelques études disponibles dans la littérature sont décrites ci-après.

Dans le modèle de Hosseini et Shah, le formalisme du bilan de population est utilisé pour prédire l'évolution d'une distribution de chaînes subissant les attaques aléatoires des EG (Hosseini & Shah, 2011b) comme dans le cas d'un processus de dépolymérisation (Ziff & McGrady, 1985) et les attaques CBH sur les extrémités (Hosseini & Shah, 2011a) en se basant sur le travail de (Kostoglou, 2000). Toutes les tailles possibles sont prises en

compte ce qui signifie que le nombre d'équations à résoudre est égal au DP de la plus longue chaîne dans le système. L'activité BGL autant que l'inhibition ne sont pas prises en compte. Une démarche pour combiner les deux activités ainsi que la prise en compte d'autres phénomènes tels que la diffusion des enzymes par exemple est proposée mais n'est pas discutée. De même pour l'effet de synergie qui n'a pas été explicité.

Griggs et al. adoptent le même formalisme mais considèrent un substrat particulière sous forme de cylindres monodisperses composés d'un empilement de chaînes (Figure I.11) subissant les attaques des EG et CBH (Griggs *et al.*, 2012a). Les chaînes accessibles sont celles qui sont sur la surface externe des cylindres ($p_S(x)$) et durant la réaction, uniquement le rayon des cylindres (R) est fonction du temps alors que leur longueur (L) reste constante. Il est admis aussi qu'il n'y a pas de diffusion des enzymes dans les pores, une dimension structurelle qui complexifie considérablement le modèle. L'évolution de la conversion, les effets d'inhibition et de synergie ont été étudiés (Griggs *et al.*, 2012b).

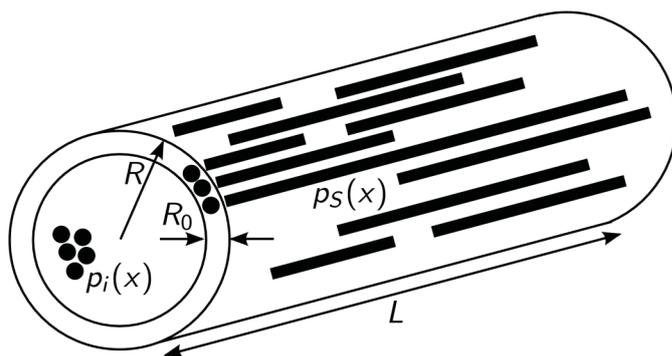


FIGURE I.11 – Schéma d'une particule cylindrique avec des chaînes surfaciques accessibles ($p_S(x)$) et des chaînes internes inaccessibles ($p_i(x)$) (Griggs *et al.*, 2012a)

I.8 Synthèse, position du problème et objectif de l'étude

Cette étude bibliographique jette la lumière sur la complexité de la réaction de transformation de la lignocellulose en sucres simples par le moyen de cocktails enzymatiques. Cette complexité se manifeste au niveau de la nature et des interactions au sein des systèmes enzyme-substrat et a comme conséquence directe la difficulté d'isoler et de quantifier expérimentalement l'effet d'un paramètre sur l'ensemble du système malgré le

recours à des techniques de plus en plus poussées.

L'hétérogénéité des substrats lignocellulosiques tant au niveau de leur composition (fractions lignine, hémicellulose et cellulose) que de leur structure (répartition des fractions lignine et hémicellulose, degré de cristallinité, porosité . . .) rend sa caractérisation délicate. Un grand nombre de techniques expérimentales sont proposées et ont été utilisées à la fois pour qualifier et quantifier ces différents aspects et leur évolution durant la réaction. Chaque technique, de par son principe physique et de par sa mise en œuvre aboutit à un type de données spécifiques qu'il convient d'interpréter avec précaution en se replaçant dans le contexte de l'étude afin d'éviter de tirer des conclusions hâtives. La cristallinité à titre d'exemple illustre bien cette dépendance à la technique de mesure comme mentionné auparavant. Cela est à dissocier bien évidemment de la qualité intrinsèque de la mesure qui est aussi un point très important.

Au-delà des facteurs liés aux propriétés du substrat, la nature des enzymes utilisées conditionne bien sûr la vitesse de l'hydrolyse. Les cocktails enzymatiques sont composés de différentes enzymes distinctes ayant chacune son mode d'action et sa sensibilité à l'environnement. L'action coopérative des enzymes aboutit à la modification progressive des propriétés du substrat et du milieu réactionnel. Ce double impact se met en place et se répercute sur l'ensemble du système y compris sur les enzymes elles-mêmes (Figure I.12). En effet, la réactivité du substrat diminue dans le temps puisque les fractions facilement hydrolysables sont converties préférentiellement et l'accessibilité chute. Simultanément, les concentrations en sucres simples dans le milieu réactionnel augmentent et inhibent les différentes activités enzymatiques. Comme conséquence directe de cette dynamique complexe du système, la vitesse globale de la réaction de transformation chute progressivement sans atteindre des taux de conversion satisfaisants même à des temps longs et à des charges en biocatalyseur importantes.

Le passage à l'échelle d'un procédé avec les contraintes que cela impose (design, type d'alimentation, hydrodynamique . . .) nécessite le développement d'un modèle fiable qui puisse apporter des réponses à l'ensemble de ces questionnements. Les modèles les plus utilisés dans la littérature sont basés sur des schémas cinétiques de type Michaelis-Menten ou d'adsorption en mode batch. La structure de ce type de modèles est simple avec une seule variable à savoir la concentration du substrat en phase liquide quelque soit son

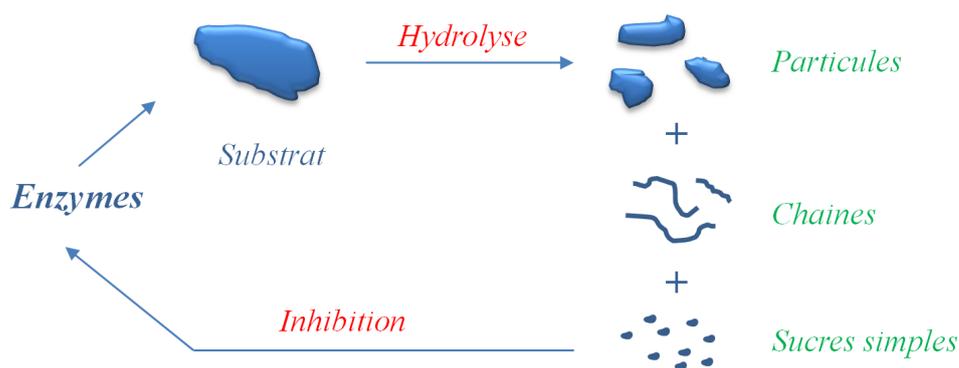


FIGURE I.12 – Schéma global de l'hydrolyse enzymatique : conséquences sur le substrat et les enzymes.

état (soluble, particulaire, composition, taille ...) et un certain nombre de paramètres globaux accessibles expérimentalement via un fitting de données typiques d'hydrolyse (évolution temporelle des concentrations en sucres produits). Pour gérer la complexité liée aux différents facteurs limitants, de nouveaux paramètres sont rajoutés aux modèles sans toutefois changer leur structure profonde. C'est le cas par exemple pour les effets d'inhibition, d'adsorption ou de désactivation. Néanmoins, rajouter l'adsorption, par exemple, sans disposer d'une information sur l'état et les propriétés du substrat n'a pas beaucoup de sens d'autant plus que ce substrat subit des modifications morphologiques et structurales importantes durant la réaction. De ce fait, la fiabilité de tels modèles est très limitée et ceux-ci perdent leur capacité prédictive et leur pertinence hors de leurs conditions d'établissement.

Se rendant compte du défaut structurel de ces modèles cinétiques, des tentatives pour proposer des approches qui se basent sur une ou plusieurs propriétés du substrat et/ou du biocatalyseur sont développées. La difficulté dans ce cas réside à la fois dans le choix de(s) la propriété(s) et dans la profondeur à laquelle le problème est traité puisque cela conditionne non seulement l'aspect expérimental (besoin de techniques appropriées pour alimenter le modèle et le valider) mais aussi l'aspect mathématique (besoin d'un outil suffisamment avancé et robuste pour accompagner ces choix). En effet, une description sommaire du système génère les mêmes insuffisances qu'avec les approches classiques (MM et adsorption) et une description fine de la réaction comme

dans le cas des modèles stochastiques requiert un formalisme mathématique complexe (et pas toujours compatible pour le changement d'échelle et les diverses interactions entre les composantes du système) et des moyens expérimentaux très lourds à mettre en œuvre.

Compte tenu de toutes ces considérations, l'objectif de ce travail est de développer un modèle générique pour décrire la réaction d'hydrolyse enzymatique de la cellulose qui prend comme variable la distribution de taille des particules/chaines du substrat (une hétérogénéité structurale) et comme paramètres les activités enzymatiques élémentaires. Le choix de la variable taille pourrait permettre de gérer avec efficacité la dynamique du système en intégrant les phénomènes limitants (e.g. évolution de la surface développée) d'une façon appropriée.

Le challenge étant de disposer d'un outil suffisamment avancé pour décrire l'action des enzymes et les conséquences sur les propriétés du substrat, suffisamment flexible pour intégrer l'ensemble des processus élémentaires et aborder les questions relative à la conception optimale d'un procédé. Pour cela, nous avons choisi de nous appuyer sur le formalisme de bilan de population. Cette approche a montré sa puissance dans la modélisation des systèmes dispersés (e.g. cristallisation, extraction liquide-liquide, systèmes diphasiques gaz-liquide) et offre une ouverture pour des extensions selon le besoin (e.g. couplage avec l'hydrodynamique, rajouter une ou plusieurs variables). Nous avons donc choisi de mettre en œuvre les outils éprouvés du Génie des Procédés pour traiter du cas de systèmes réactifs à phase dispersée (catalyse hétérogène, bilan de population) et d'y intégrer les connaissances spécifiques de la biocatalyse enzymatique.

Le développement de ce modèle se décline en deux grandes parties. La première partie est dédiée aux développements mathématiques à la fois analytiques et numériques nécessaires à la formulation et à la résolution du bilan de population dans le contexte de l'hydrolyse enzymatique. La deuxième partie est consacrée à la métrologie nécessaire pour alimenter le modèle et le confronter à l'expérience.

Chapitre II

Matériel et méthodes expérimentales

Comme mentionné dans le Chapitre I, cette étude comporte un volet expérimental visant à alimenter la partie modélisation. Ce chapitre est donc consacré à la description de cette partie expérimentale.

Nous abordons en premier lieu le dispositif expérimental à savoir les conditions générales de conduite des expériences, le(s) substrat(s) et les enzymes utilisés. En deuxième lieu, une description des outils de caractérisation biochimique et physique est donnée. L'accent sera mis sur l'interprétation des données expérimentales selon l'outil utilisé.

II.1 Dispositif expérimental

Les expériences d'hydrolyse sont conduites dans un réacteur muni d'une double enveloppe (pour la régulation thermique) de volume utile de 0.5 L et d'un couvercle pour minimiser l'évaporation. Pour s'affranchir de l'effet des conditions opératoires, celles-ci restent fixes autour de leurs valeurs optimales pour l'ensemble des expériences. La vitesse d'agitation est fixée à 200 rpm en utilisant un agitateur à quatre pales inclinées. La température est régulée autour de 40 °C à l'aide d'un thermostat en faisant circuler de l'eau chaude dans l'enveloppe du réacteur. Nous avons utilisé une solution tampon acétate 50 mM pour maintenir le pH à 4.8. De plus, une sonde pH et un thermomètre sont utilisés pour s'assurer que la température et le pH restent constant durant la réaction. Pour éviter le développement bactérien dans le milieu réactionnel, les solutions sont supplémentées avec de l'azide de sodium (NaN_3) à 0.1 % massique. Dans l'ensemble des expériences, sauf mention spécifique, la concentration en substrat est de 1 % massique et la durée est

de 144 h.

Pour le suivi de la réaction d'hydrolyse, des prélèvements séquentiels sont réalisés destinés aux différentes analyses physiques et biochimiques qui seront décrites ultérieurement. Un suivi *in-situ* et en continu de l'évolution de la distribution de taille des particules du substrat est assuré par une sonde FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement). Le schéma global du dispositif expérimental est donné dans la Figure II.1.

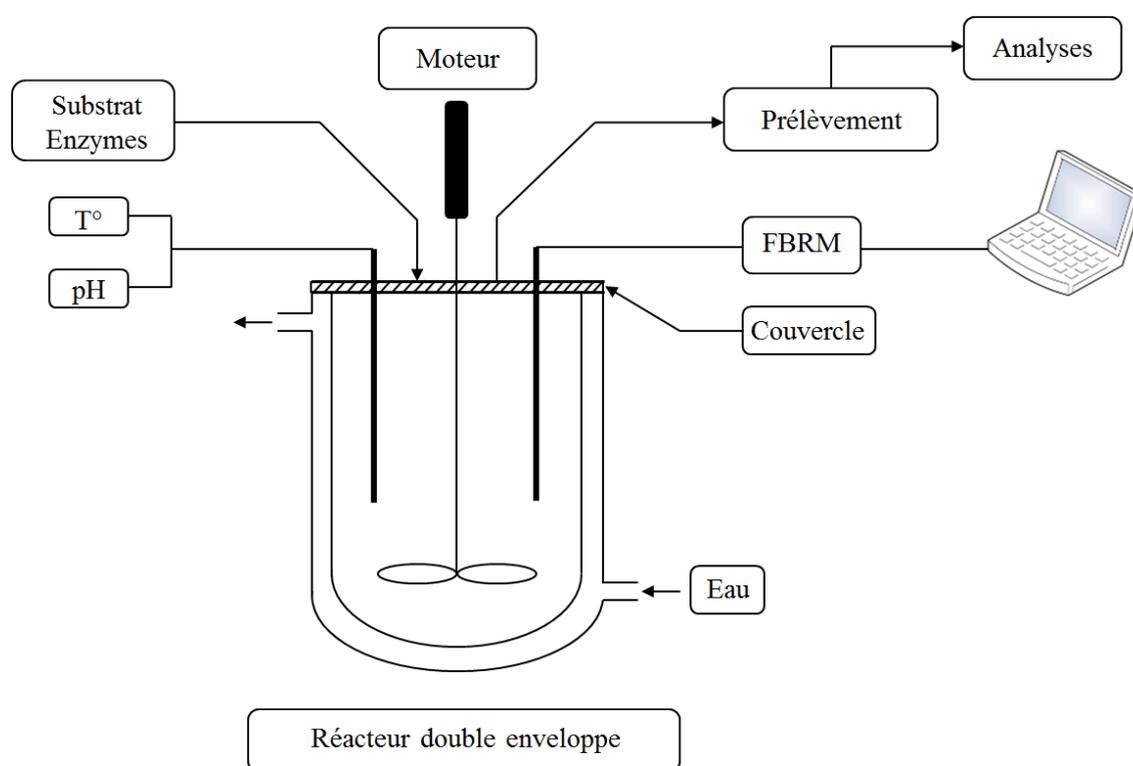


FIGURE II.1 – Dispositif expérimental utilisé pour la conduite des expériences d'hydrolyse

Pour bloquer l'action des enzymes, les prélèvements destinés aux différentes analyses sont plongés directement dans de l'eau bouillante ($T > 90 \text{ } ^\circ\text{C}$) pendant 10 mn et centrifugés à 2000 g pendant 10 mn pour séparer les phases liquide et solide si nécessaire avant d'être stockés à $-20 \text{ } ^\circ\text{C}$.

II.2 Substrats et enzymes

II.2.1 Substrats

Pour simplifier la démarche, nous avons choisi de commencer par l'étude d'un substrat particulière de composition simple de type cellulose pure. Cela nous permet de nous affranchir de la complexité supplémentaire induite par la présence des fractions de lignine et d'hémicellulose. Nous avons donc utilisé des celluloses microcristallines de type Avicel PH-101 (Sigma-Aldrich, Allemagne), Avicel PH-102 et Avicel PH-105 (FMC BioPolymer, USA).

Ces trois celluloses microcristallines se différencient par leur distribution de taille initiale et ont été choisies sur ce critère. Les tailles moyennes données par les fournisseurs sont de 50, 90 et 20 μm respectivement.

II.2.2 Enzymes

Nous avons utilisé un cocktail cellulolytique commercial, en l'occurrence le Celluclast 1.5L (ref. C2730, Sigma-Aldrich, Allemagne). Ce cocktail liquide est produit par le champignon *Trichoderma reesei* et contient les trois activités cellulolytiques EG, CBH et BGL. Son activité donnée par le fournisseur est > 700 EGU/g (Endoglucanase Unit). Nous rappelons qu'une unité d'activité enzymatique correspond à la production d'une μmole de sucres réducteurs par minute dans des conditions de température et de pH contrôlés.

Par ailleurs, pour des besoins de standardisation, l'ensemble des activités enzymatiques sont généralement données en FPU (Filter Paper Unit) suivant le protocole IUPAC (Ghose, 1987).

II.3 Analyses biochimiques

Pour suivre l'évolution de la conversion dans le temps, nous mesurons la concentration des sucres produits. Nous nous intéressons aux sucres réducteurs et aux sucres simples (glucose et cellobiose).

II.3.1 Dosage des sucres réducteurs

Pour remonter à la concentration des sucres réducteurs, nous utilisons le protocole de dosage par l'acide dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959). Cette méthode est décrite dans la partie I.6.1.1.

Nous utilisons des solutions étalons en glucose avec une gamme de concentrations de [0-1] g/L préparées à partir de la solution tampon acétate (pour avoir le même pH qu'avec les échantillons). Les échantillons sont mélangés avec le réactif DNS à 50/50 en volume. La réaction se fait dans un bain sec à 100 ° C pendant 5 mn (Eppendorf Thermomixer Comfort, Fischer Scientific). Les échantillons sont mis directement dans de la glace pour bloquer la réaction. Après centrifugation, les analyses spectrométriques sont conduites à 570 nm (Multiscan - ThermoLabsystems).

II.3.2 Dosage des sucres simples

En plus des sucres réducteurs, les concentrations en sucres simples (glucose et cellobiose) sont déterminées. Pour cela, nous avons utilisé la Chromatographie Liquide Haute Performance (Ultimate 3000 Dionex) équipée d'une colonne BioRad Aminex HPX 87H couplée avec un réfractomètre (Thermo Scientific). La séparation est effectuée avec un éluant 5 mM en H_2SO_4 à un débit de 0.3 mL/mn et une température de 40 ° C.

Les gammes étalons sont à base de glucose et de cellobiose purs (Sigma-Aldrich) sur des gammes de concentrations entre [0-2] g/L. Nous donnons dans la Figure II.2 les pics détectés par le RI selon la concentration des solutions étalons.



FIGURE II.2 – *Pics de glucose et de cellobiose à différentes concentrations*

Nous constatons une très bonne séparation des deux sucres. L'intégration des pics permet de quantifier la concentration en glucose et en cellobiose. Cette intégration se fait par la méthode valley-to-valley.

II.4 Analyses physiques

Les analyses physiques dans notre cas se résument à la caractérisation du substrat avant et durant la réaction en terme de morphologie/granulométrie. Pour cela, nous utilisons différents outils spécifiques que nous décrivons en détail ci-après. Avant cela, nous jugeons utile de rappeler les aspects théoriques généraux nécessaires pour la caractérisation de la taille/forme d'une particule et les propriétés d'une population de particules.

II.4.1 Rappels théoriques

II.4.1.1 Taille d'une particule

Pour caractériser une particule quelconque, la première dimension à laquelle nous nous intéressons est sa taille. Dans le cas d'une particule ayant une forme régulière (e.g. une sphère), il existe une façon unique et simple de définir sa taille et sa forme à savoir son diamètre. Cette information suffit pour caractériser ce type de particules. Dans le cas d'une particule ayant une forme irrégulière, la notion de taille devient complexe et insuffisante à elle seule pour décrire la forme de la particule en question, une deuxième dimension (voir plus) est nécessaire.

La façon la plus commune pour caractériser la taille d'une particule quelconque est de l'assimiler à une sphère en conservant une propriété donnée (e.g. volume, surface) et d'introduire ainsi la notion du diamètre équivalent. Nous donnons dans le Tableau II.1 les diamètres équivalents les plus utilisés ([Allen, 1997](#)).

II.4.1.2 Distribution de taille

Pour caractériser une population de particules polydisperses, nous nous intéressons généralement à leur distribution de taille (PSD : Particle Size Distribution, la taille ici est définie d'une façon homogène pour l'ensemble des particules). Selon la technique expérimentale utilisée, nous avons dans la plupart des cas accès directement à cette distribution de taille représentant l'ensemble des tailles des particules présentes dans l'échantillon avec leurs proportions en nombre, en surface ou en volume (en fréquence ou en absolu).

Les distributions de taille permettent d'accéder aux propriétés moyennes de la population de particules. Les diamètres moyens sont définis comme suit ([Brittain, 2001](#)) :

Symbole	Diamètre	Définition	Formule
d_v	Volume	Diamètre de la sphère ayant le même volume que la particule	$V = \frac{\pi}{6}d_v^3$
d_s	Surface	Diamètre de la sphère ayant la même surface que la particule	$S = \pi d_s^2$
d_{sv}	Surface-volume	Diamètre de la sphère ayant le même ratio volume/surface que la particule	$d_{sv} = d_v^3/d_s^2$
d_a	Surface projetée	Diamètre du cercle ayant la même surface projetée que la particule dans une position stable	
d_{St}	Stokes	Diamètre de la sphère ayant la même vitesse de chute libre que la particule dans un écoulement laminaire	
d_F	Feret	Distance entre deux tangentes au contour apparent de la particule menées parallèlement à une direction fixe	
d_M	Martin	Longueur d'une corde divisant la surface apparente de la particule en deux aires égales	

TABLEAU II.1 – Définitions des diamètres équivalents d'une particule (Allen, 1997)

$$d_{p,q} = \left[\frac{\sum_{i=1}^n n_i d_i^p}{\sum_{i=1}^n n_i d_i^q} \right]^{\frac{1}{p-q}} \quad (\text{II.1})$$

avec n_i le nombre/fraction de particules de diamètre d_i . Les paramètres p et q sont des entiers tel que $p > q$.

Nous donnons dans le Tableau II.2 les diamètres moyens couramment utilisés :

p	q	Symbole	Expression	Signification
1	0	$d_{1,0}$	$\frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i}$	Diamètre moyen en nombre
2	0	$d_{2,0}$	$\sqrt{\frac{\sum n_i d_i^2}{\sum n_i}}$	Diamètre moyen quadratique
3	0	$d_{3,0}$	$\sqrt[3]{\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i}}$	Diamètre moyen cubique
3	2	$d_{3,2}$	$\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$	Diamètre de Sauter
4	3	$d_{4,3}$	$\frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$	Diamètre moyen volumique

TABLEAU II.2 – Définitions des diamètres moyens d'une distribution de taille

D'autres grandeurs en plus des diamètres moyens peuvent être utilisées pour caractériser et/ou comparer des distributions de taille, elles seront introduites plus loin par la notion des moments.

II.4.2 Morpho-granulométrie optique

La morpho-granulométrie permet d'accéder aux propriétés morphologiques (taille, forme, ...) du substrat étudié. Le principe de cette technique repose sur l'acquisition et le traitement automatique d'images d'un grand nombre de particules dispersées ou en suspension.

Dans notre cas, nous avons utilisé un morpho-granulomètre Mastersizer G3S, Malvern Instruments Ltd. (Figure II.3-a, matériel de la Fédération FERMAT¹) équipé d'un système optique (Nikon CF160) avec des grossissements de $\times 1$ à $\times 50$ (Figure II.3-b) et d'une caméra (IEEE1394a, Fire Wire TM, 2592×1544 pixels). L'intervalle d'analyse varie sur une large gamme de tailles (0.2 à $3000 \mu\text{m}$) en adaptant l'optique adéquate.

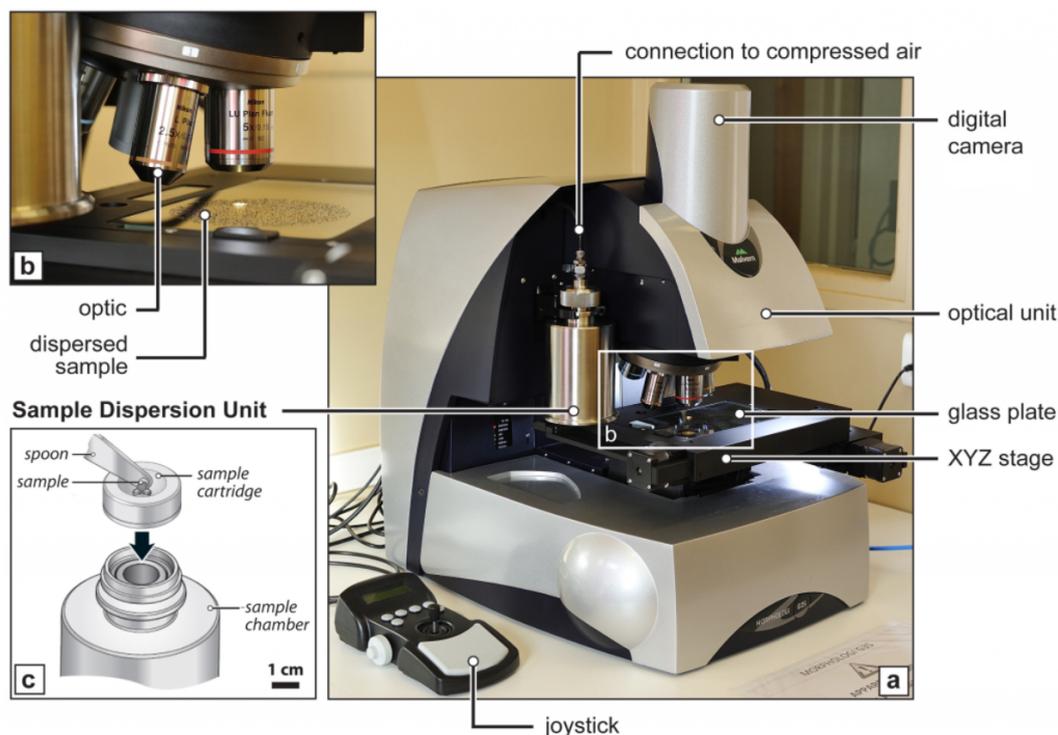


FIGURE II.3 – Image d'un morpho-granulomètre Mastersizer G3S²

1. Fédération de Recherche FERMAT : Fluides, Énergie, Réacteurs, Matériaux et Transfert : <http://www.federation-fermat.fr/>

2. <http://lmv.univ-bpclermont.fr/caracterisation-texturale-des-produits-volcaniques/>

Nous avons utilisé cet appareil essentiellement en voie sèche. Pour cela, une petite quantité optimisée de substrat (quelques mg) est dispersée sur une platine en verre à l'aide de l'unité de dispersion de l'appareil (Figure II.3-c). Une zone d'analyse est spécifiée avec l'optique ou la combinaison d'optiques adéquate(s) selon le besoin. Un ensemble de paramètres liés à l'analyse doivent être spécifiés (e.g. niveau de gris, chevauchement entre les images pour la reconstitution des particules sur plusieurs images).

Ainsi, le système automatique scanne la zone spécifiée et enregistre les images de l'ensemble des particules dans les limites de détection. Le logiciel de traitement d'images associée (Morphologi v7.21) nous donne accès à la fois aux propriétés de chaque particule détectée (surface, périmètre, diamètre équivalent en surface, circularité, ...) et à la distribution de ces propriétés sur l'ensemble de la population de particules (Figure II.4).

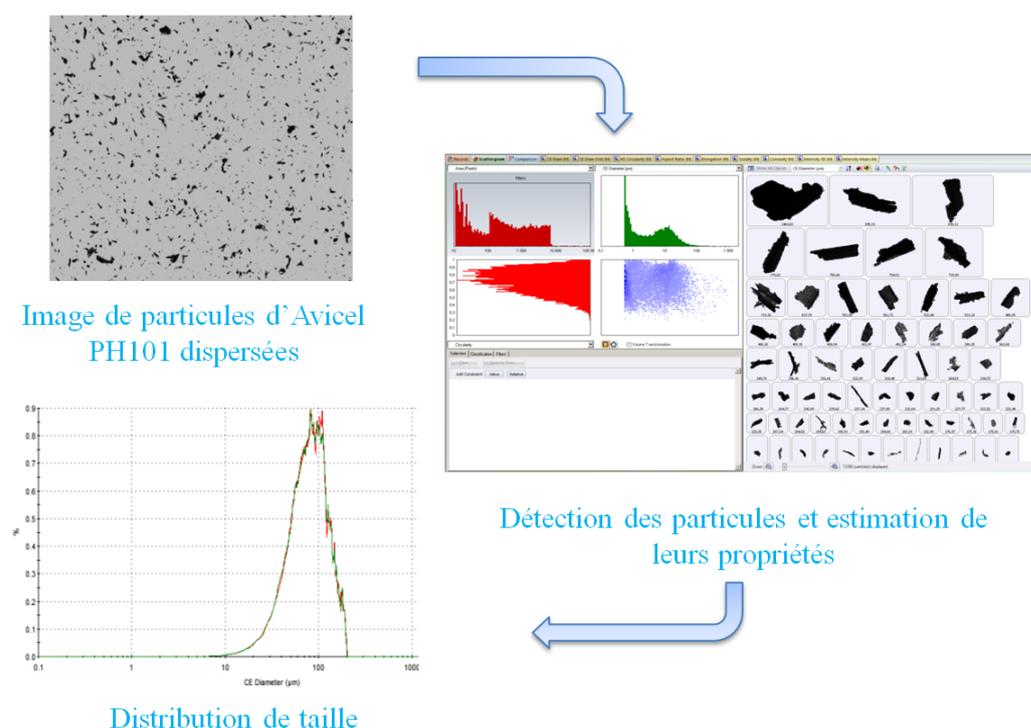


FIGURE II.4 – Schéma global du traitement d'images avec Morphologi v7.21

II.4.3 La granulométrie par diffraction laser

La diffraction laser est une technique couramment utilisée dont le principe général a été donné dans la section I.6.2.2. Nous avons utilisé un granulomètre à diffraction laser Mastersizer 2000 (Malvern Instrument Ltd.). Les suspensions de particules de cellulose

(prélèvements à différents instants durant la réaction) sont diluées et passent dans une cellule traversée par un laser. Des détecteurs placés à différents angles mesurent l'intensité du rayon diffusé.

A partir du spectre de diffraction mesuré par les détecteurs et en utilisant la théorie de Mie, le logiciel associé à l'appareil remonte à la distribution volumique des diamètres de la population de particules sphériques qui donnerait le même spectre de diffraction (Vlieghe, 2014). Le calcul requiert l'indice de réfraction des particules spécifié par l'utilisateur. Dans notre cas, l'indice de réfraction des différents types de celluloses microcristallines est de $d = 1.504$ (Rowe *et al.*, 2009).

La distribution subdivisée par défaut en une centaine de classes réparties suivant une suite géométrique de raison $q = 1.1482$ et de premier terme $u_0 = 0.010\mu\text{m}$ est renvoyée sous forme d'histogramme. Chaque classe représente la fraction volumique des particules ayant un diamètre équivalent donné par la moyenne géométrique des frontières de la classe en question.

II.4.4 Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM)

La sonde FBRM G400 (Mettler-Toledo, matériel TWB¹), contrairement aux deux techniques présentées précédemment, permet de suivre *in-situ* et en continu l'évolution de la distribution de taille des particules de cellulose en suspension durant la réaction d'hydrolyse sur une gamme de tailles allant de 0.5 à 2000 μm .

Le principe de fonctionnement de la sonde FBRM est basé sur l'émission d'un rayon laser infrarouge monochromatique (longueur d'onde 780 nm) soumis à une rotation grâce à une lentille (Figure II.5-a/b). Le faisceau laser tournant sort de la sonde en traversant une fenêtre en saphir. Il est réfléchi sur les particules passant à proximité immédiate de la fenêtre. La réflexion est détectée et analysée. Connaissant la vitesse linéaire de rotation du laser (2 m/s dans notre cas) et la durée de réflexion sur une particule, la longueur de coupe appelée *corde* peut être calculée (Figure II.5-c).

Ainsi, par simple comptage du nombre de cordes détectées en un intervalle de temps donné, le logiciel associé à l'appareil (iC FBRMTM 4.3) fournit la distribution de cordes (CLD : Chain Length Distribution) sous forme d'histogramme regroupant les longueurs de

1. <http://www.toulouse-white-biotechnology.com/>

2. Schémas extraits de la documentation technique Mettler-Toledo

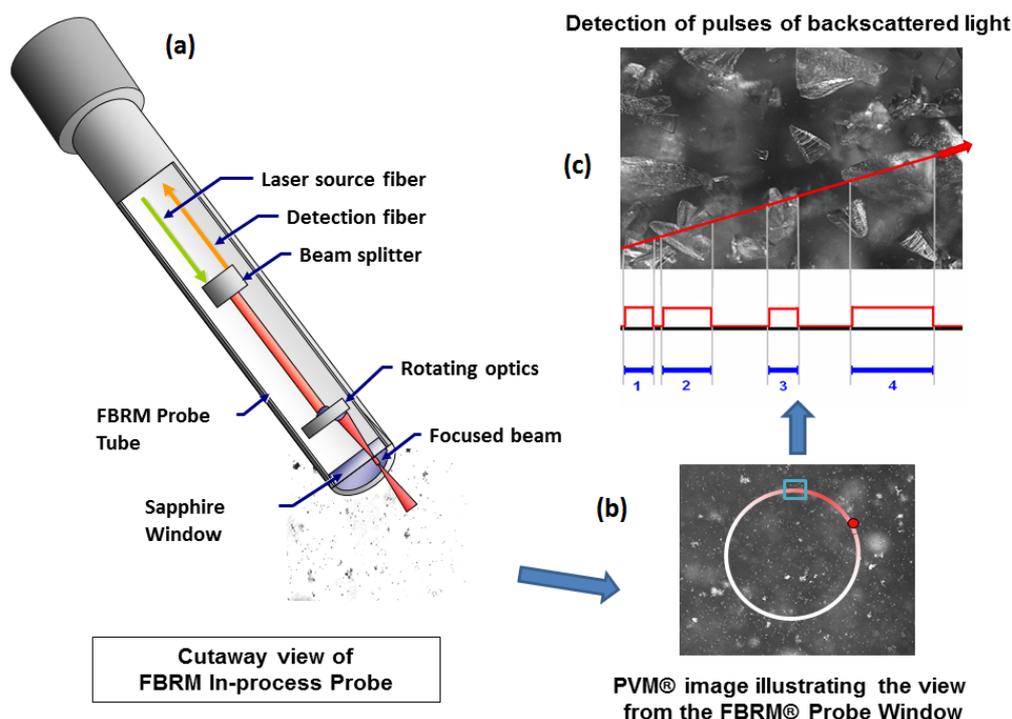


FIGURE II.5 – Schéma du principe de fonctionnement de la sonde FBRM ²

cordes en une centaine de classes. Ces classes sont réparties selon une suite géométrique de premier terme $u_0 = 1 \mu\text{m}$ et de raison $q = 1.0715$. Chaque classe dont la longueur représentative est la moyenne arithmétique de ses deux bornes regroupe le nombre de cordes dont les longueurs sont comprises entre les bornes de la classe en question.

II.4.5 Comparaison des trois techniques

Les trois techniques granulométriques visent à caractériser la taille/forme initiale du substrat particulaire et son évolution au cours de l'hydrolyse enzymatique. Néanmoins, selon le principe de fonctionnement de chaque technique, nous aboutissons à des données brutes de natures différentes. Pour mieux cerner les avantages et les inconvénients de chaque technique, nous récapitulons dans le Tableau II.3 les caractéristiques principales des trois outils.

Le morpho-granulomètre fournit des distributions de taille basées sur des diamètres équivalents en surface projetée puisque l'analyse repose sur le traitement d'images de particules en 2D. Le granulomètre laser renvoie la distribution des fractions volumiques centrées sur des diamètres équivalents en volume. La sonde FBRM, quant à elle, nous

Critère	Morpho-granulomètre	Granulomètre laser	FBRM G400
<i>Mode</i>	<i>ex-situ</i>	<i>ex-situ</i>	<i>in-situ</i>
	Ponctuel	Ponctuel	Continu
<i>Voie</i>	Sèche/humide	Humide	Humide
<i>Concentration</i>	Faible	Faible	Faible/Élevée
<i>Sensibilité</i>	0.2-3000 μm	0.01-2000 μm	0.5-2000 μm
<i>Données brutes</i>	Images 2D	Hypothèse sphéricité	Cordes
	Nombre/Surface	Fraction volumique	Nombre de cordes
<i>Diamètre(s)</i>	d_a, d_F, d_M	d_v	/
<i>Acquisition</i>	Longue	Rapide	Rapide

TABLEAU II.3 – Comparaison entre les trois techniques granulométriques

donne des distributions de longueurs de cordes sans lien direct avec la notion des diamètres équivalents vu le caractère aléatoire des coupes.

Néanmoins, malgré ces disparités, les trois techniques se complètent et une fois associées, elles peuvent aboutir à une description plus fine de ce qui se passe durant l'hydrolyse au niveau particulaire. La morpho-granulométrie est l'unique technique qui permet d'avoir accès à la forme des particules de cellulose. La granulométrie laser, avec sa simplicité au niveau expérimental, permet de caractériser des échantillons en voie liquide facilement contrairement à la morpho-granulométrie. L'avantage principal de la sonde FBRM est de pouvoir suivre *in-situ* et en continu le comportement des particules de cellulose en suspension soumises à l'action combinée des enzymes et des contraintes hydrodynamiques.

De plus, les deux premières méthodes peuvent aider à mieux exploiter et interpréter les distributions de cordes données par la sonde FBRM. En effet, il est impératif de développer un modèle qui relie la distribution de cordes à sa distribution de taille associée. Cela peut se faire de plusieurs manières et le problème est abordé dans la littérature (Langston *et al.*, 2001; Li & Wilkinson, 2005; Worlitschek *et al.*, 2005; Ruf *et al.*, 2000).

Nous donnons dans l'Annexe [A](#) le fondement théorique et l'approche numérique de deux techniques visant à déterminer la distribution de cordes associée à une distribution de taille donnée et inversement. La première est basée sur une résolution analytique du problème dans le cas de particules ayant une forme simple (sphères) proposée par ([Li & Wilkinson, 2005](#)). La deuxième est une méthode originale qui repose sur l'exploitation des images de particules de forme quelconque issues d'une analyse morpho-granulométrique. La solution analytique (première technique) servira à valider l'approche par le traitement d'images (seconde technique).

II.5 Synthèse

L'ensemble des techniques d'analyse expérimentales décrites dans ce chapitre visent à caractériser l'avancement de la réaction d'hydrolyse à deux échelles : une échelle biochimique par l'analyse des sucres réducteurs et des sucres simples (cellobiose et glucose), conséquence directe de l'activité enzymatique au niveau moléculaire et une échelle physique par l'analyse de la distribution de taille des particules du substrat qui évolue (vers les petites tailles) durant la réaction, conséquence de l'activité enzymatique au niveau particulaire conjuguée à l'effet des contraintes hydrodynamiques. En effet, l'hydrodynamique du système peut contribuer à la rupture des particules déjà fragilisées par les enzymes. Ces mécanismes de rupture sont largement abordés dans la littérature dans le cas de la floculation par exemple ([Vlieghe, 2014](#)).

Nous donnons dans la Figure [II.6](#) une vue d'ensemble des différentes analyses expérimentales physiques et biochimiques effectuées pour chaque expérience d'hydrolyse.

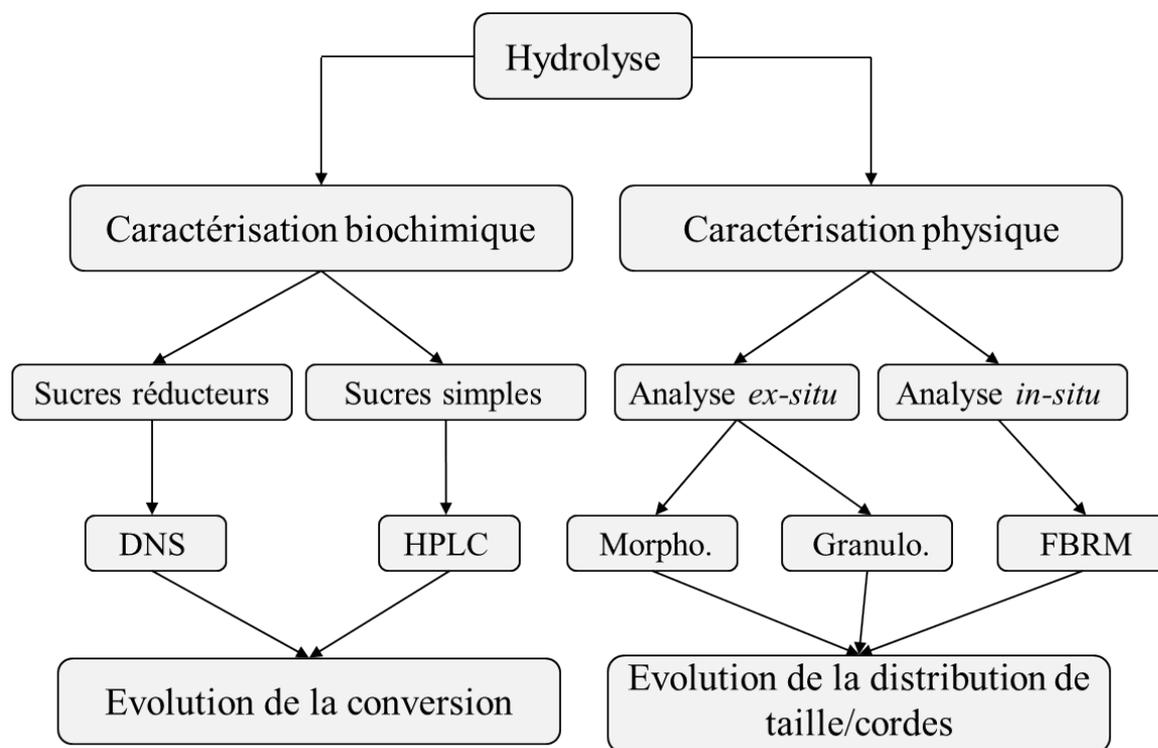


FIGURE II.6 – Schéma global du suivi expérimental d'une réaction d'hydrolyse

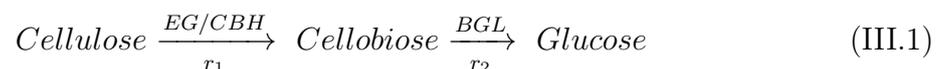
Chapitre III

Analyse de la modélisation classique

Dans ce chapitre, nous donnons une analyse de l'approche de modélisation classique en confrontant nos données expérimentales à un modèle cinétique simple présenté dans la partie bibliographique. Dans la première partie, nous présentons en détail le modèle choisi. En second lieu, nous donnons un listing des différentes expériences effectuées pour constituer notre base de données expérimentales sur laquelle sera basée l'optimisation des paramètres du modèle suivi d'une analyse succincte des résultats expérimentaux. En dernier lieu, nous analysons les résultats de la modélisation classique obtenus dans notre cas que nous confrontons par les quelques études similaires disponibles dans la littérature.

III.1 Modélisation de l'hydrolyse enzymatique par une approche cinétique

Nous nous intéressons à l'hydrolyse de la cellulose microcristalline par un cocktail enzymatique. Pour modéliser cette réaction, nous avons adopté l'approche proposée par (Kadam *et al.*, 2004) basée sur la prise en compte de l'adsorption discutée dans la section I.7.1.3. La réaction peut être vue comme la succession de deux étapes schématisées dans l'équation (III.1) : une réaction hétérogène où interviennent les endoglucanases (EG)/cellobiohydrolases (CBH) pour produire du cellobiose et une réaction homogène où le cellobiose est transformé en glucose par les β -glucosidases (BGL).



La vitesse de transformation de la cellulose r_1 par le couple EG/CBH en tenant compte de l'effet d'inhibition (compétitive) par les produits (cellobiose et glucose) est donnée par :

$$r_1 = \frac{k_{1r} \times E_{1b} \times R_S \times S}{1 + \frac{C_C}{K_{1IC}} + \frac{C_G}{K_{1IG}}} \quad (\text{III.2})$$

La vitesse de transformation du cellobiose en glucose par les BGL est donnée par la cinétique michaelienne suivante :

$$r_2 = \frac{k_{2r} \times E_2 \times C_C}{K_{2M} \left(1 + \frac{C_G}{K_{2IG}}\right) + C_C} \quad (\text{III.3})$$

A partir de ces équation de vitesse, en appliquant le principe de la conservation de la masse, nous remontons aisément aux vitesses de disparition de la cellulose et d'apparition du cellobiose et du glucose respectivement données ci-après :

$$\frac{dS}{dt} = -r_1 \quad (\text{III.4})$$

$$\frac{dC_c}{dt} = 1.056 \times r_1 - r_2 \quad (\text{III.5})$$

$$\frac{dC_G}{dt} = 1.053 \times r_2 \quad (\text{III.6})$$

Les facteurs 1.056 et 1.053 viennent de l'hydratation des liaisons glycosidiques des chaînes cellulosiques et du cellobiose respectivement.

Nous rajoutons le bilan sur les enzymes (EG+CBH) stipulant que ces enzymes peuvent être, à un instant donné, soit libres en solution (E_{1f}) soit adsorbées sur le substrat (E_{1b}) (équation III.7). L'adsorption suit une isotherme de type Langmuir (équation I.1).

$$E_1 = E_{1b} + E_{1f} \quad (\text{III.7})$$

Nous faisons l'hypothèse que les BGL ne s'adsorbent pas sur le substrat et donc toute la charge initiale se retrouve en solution. Concernant la réactivité du substrat (R_S), elle est approximée par le rapport S/S_0 (Kadam *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2009).

III.2 Base de données expérimentales

Nous avons effectué un lot d'expériences en utilisant le même type de substrat à savoir une cellulose microcristalline (Avicel PH-101) et le même cocktail (Celluclast 1.5L) et en gardant l'ensemble des conditions opératoires fixes. L'objectif est de constituer une base de données expérimentales riche contenant des expériences dédiées ciblant un certain nombre de paramètres auxquels l'hydrolyse est sensible. Pour cela, la démarche était de :

- Faire varier le ratio enzymes/substrat : effet de la concentration (expériences 1 et 2).
- Faire varier les concentrations en enzymes et en substrat tout en gardant leur ratio constant : effet de l'adsorption (expériences 2 et 3).
- Rajouter initialement une concentration connue en cellobiose ou en glucose : effet d'inhibition des cellulases (expériences 4 et 5).
- Rajouter une charge fraîche de substrat au bout de 144 h d'hydrolyse : stabilité du cocktail, effet de l'âge du substrat (expérience 6).
- Rajouter une charge fraîche d'enzymes au bout de 144 h d'hydrolyse : état du substrat ; effet de l'âge des enzymes (expérience 7).

Ces expériences sont récapitulées dans le Tableau III.1. Chacune d'elles est faite une seule fois.

Expérience	S (g/L)	E (FPU)	Durée (h)	Particularité
1	10	15	144	/
2	10	60	144	/
3	5	30	144	/
4	10	15	312	+3 g/L cellobiose à t_0
5	10	15	312	+3 g/L glucose à t_0
6	10	15	288	+5 g cellulose à $t=144$ h
7	10	15	288	+15 FPU cellulases à $t=144$ h

TABLEAU III.1 – Récapitulatif des différentes expériences d'hydrolyse effectuées

En plus de ces expériences avec l'Avicel PH-101 (Tableau III.1), deux expériences supplémentaires ont été effectuées en utilisant l'Avicel PH-102 et PH-105 avec des charges similaires en substrat (10 g.L^{-1}) et élevées en enzymes (150 FPU) sur une même durée de

48 h. L'objectif étant d'explorer l'effet de la distribution de taille initiale sur la cinétique de conversion.

III.3 Analyse des données expérimentales

Nous donnons dans les Figures III.1, III.2, III.3 et III.4 les résultats expérimentaux obtenus pour les expériences listées dans le tableau III.1 en terme d'évolution des concentrations en sucres simples (glucose et cellobiose) dans le milieu réactionnel en fonction du temps.

Nous rappelons que l'ensemble des concentrations ont été corrigées en tenant compte de l'effet d'évaporation qui, malgré la mise en place d'un couvercle au niveau du dispositif expérimental, reste non négligeable vue les temps longs des expériences (minimum 144 h).

Nous définissons le taux de conversion du substrat comme (Khodaverdi *et al.*, 2011) :

$$\text{Conversion (\%)} = \frac{[\text{Glucose (g/L)} + \text{Cellobiose (g/L)} \times 1.053] \times 0.9}{\text{Cellulose (g/L)}} \times 100 \quad (\text{III.8})$$

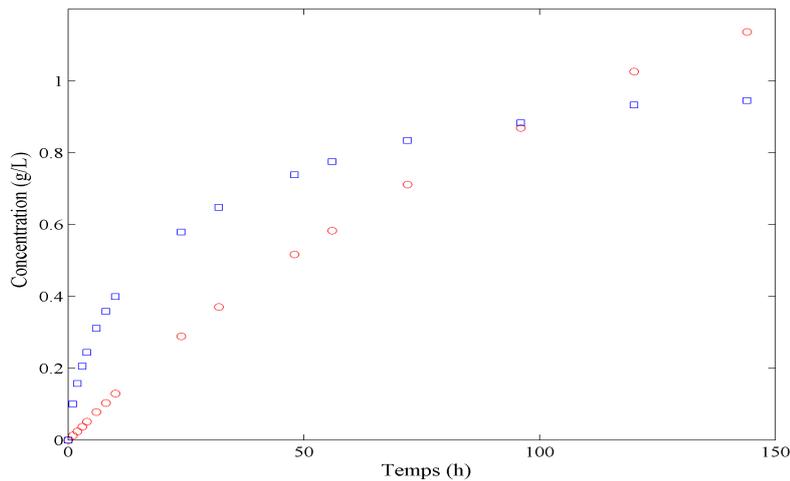


FIGURE III.1 – Évolution des concentrations en glucose (rouge/ronde) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 1 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$)

Dans toutes les expériences, hormis celles dédiées à l'effet d'inhibition, la concentration en cellobiose augmente très rapidement initialement. Les enzymes transforment les

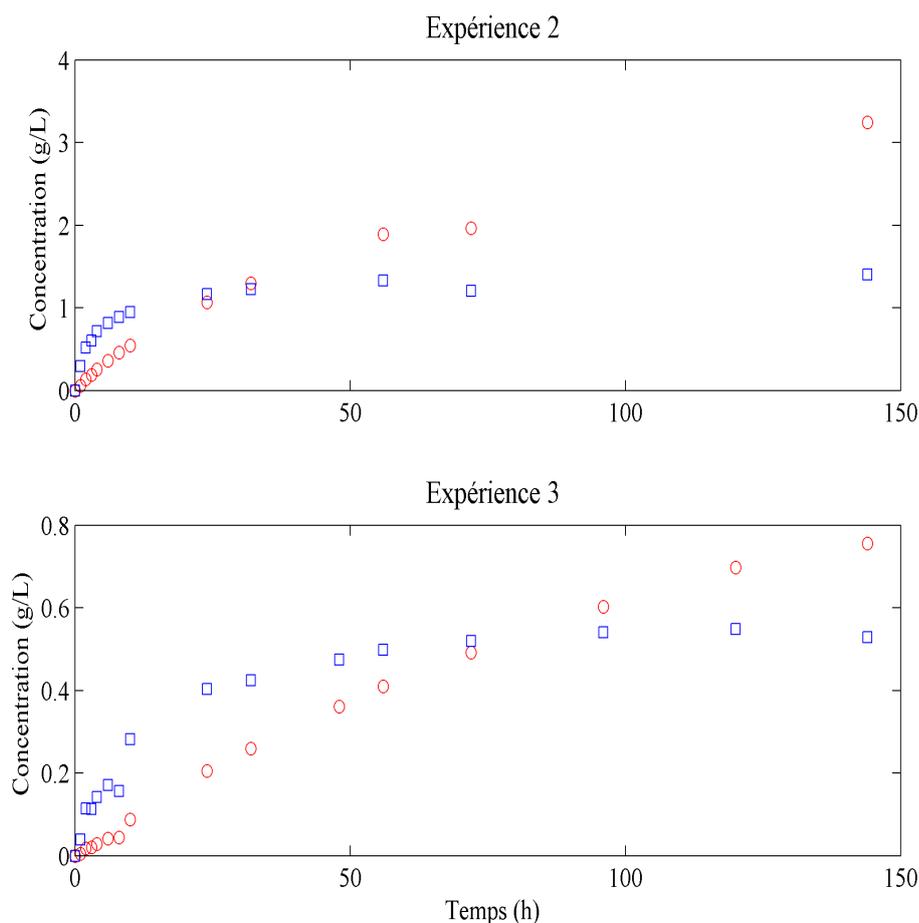


FIGURE III.2 – Évolution des concentrations en glucose (rouge/rond) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 2 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=60 \text{ FPU}$ et expérience 3 : $S=5 \text{ g.L}^{-1}$, $E=30 \text{ FPU}$)

fractions facilement hydrolysables en cellobiose qui, à son tour, est converti en glucose avec une cinétique moins rapide. Au fur et à mesure que le temps avance, la vitesse nette de formation de cellobiose ralentit graduellement jusqu'à s'annuler dans certains cas telles que dans les expériences 2 et 3. Elle peut même devenir négative et se traduit dans ce cas par une chute légère de la concentration en cellobiose (expériences 2 et 3 vers la fin), ce qui est dû à sa transformation en glucose sans qu'il soit renouvelé. Ainsi, l'essentiel du cellobiose est produit dans les premières 24 heures. La chute drastique par la suite peut être expliquée par une multitude de paramètres liés à la nature du substrat et à la sensibilité des enzymes. En effet, une fois les fractions hydrolysables transformées, les enzymes font face à un substrat récalcitrant (cristallin) avec potentiellement leur immobilisation par une adsorption non productive. De plus, les sucres simples produits s'accumulent au

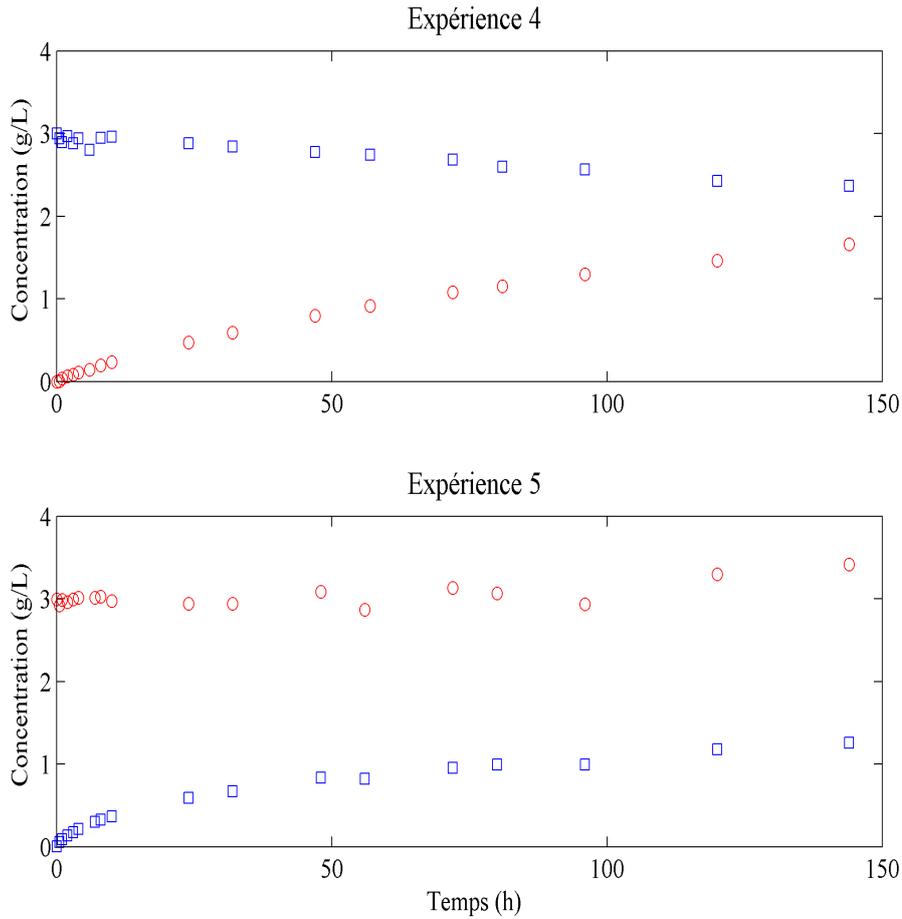


FIGURE III.3 – Évolution des concentrations en glucose (rouge/rond) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 4 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, $C_{C_0}=3 \text{ g.L}^{-1}$ et expérience 5 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, $C_{G_0}=3 \text{ g.L}^{-1}$)

fur et à mesure provoquant un effet d'inhibition.

La vitesse de transformation du cellobiose en glucose chute graduellement elle aussi mais d'une façon moins significative. Les BGL ne trouvent pas de difficulté à accéder au cellobiose (produit soluble, homogène dans le réacteur sous l'effet d'agitation) et globalement elles ne sont sensibles qu'à l'inhibition une fois la concentration en glucose commence à être importante dans le système. A même ratio $\frac{E}{S}$ (expériences 2 et 3), le taux de conversion dépend de la quantité de substrat. Cela indique que l'adsorption participe au processus global d'hydrolyse.

Le taux de conversion total dans la première expérience est estimé à environ 20 %. Il est de 55 et de 31 % dans les expériences 2 et 3 respectivement. Il faut noter que pour ces deux dernières expériences, environ 80 % de la conversion est atteint au bout de 72 h de

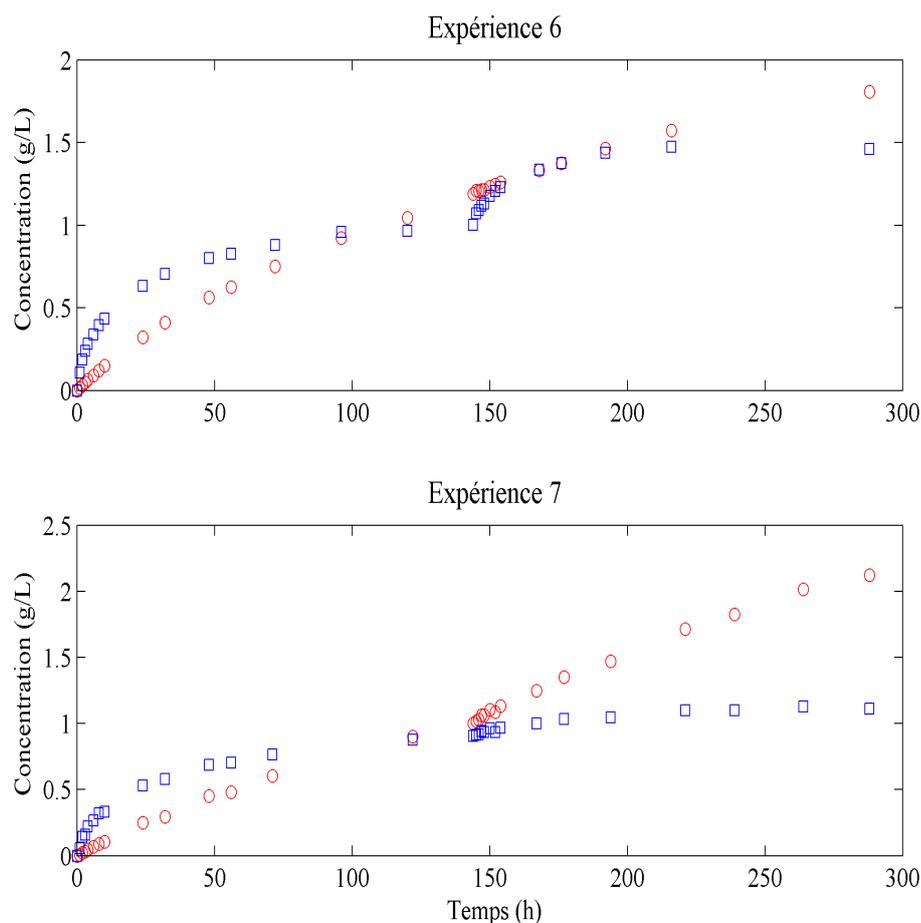


FIGURE III.4 – Évolution des concentrations en glucose (rouge/rond) et en cellobiose (bleu/carré) durant l'hydrolyse (expérience 6 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, ajout de substrat à $t=144 \text{ h}$, expérience 7 : $S=10 \text{ g.L}^{-1}$, $E=15 \text{ FPU}$, ajout d'enzymes à $t=144 \text{ h}$)

réaction (première moitié de la durée des réactions).

En multipliant la concentration des enzymes par 4 dans l'expérience 2 par rapport à l'expérience 1, la conversion a été doublée (43 % dans l'expérience 2 au bout de 144 h de réaction). Cela s'explique par l'amélioration de l'adsorption des enzymes. La diminution des concentrations dans l'expérience 3 tout en gardant le même ratio enzyme/substrat que dans l'expérience 2 réduit considérablement la conversion.

L'introduction d'une charge initiale en cellobiose (expérience 4) ou en glucose (expérience 5) affecte considérablement la vitesse d'hydrolyse, la conversion n'est que de 10 et 15 % respectivement. La charge initiale en cellobiose provoque l'inhibition des activités EG et CBH. La concentration en cellobiose dans l'expérience 4 diminue très lentement du fait de l'activité BGL qui reste importante, le cellobiose transformé en glucose est globa-

lement remplacé. Ainsi, l'activité BGL contribue à lever l'inhibition par le cellobiose des activités EG et CBH. La concentration finale en glucose atteint 1.6 g.L^{-1} soit une valeur supérieure à celle obtenue en de l'expérience 1. Ceci s'explique par la concentration initiale supérieure en cellobiose et montre que les BGL sont peu affectées par l'inhibition par le cellobiose. Dans l'expérience 5, la concentration en glucose reste globalement constante autour de sa valeur initiale de 3 g/L , les BGL sont complètement inhibées et le cellobiose produit par l'activité synergique des EG et des CBH s'accumule dans le système et n'est pas transformé. L'accumulation du glucose affecte moins l'activité du cocktail comparée à l'accumulation du cellobiose. De ce fait, une activité BGL importante dans un cocktail contribuerait à améliorer ses capacités hydrolytiques.

Dans les expériences 6 et 7 où des charges fraîches en substrat et en enzymes sont rajoutées respectivement, dans les premières 144 h nous retrouvons les mêmes profils de concentrations en cellobiose et en glucose que dans l'expérience 1, ce qui assure la reproductibilité de nos expériences.

L'introduction d'une charge fraîche de substrat (expérience 6) après 144 h d'hydrolyse relance l'activité du cocktail qui redémarre avec des cinétiques importantes notamment pour les EG/CBH. Le substrat frais présente l'avantage d'être facilement accessible contrairement au substrat déjà présent dans le système qui devient récalcitrant une fois les fractions facilement hydrolysables converties. Néanmoins, il faut noter que le cocktail ne retrouve pas son activité initiale pour différentes raisons telles que la désactivation et l'adsorption non réactive d'une partie des enzymes et l'inhibition par les produits.

L'introduction d'une charge fraîche d'enzyme (expérience 7), quant à elle, relance plutôt l'activité BGL qui contribue à lever l'inhibition sur les EG/CBH en transformant le cellobiose. La concentration du cellobiose augmente d'une façon peu significative et se stabilise très rapidement. Cela signifie que les activités EG/CBH compensent les pertes en cellobiose transformé en glucose, en d'autres termes, des fractions du substrat peuvent être encore transformées. Nous sommes en régime quasi-stationnaire limité par le glucose. Cela peut être expliqué par la faible charge d'enzymes initiale qui ne sature pas le substrat et qui, au bout de 144 h d'hydrolyse, se retrouve en partie désactivée ou adsorbée de façon non productive.

Ces deux dernières expériences montrent à quel point l'âge du substrat et des enzymes est important. Cet aspect, très important pour le passage à une échelle procédé, est très

peu abordé dans la littérature et ne peut pas être capturé via une approche de modélisation classique.

III.4 Identification des paramètres

Une fois les équations du modèle établies, l'objectif est de déterminer les différents paramètres propres à l'adsorption et aux équations cinétiques. Cela se fait par la régression des données expérimentales. Vu le nombre important de paramètres (8 au total), nous avons choisi d'utiliser l'ensemble des expériences décrites dans le Tableau III.1 pour faire la régression. Cette régression est basée sur le principe des moindres carrés non linéaires, de ce fait, nous utilisons la fonction *lsqnonlin* disponible sous Matlab (la même démarche est utilisée dans (Kadam *et al.*, 2004)).

Nous donnons dans les Figures III.5, III.6, III.7 et III.8 les résultats de l'optimisation pour les différentes expériences. Dans tous les cas, la couleur rouge se réfère au glucose et la bleue au cellobiose, les données expérimentales sont présentées par des symboles et le résultat des simulations par un trait continu.

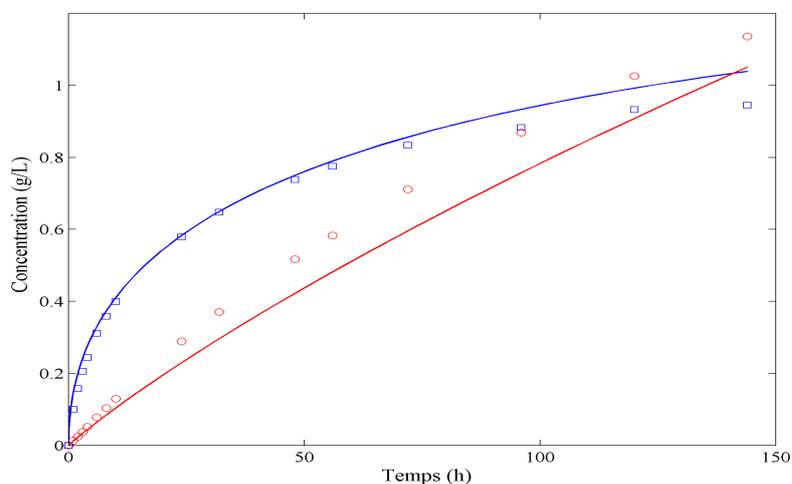


FIGURE III.5 – Comparaison entre les données expérimentales de l'expérience 1 et le résultat de la régression

En se basant sur le fitting de l'ensemble des données expérimentales, nous remarquons que le modèle arrive à reproduire l'évolution de la concentration des sucres simples produits durant l'hydrolyse dans la plupart des cas considérés notamment le changement du ratio enzymes/substrat (expériences 1 et 2) et l'effet d'inhibition provoqué par ajout de

sucres simples initialement (expériences 4 et 5).

Les cas où le modèle est loin des résultats expérimentaux sont essentiellement l'évolution de la concentration du glucose en changeant les concentrations en substrat et en enzymes tout en gardant le ratio E/S constant (expérience 3) et l'évolution de la concentration du cellobiose après ajout d'une charge fraîche de substrat (expérience 6).

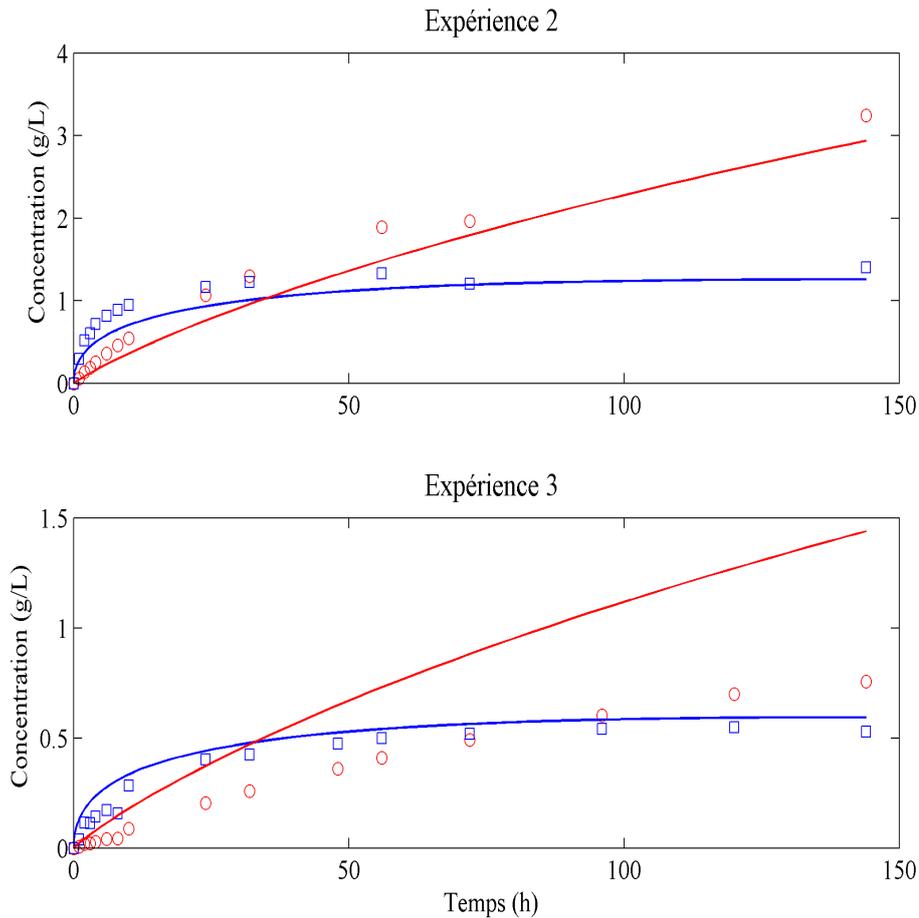


FIGURE III.6 – Comparaison entre les données expérimentales (Expériences 2 et 3) et le résultat de la régression : effet des concentrations en enzymes et en substrat

En se basant uniquement sur ces résultats, nous pourrions conclure que le modèle est fiable et peut être utilisé pour prédire la conversion dans une réaction d'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Néanmoins, ce qui a attiré notre attention est le fait que les valeurs numériques des paramètres obtenus après optimisation ne convergent pas vers une unique solution. En effet, à chaque lancement de la procédure d'optimisation, les valeurs optimales des paramètres changent sensiblement sans pour autant que le fitting des différentes expériences soit affecté. Nous donnons, à titre d'exemple, dans le Tableau III.2

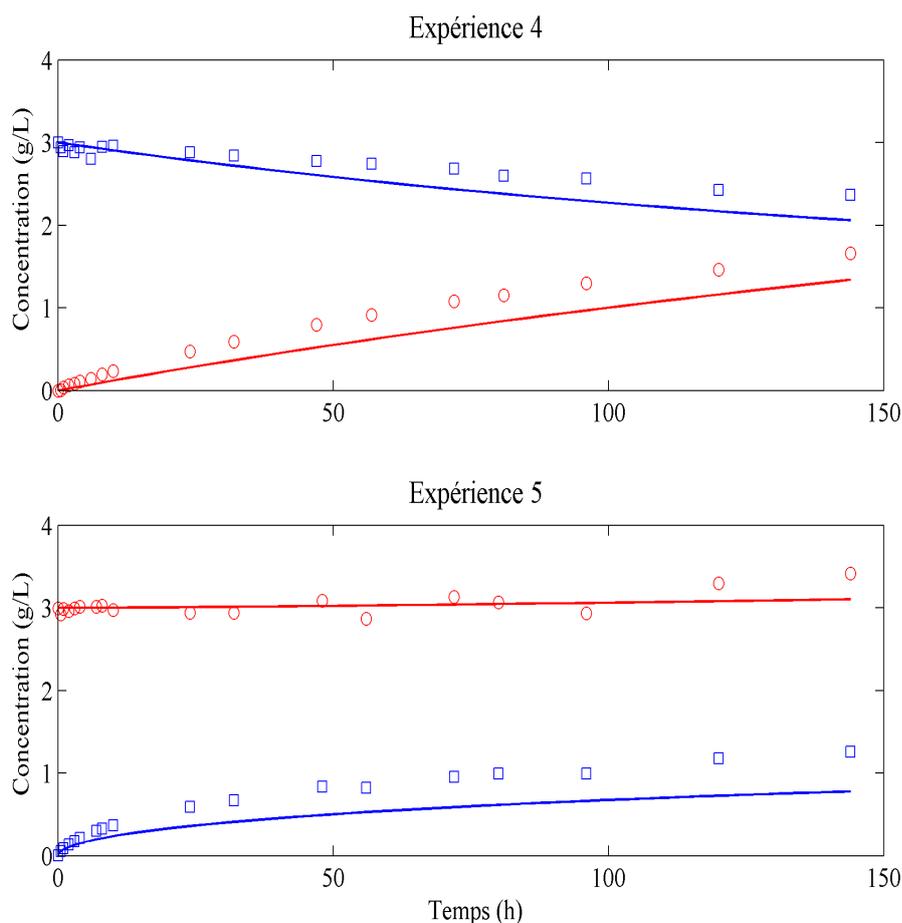


FIGURE III.7 – Comparaison entre les données expérimentales (Expériences 4 et 5) et le résultat de la régression : effet d'inhibition par les sucres simples

deux vecteurs complètement différents et qui sont des solutions au problème d'optimisation posé.

Cela confirme l'existence d'un espace de solutions où les différents paramètres peuvent varier et se compenser les uns les autres tout en assurant au final une solution optimale au problème. Dès lors, le problème d'identification de ces paramètres se pose. En effet, dans ce modèle basé uniquement sur la variation de la conversion globale du substrat (solubilisation d'une fraction du substrat et apparition de sucres simples), l'ensemble des phénomènes physiques de grande importance (e.g. inhibition, adsorption) ont été rajoutés via un jeu de paramètres. Au final, dans notre cas, nous avons 8 paramètres dont l'identification est remise en cause puisque la structure simple du modèle ne peut pas supporter un tel nombre de paramètres. Nous pouvons certes imposer des intervalles de variation des paramètres en se basant sur leur sens physique mais même dans ce cas, il

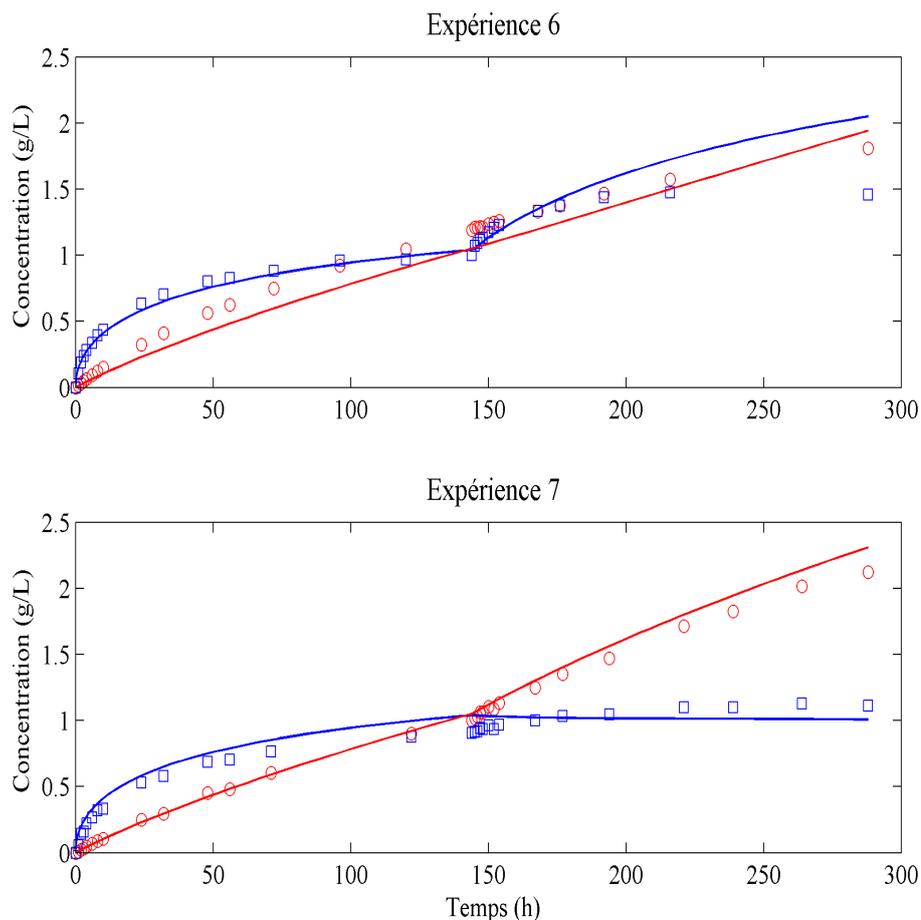


FIGURE III.8 – Comparaison entre les données expérimentales (Expériences 6 et 7) et le résultat de la régression : effet du rajout de charges fraîches de substrat et d'enzymes

Paramètre	Optimum 1	Optimum 2
E_{max}	18.96	0.36
K_{ad}	0.049	5
k_{1r}	0.41	0.04
K_{1IG}	1244	10
K_{1IC}	0.0015	0.035
k_{2r}	0.008	0.2
K_{2M}	0.008	1.01
K_{2IG}	0.0045	0.024

TABLEAU III.2 – Exemple de deux ensembles de huit paramètres optimaux

n'y aura pas une seule solution optimale. Pour appuyer ce constat, nous nous référons à un cas similaire étudié dans la littérature que nous développons brièvement ci-après.

III.5 Exemple de la littérature

Nous reprenons l'exemple de (Kadam *et al.*, 2004) présenté précédemment (section I.7.1.3). Le modèle de (Kadam *et al.*, 2004) est basé sur le schéma réactionnel ci-après (Figure III.5) où un substrat constitué de cellulose et d'hémicellulose (xylose) est transformé en cellobiose (r_1 : équation I.17) et en glucose (r_2 : équation I.18 et r_3 : équation I.19).

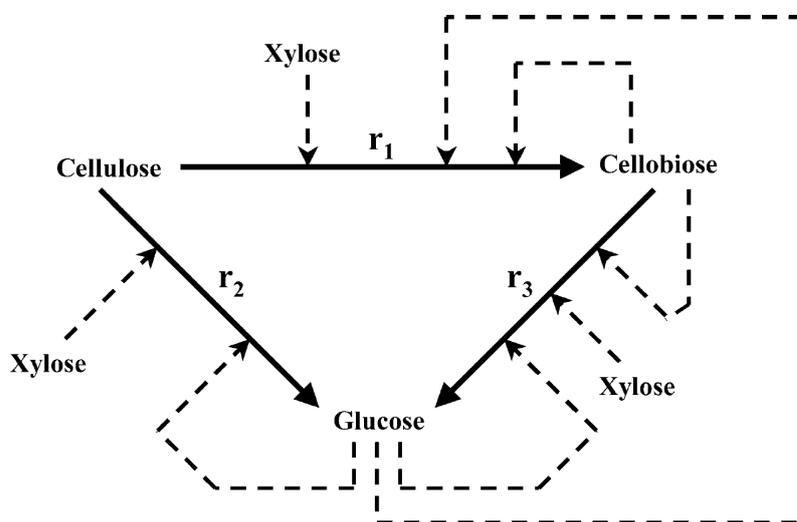


FIGURE III.9 – Schéma global d'hydrolyse proposé par (Kadam *et al.*, 2004)

Deux isothermes d'adsorption de type Langmuir sont utilisées pour les EG/CBH d'une part et les BGL d'autre part. Les cellulases sont inhibées d'une façon compétitive par les sucres simples y compris le xylose et l'effet de la température est inclus via la loi d'Arrhenius.

L'identification de l'ensemble des paramètres du modèle se fait en deux étapes séparées. Dans la première étape, les paramètres propres à l'adsorption des enzymes et à l'effet de la température sont déterminés indépendamment des autres via des expériences dédiées. En second lieu, les paramètres cinétiques (12 au total) sont identifiés par la régression de données expérimentales d'hydrolyse dont le type et les spécificités ne sont pas explicités.

Une fois les paramètres du modèle identifiés, différents types d'expériences sont effec-

tuées pour tester la fiabilité du modèle et sa capacité à fitter des données expérimentales variées (e.g. effet de la température, effet de l'ajout de glucose et de cellobiose initialement).

(Sin *et al.*, 2010) ont repris le modèle proposé par (Kadam *et al.*, 2004) et ont effectué une analyse statistique approfondie sur la sensibilité du modèle aux différents paramètres et l'identifiabilité de ces paramètres à partir du jeu de données expérimentales utilisé pour l'optimisation. Nous donnons dans le tableau III.3 l'estimation des paramètres cinétiques du modèle avec les intervalles de confiance à 95% associés déterminés à partir de l'analyse statistique.

Paramètre	Estimation	IC 95%
k_1	19.16	± 830.39
K_{1IC}	0.07	± 3.30
K_{1IG}	0.03	± 1.21
K_{1IX}	0.16	± 6.84
k_2	5.74	± 140.31
K_{2IC}	91.14	± 11265.3
K_{2IG}	0.07	± 1.63
K_{2IX}	0.93	± 23.11
k_3	98.38	± 1775.56
K_{3M}	104.86	± 2335.93
K_{3IG}	0.77	± 3.64
K_{3IX}	326.62	± 14306.0

TABLEAU III.3 – Incertitudes sur les différents paramètres du modèle de (Kadam *et al.*, 2004) selon l'analyse statistique de (Sin *et al.*, 2010)

L'analyse donnée par (Sin *et al.*, 2010) vient corroborer nos résultats discutés dans la section précédente. En effet, l'analyse statistique du modèle de (Kadam *et al.*, 2004) montre que les différents paramètres peuvent varier dans des intervalles larges tout en assurant la même qualité de fitting des données expérimentales de base. Cela pose le problème d'identifiabilité de ces paramètres puisque numériquement toutes les solutions du problème se valent et combien même nous nous appuyons sur le sens physique des paramètres, nous n'aboutirons pas à une solution unique : le modèle est sur-paramétré et de ce fait, sa sensibilité se réduit à quelques paramètres uniquement. Cette conclusion est confortée par les études qui ont repris le modèle de (Kadam *et al.*, 2004) dans différentes

conditions (e.g. incorporation d'autres schémas réactionnels, application à d'autres types de substrats). Nous donnons à titre illustratif dans le tableau III.4 les résultats de quelques travaux publiés (Angarita *et al.*, 2015).

Paramètre	(Kadam <i>et al.</i> , 2004)	(Flores-Sánchez <i>et al.</i> , 2013)	(Prunescu & Sin, 2013)	(Angarita <i>et al.</i> , 2015)
k_1	22.3	94.72	1.224	0.509
K_{1IC}	0.015	10^{-5}	0.0014	0.016
K_{1IG}	0.1	7.33	0.073	0.71
K_{1IX}	0.1	8.92	0.1007	0.557
k_2	7.18	958.3	19.08	12.75
K_{2IC}	132	7.33	132	89.18
K_{2IG}	0.04	0.00115	0.34	0.551
K_{2IX}	0.2	6.13	0.029	0.581
k_3	285.5	432.16	252	165.7
K_{3M}	24.3	0.022	24.3	47.20
K_{3IG}	3.9	1.45×10^{-5}	3.9	0.011
K_{3IX}	201.0	39.19	201	110.0

TABLEAU III.4 – Estimation des paramètres cinétiques selon différentes études (Angarita *et al.*, 2015)

Ces études confirment ce qui a été avancé par (Sin *et al.*, 2010). La grande variabilité entre les mêmes paramètres d'une étude à une autre montre l'inconsistance de l'approche d'optimisation. La nature du substrat, la nature des prétraitements utilisés et d'autres phénomènes sont montrés du doigt pour expliquer ces écarts. De plus, (Angarita *et al.*, 2015) montrent qu'en utilisant deux jeux de données expérimentales obtenus dans les mêmes conditions, les paramètres varient substantiellement.

III.6 Synthèse et conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisé le modèle cinétique développé par (Kadam *et al.*, 2004) prenant en compte l'adsorption des enzymes et l'effet d'inhibition par les produits pour modéliser notre propre système à savoir l'hydrolyse de la cellulose microcristalline par un cocktail cellulolytique. L'utilisation de nos expériences d'hydrolyse effectuées dans différentes conditions pour l'identification des paramètres du modèle aboutit à un en-

semble de solutions ce qui, d'un point de vue physique, n'a pas de sens.

Hormis ce point sur lequel nous reviendrons, si nous admettons l'existence d'une solution unique - ou que toutes les solutions se valent (ce qui est le cas d'un point de vue purement statistique)-, ces paramètres optimaux ne sont valables que pour le type de substrat utilisé. Si le substrat change de propriétés initiales (d'un lot à un autre par exemple ou du fait des prétraitements subis), la procédure d'identification des paramètres avec la campagne d'expériences appropriées sont à refaire. Le modèle obtenu est descriptif et ses capacités à prédire sont limitées.

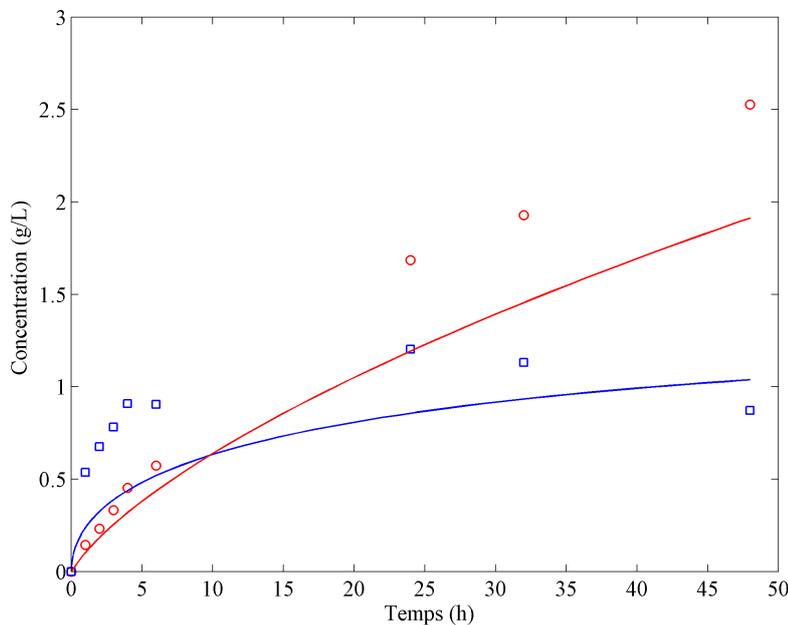


FIGURE III.10 – Comparaison entre les données expérimentales de l'Avicel PH-105 et les prédictions du modèle

Pour illustrer ce point, nous utilisons les paramètres optimaux donnés dans le tableau III.2 (optimum 2) obtenus par le fitting des expériences d'hydrolyse de l'Avicel PH-101 pour essayer de prédire la conversion d'un autre type de substrat (Avicel PH-105, taille moyenne de $20 \mu m$) avec le même cocktail cellulolytique. Le résultat est donné dans la Figure III.6.

Comme nous pouvons le voir, le modèle n'arrive pas à prédire la conversion de l'Avicel PH-105. Ce substrat est chimiquement identique mais possède une granulométrie différente de celle de l'Avicel PH-101. On peut donc imaginer que ses propriétés d'adsorption ne sont pas les mêmes du fait de la différence au niveau des surfaces spécifiques.

Pour mieux comprendre la multiplicité des solutions lors de l'identification des paramètres par une procédure utilisant les moindres carrés non négatifs, nous nous sommes appuyés sur l'étude de (Sin *et al.*, 2010) qui ont repris et analysé le modèle de (Kadam *et al.*, 2004) avec des outils statistiques pour tester sa sensibilité aux différents paramètres et l'identifiabilité de ces paramètres via l'ajustement de données typiques d'hydrolyse.

Cette analyse montre que ce modèle est sur-paramétré ce qui explique le problème d'identifiabilité rencontré dans notre cas. La structure simple du modèle à laquelle est incorporé un nombre élevé de paramètres relatifs à des phénomènes physiques importants dans le cas de l'hydrolyse aboutit au final à un système sur-déterminé. C'est le cas aussi pour l'ensemble des modèles basés sur l'extension et/ou la modification de la loi de Michaelis-Menten où la physique des phénomènes (e.g. adsorption, fragmentation du substrat) est complètement découplée de la structure mathématique utilisée pour sa modélisation. Les différents raffinements proposés consistent pour la plupart à multiplier l'expression de base par une fonction correctrice (assimilable à une exponentielle) chargée de rendre compte de l'évolution du substrat au cours du temps. Or parmi l'ensemble des propriétés du substrat, il est manifeste que la granulométrie joue un rôle capital. Rien de surprenant dès lors que l'on regarde la réaction comme de la catalyse hétérogène. Ainsi, intégrer l'aspect particulière du substrat et son évolution morphologique apparaît comme un point de passage obligé.

En plus de l'analyse proprement structurelle des modèles cinétiques (largement utilisés dans littérature) donnée dans la section I.8, l'étude statistique vient appuyer cette analyse en montrant que la structure de ce type de modèles est inappropriée pour modéliser des systèmes complexes comme la biocatalyse hétérogène. Cela constitue une preuve supplémentaire de la nécessité d'aller vers une modélisation plus avancée intégrant l'aspect particulière, ce que nous proposons via l'utilisation du formalisme de bilan de population.

Comme illustré par la figure III.11, le développement de l'outil de modélisation comporte deux volets : théorique et expérimental. Le modèle de bilan de population intègre l'aspect particulière du substrat via la prise en compte d'une propriété distribuée à savoir la taille des chaînes/particules comme variable. Il est alimenté par les différentes activités cellulolytiques et vise à prédire l'évolution de la distribution de taille des chaînes/particules ainsi que la conversion en sucres simples. Le volet expérimental de l'étude est dédié à la caractérisation biochimique et physique du milieu réactionnel par l'utilisation d'outils

dédiés présentés dans le Chapitre II. Les deux volets sont complémentaires.

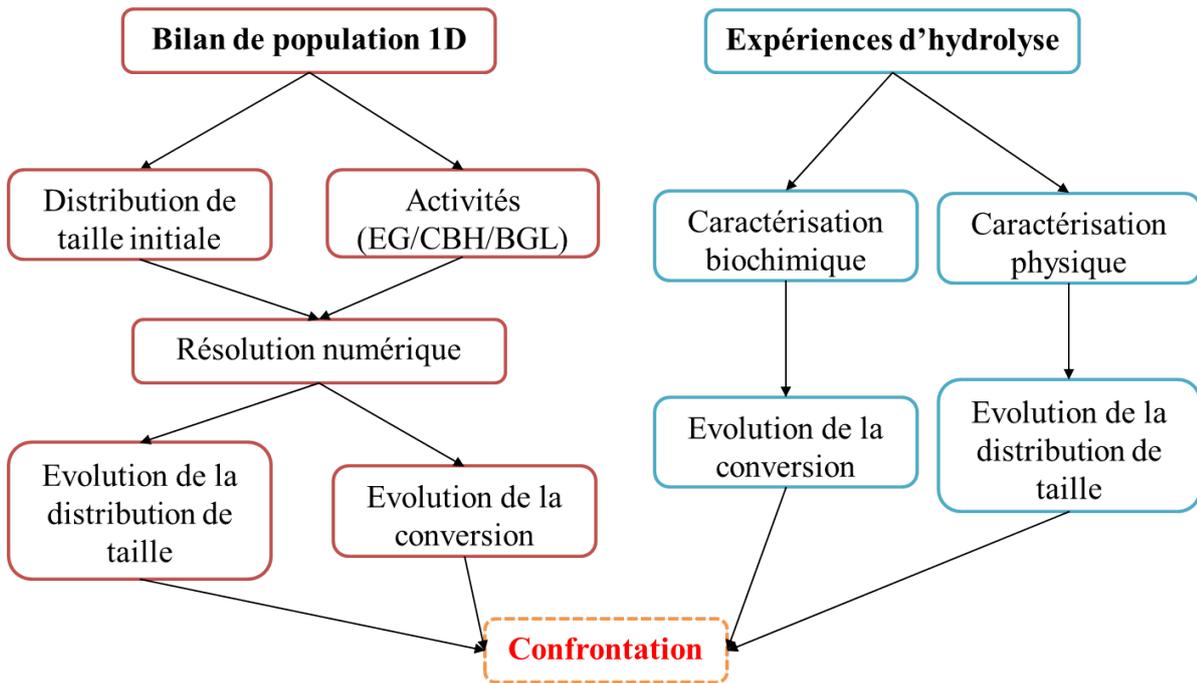


FIGURE III.11 – Schéma global de la démarche de modélisation proposée

Chapitre IV

Outils et méthodes numériques

Ce chapitre dédié au développement du modèle de bilan de population et des différentes approches numériques utilisées dans ce travail est divisé en trois grandes parties.

Dans la première partie, une description générale du formalisme du bilan de population (BP) puis le cas spécifique de l'hydrolyse enzymatique sont donnés. Dans la seconde partie sont détaillées les méthodes de résolution du BP les plus utilisées dans la littérature à savoir la méthode des classes (avec les deux techniques : pivots fixes et pivots glissants) et la méthode des moments (les deux variantes : méthode de quadrature des moments et méthode de quadrature des moments directe). Le problème de la reconstruction des distributions moyennant la connaissance d'un nombre fini de leurs moments clôture cette seconde partie. La troisième partie est dédiée à la validation numérique des méthodes de résolution. Cette validation est menée par comparaison avec la solution analytique de l'équation de BP établie dans le cas d'une rupture pure.

IV.1 Le formalisme du bilan de population

IV.1.1 Généralités

Les systèmes dispersés sont très répandus en génie des procédés (cristallisation, extraction liquide-liquide, fluidisation, systèmes gaz-liquide, ...). Ils sont constitués d'une phase continue dans laquelle des entités (particules solides, bulles, gouttelettes, cellules, ...) sont dispersées et subissent des processus de transformation de différentes natures selon le système considéré (e.g. dissolution, croissance, fragmentation, érosion, agglomération). Pour gérer cette complexité, il est impératif de développer des outils de modélisation capables

de caractériser ces systèmes à une échelle appropriée et de ce fait pouvoir comprendre et prédire leur évolution, tâche indispensable pour la finalité du procédé (e.g. qualité d'un produit).

A un instant donné, une description complète de la phase dispersée passe par la caractérisation de toutes les entités qui la constituent. Décrire chaque entité signifie connaître de sa position dans l'espace géométrique (les coordonnées externes (x, y, z) dans le cas d'un espace cartésien) et l'ensemble de ses propriétés (taille, volume/masse, composition chimique, ...) appelées coordonnées internes ou espace-phase et rassemblées dans le vecteur des propriétés $\boldsymbol{\xi}$.

En s'intéressant à une population d'entités, leur répartition dans l'espace géométrique est fonction de l'hydrodynamique du système et les propriétés de l'ensemble de ces entités sont classiquement approximées par leurs moyennes (taille moyenne par exemple). Néanmoins, cette approche globale et simple manque de réalisme et de précision dès lors que ces propriétés sont distribuées et que les processus de transformation sont non linéaires. L'approche par le bilan de population prend en compte les hétérogénéités dans l'espace-phase en s'intéressant non pas à la moyenne mais à l'ensemble de la distribution de chaque propriété. De ce fait, l'équation de bilan de population peut être défini comme une relation de continuité basée sur la fonction densité en nombre (NDF : Number Density Function) caractéristique de l'espace-phase.

IV.1.2 La fonction densité en nombre

Nous notons par $\boldsymbol{\xi} = (\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_K)$ le vecteur des K propriétés d'intérêt, $\mathbf{R} = (r_1, r_2, r_3)$ le vecteur des coordonnées externes, t le temps, $n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t)$ la fonction densité en nombre (NDF), Ω_ξ et Ω_r les domaines des coordonnées internes et externes respectivement. L'équation (IV.1) est l'élément de volume dans l'espace géométrique et l'équation (IV.2) est l'élément infinitésimal de l'espace-phase.

$$d\mathbf{R} = dr_1 dr_2 dr_3 \tag{IV.1}$$

$$d\boldsymbol{\xi} = d\xi_1 d\xi_2 \dots d\xi_K \tag{IV.2}$$

La phase continue est représentée par le vecteur $Y(\mathbf{r}, t)$ fonction des coordonnées ex-

ternes et du temps. La fonction densité en nombre donne une information sur la façon dont une population d'entités est distribuée selon les propriétés considérées dans un élément de volume. $n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t)d\mathbf{R}d\boldsymbol{\xi}$ représente le nombre d'entités dans l'élément de volume physique $d\mathbf{R}$ et dans l'élément de l'espace-phase $\boldsymbol{\xi}$ (propriétés contenues entre $\boldsymbol{\xi}$ et $\boldsymbol{\xi} + d\boldsymbol{\xi}$). Le nombre total d'entités dans le système est donné par l'équation (IV.3) (Ramkrishna, 1985) :

$$\text{Nombre total} = \int_{\Omega_{\boldsymbol{\xi}}} \int_{\Omega_{\mathbf{r}}} n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t)d\boldsymbol{\xi}d\mathbf{R} \quad (\text{IV.3})$$

L'intégration de la NDF sur l'ensemble des valeurs du vecteur de l'espace-phase donne la concentration totale en nombre $N(\mathbf{r}, t)$:

$$N(\mathbf{r}, t) = \int_{\Omega_{\boldsymbol{\xi}}} n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t)d\boldsymbol{\xi} \quad (\text{IV.4})$$

Cette concentration est le nombre total d'entités par unité de volume au temps t et à la position \mathbf{R} . D'autres fonctions densités notamment en volume et en masse peuvent être définies.

La variation temporelle de l'état d'une entité est la conséquence de son déplacement dans les deux espaces qui la définissent. Nous notons par $\dot{\mathbf{R}}(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t)$ la vitesse de déplacement dans l'espace physique des coordonnées externes et par $\dot{\boldsymbol{\xi}}(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t)$ la vitesse de déplacement de l'entité dans l'espace-phase des propriétés .

IV.1.3 L'équation générale du bilan de population

La variation de la NDF est décrite par l'équation générale de bilan de population multidimensionnel (PBE : Population Balance Equation) donnée ci-après. Pour plus de détails, le lecteur peut se référer à (Ramkrishna, 2000).

$$\frac{\partial}{\partial t}n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t) + \nabla_{\boldsymbol{\xi}} \cdot \dot{\boldsymbol{\xi}}(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t)n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t) + \nabla_{\mathbf{r}} \cdot \dot{\mathbf{R}}(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t)n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, t) = h(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t) \quad (\text{IV.5})$$

où $\nabla_{\boldsymbol{\xi}} = (\partial/\partial\xi_1, \dots, \partial/\partial\xi_K)$ est l'opérateur gradient dans l'espace-phase, $\nabla_{\mathbf{r}} = (\partial/\partial r_1, \partial/\partial r_2, \partial/\partial r_3)$ est l'opérateur gradient dans l'espace physique et $h(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, Y, t)$ représente la vitesse d'apparition et de disparition d'entités dans le système. La structure

de ce second membre sera détaillée ultérieurement.

Le premier terme de l'équation (IV.5) représente la variation temporelle de la NDF, le second terme la variation des propriétés de la NDF dans l'espace-phase et le troisième terme est relatif au transport de la NDF dans l'espace physique.

La résolution de l'équation (IV.5) passe nécessairement par la connaissance des conditions initiales et limites. Les conditions initiales données par $n(\boldsymbol{\xi}, \mathbf{r}, 0)$ explicitent les coordonnées internes et externes de la NDF au temps initial tandis que les conditions limites sont propres au système considéré et définissent les flux aux contours des domaines Ω_ξ et Ω_r (Nopens, 2005).

Dans notre cas, nous nous intéressons uniquement aux systèmes homogènes puisque les temps de mélange sont beaucoup plus courts que les temps de réaction (les réactions enzymatiques sont lentes) cependant, tout ce qui sera développé par la suite peut être intégré à un outil de simulation qui prend en charge les phénomènes de transport (CFD par exemple). De plus, nous considérons un bilan de population mono-dimensionnel où le vecteur des coordonnées internes se réduit à une seule variable. L'équation (IV.5) se réduit alors à :

$$\frac{\partial}{\partial t} n(\boldsymbol{\xi}, t) = S(\boldsymbol{\xi}, t) \quad (\text{IV.6})$$

où $S(\boldsymbol{\xi}, t)$ est le terme source relatif aux différents processus continus (variation dans l'espace-phase qui est la variable du système, e.g. croissance) et discontinus ou catastrophiques (événements brusques tels que la fragmentation, l'agglomération, ...).

IV.1.4 Terme source dans le cas de l'hydrolyse

Nous expliciterons dans cette partie le terme source de l'équation (IV.6) dans le cas général de l'hydrolyse enzymatique sans rentrer dans le détail des mécanismes élémentaires qui interviennent et qui sont propres aux modes d'action des enzymes, cette partie sera abordée dans le détail dans le Chapitre V. La variable interne est le volume v des particules et la NDF sera notée $n(v, t)$.

D'une façon générale, l'hydrolyse enzymatique d'un substrat cellulosique peut se réduire à deux mécanismes simultanés à savoir la dissolution et la fragmentation des particules. A l'échelle d'une particule (par particule, nous désignons aussi bien une particule

solide qu'une chaîne soluble, la distinction se fera plus loin), l'activité enzymatique peut avoir deux conséquences principales :

- Une perte de masse par solubilisation de la particule en sucres simples. Ce phénomène est assimilable à une dissolution.
- Une rupture de la particule produisant un ensemble de particules filles. Ce mécanisme préserve la masse.

Le terme source relatif aux phénomènes de dissolution et de fragmentation des particules est explicité comme suit :

$$S(v, t) = -\frac{\partial G(v)n(v, t)}{\partial v} + \underbrace{\int_v^\infty \beta(v, v')\Gamma(v')n(v', t)dv'}_{h(v, t)} - \Gamma(v)n(v, t) \quad (\text{IV.7})$$

où $G(v)$ est la vitesse de dissolution des particules assimilée à une croissance négative, $\Gamma(v)$ représente la fréquence de rupture d'une particule de volume v , $\beta(v, v')$ est la fonction de fragmentation décrivant la distribution des produits de rupture, en d'autres termes la densité en nombre de particules de volume v produites lors de la rupture d'une particule de volume v' .

Le premier terme à droite de l'équation (IV.7) traduit la dissolution des particules par le déplacement de la NDF dans l'espace des volumes. Le second terme concerne l'apparition de nouvelles particules de volume v suite à la fragmentation de l'ensemble des particules de volume $v' > v$ (*birth term*). Le dernier terme est relatif à la disparition de particules de volume v due à leur rupture avec une fréquence $\Gamma(v)$ (*death term*).

La formulation des expressions mathématiques des paramètres $G(v)$, $\Gamma(v)$ et $\beta(v, v')$ ainsi que la prise en compte ou non d'un ou de plusieurs terme(s) de l'équation (IV.7) selon le type d'activité enzymatique considéré ou pour d'autres considérations sera discuté dans le Chapitre V. Elle constitue le cœur de notre contribution à la modélisation de l'hydrolyse enzymatique.

IV.2 Méthodes de résolution

La résolution de l'équation (IV.6) est loin d'être une tâche aisée. En effet, la difficulté vient du terme intégral de la fonction $h(v, t)$. De ce fait, hormis quelques cas où les paramètres $\beta(v, v')$ et $\Gamma(v)$ ont des expressions mathématiques simples donnant accès à

une solution analytique, la résolution se fait via des techniques numériques.

Il existe différentes méthodes numériques pour la résolution de l'équation de BP, nous pouvons citer :

- Méthode des approximations successives (Ramkrishna, 2000)
- Méthode des générations successives (Liou *et al.*, 1997)
- Méthode des moments et des résidus pondérés (Ramkrishna, 2000)
- Méthode de discrétisation ou méthodes des classe (Hounslow *et al.*, 1988; Kumar & Ramkrishna, 1996a; Kumar & Ramkrishna, 1996b; Kumar & Ramkrishna, 1997)
- Méthode de Monte-Carlo (Kruis *et al.*, 2000; Lee & Matsoukas, 2000)
- Méthode de quadrature des moments (McGraw, 1997; Marchisio *et al.*, 2003b; Marchisio *et al.*, 2003a)
- Méthode de quadrature des moments directe (Marchisio & Fox, 2005)

Le choix de la méthode de résolution appropriée dépend de plusieurs facteurs tels que la précision voulue ou la rapidité lorsque des contraintes sur le temps de calcul s'imposent, etc. Nous développerons ci-après les méthodes utilisées dans notre cas à savoir la méthode des classes, la méthode de quadrature des moments (QMOM) et la méthode de quadrature des moments directe (DQMOM).

Un code de calcul relatif à la méthode des classes était disponible dans l'équipe et a été adapté à notre cas d'étude. Un travail sur les méthodes QMOM et DQMOM permettait d'avancer dans le domaine plus large de la prise en compte des hétérogénéités dans les systèmes biologiques.

IV.2.1 Méthode des classes

La résolution de l'équation de BP par la méthode des différences finies requiert la discrétisation de la coordonnée interne (volume dans ce cas) pour pouvoir calculer les termes dans lesquels des dérivées et des intégrales apparaissent. La qualité de la discrétisation sera ainsi dictée par des considérations numériques pour pouvoir assurer la qualité de l'intégration, une discrétisation suffisamment fine est nécessaire ce qui se répercute sur le temps de calcul. Néanmoins, dans le cas de la méthode des classes, une discrétisation grossière est adoptée de telle sorte que le bilan de population en considération soit un bilan *macroscopique* au sens de l'espace-phase. Contrairement aux attentes, cette méthode a montré sa puissance et a été utilisée avec succès dans nombre d'applications et

a permis des gains considérables en terme de temps de calcul. Cela est possible grâce à la technique de conservation de propriétés sélectionnées du système plutôt que d'estimer avec précision la NDF et donc toutes les propriétés de la population (Ramkrishna, 2000). Nous discuterons en détail ces points ci-après.

(Batterham *et al.*, 1981) furent les premiers à proposer un jeu d'équations discrétisées pour décrire le processus d'agrégation. La coordonnée interne étant le volume, ils ont considéré le cas où la gamme de taille des particules est subdivisée en intervalles selon une suite géométrique tel que $v_{i+1}/v_i = 2$. Les particules formées sont distribuées sur les classes appropriées de telle sorte que le volume soit conservé. Néanmoins, cette approche ne permet pas de prédire correctement le nombre de particules. (Hounslow *et al.*, 1988) ont proposé un jeu d'équations discrétisées où deux propriétés sont conservées à savoir la masse (proportionnelle au volume sous l'hypothèse d'une composition homogène et constante de la phase solide) et le nombre avec une partition géométrique de la coordonnée interne (volume) mais se sont limités au cas d'un processus d'agrégation pure.

(Kumar & Ramkrishna, 1996a) ont proposé une autre approche de discrétisation en considérant l'agrégation et la rupture des particules. Nous détaillons cette approche seulement pour le cas qui nous intéresse à savoir la rupture pure. Le bilan de population considéré est mono-dimensionnel avec le volume comme coordonnée interne. La répartition des classes (équation IV.8) est aléatoire. Les particules de la classe i sont représentées par la taille x_i appelée *pivot* telle que $v_i < x_i < v_{i+1}$ (Figure IV.1).

$$P_M \equiv \{0 = v_0, v_1, \dots, v_M, v_{M+1}\} \quad (\text{IV.8})$$

L'équation de bilan de population dans le cas d'une rupture pure s'écrit comme suit :

$$\frac{\partial n(v, t)}{\partial t} = \int_v^\infty \beta(v, v') \Gamma(v') n(v', t) dv' - \Gamma(v) n(v, t) \quad (\text{IV.9})$$

Par intégration sur l'intervalle $I_i = [v_i, v_{i+1}]$, le bilan macroscopique des particules dans cette classe s'écrit :

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{v_i}^{v_{i+1}} n(v, t) dv = \int_{v_i}^{v_{i+1}} \int_v^\infty \beta(v, v') \Gamma(v') n(v', t) dv dv' - \int_{v_i}^{v_{i+1}} \Gamma(v) n(v, t) dv \quad (\text{IV.10})$$

avec $i = 0, 1, \dots, M$

Le nombre total de particules dans la classe I_i est donné par l'équation (IV.11) :

$$N_i(t) \equiv \int_{v_i}^{v_{i+1}} n(v, t) dv \quad (\text{IV.11})$$

En intégrant le terme de naissance sur l'ensemble des classes, l'équation (IV.10) peut s'écrire comme :

$$\frac{\partial N_i}{\partial t} = \int_{v_i}^{v_{i+1}} \left[\sum_{j=1}^M \int_{v_j}^{v_{j+1}} \beta(v, v') \Gamma(v') n(v', t) dv' - \Gamma(v) n(v, t) \right] dv \quad (\text{IV.12})$$

Le système de $(M + 1)$ équations (IV.12) est ouvert pour les variables N_i (à la fois N_i et n' sont inconnues). La fermeture du système passe nécessairement par l'expression de la double intégrale dans le terme de droite de l'équation (IV.12) comme une fonction des variables indépendantes N_i .

IV.2.1.1 Technique des pivots fixes

Nous présentons brièvement la technique des pivots fixes proposée par (Kumar & Ramkrishna, 1996a) pour une discrétisation de l'équation de BP dans le cas d'un processus de rupture pure.

Quand une nouvelle particule v apparaît dans l'intervalle $[x_i, x_{i+1}]$ suite au processus de rupture, la question de son affectation se pose. Si la nouvelle particule a le même volume qu'un pivot donné, elle est affectée à ce pivot et conserve toutes ses propriétés. Par contre, si elle tombe dans une classe sans avoir exactement le volume du pivot représentatif de cette classe, son affectation à un seul pivot altère ses propriétés. La stratégie proposée consiste à conserver deux propriétés $f_1(v)$ et $f_2(v)$ de la particule. La particule sera répartie entre les deux pivots adjacents x_i et x_{i+1} en leur affectant des fractions $a(v, x_i)$ et $b(v, x_{i+1})$ respectivement de telle sorte que les équations (IV.13) soient satisfaites (Figure IV.1).

$$\begin{cases} a(v, x_i) f_1(x_i) + b(v, x_{i+1}) f_1(x_{i+1}) = f_1(v) \\ a(v, x_i) f_2(x_i) + b(v, x_{i+1}) f_2(x_{i+1}) = f_2(v) \end{cases} \quad (\text{IV.13})$$

Les deux propriétés $f_1(v)$ et $f_2(v)$ peuvent être la masse et le nombre par exemple. Nous explicitons ci-après la discrétisation des termes de naissance et de disparition de particules en se basant sur ce qui vient d'être expliqué.

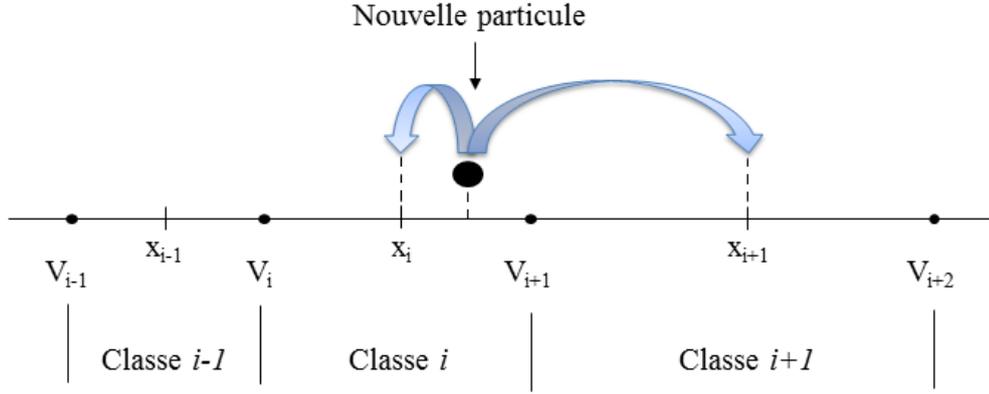


FIGURE IV.1 – Représentation schématique de la redistribution d'une nouvelle particule qui tombe entre deux pivots dans la technique des pivots fixes

Terme de naissance

Notons par R_B le terme de naissance de particules suite à la rupture :

$$R_B = \int_{v_i}^{v_{i+1}} \int_v^{\infty} \beta(v, v') \Gamma(v') n(v', t) dv dv' \quad (\text{IV.14})$$

L'équation (IV.14) peut être réécrite comme :

$$\begin{aligned} R_B &= \int_{x_i}^{x_{i+1}} a(v, x_i) dv \int_v^{\infty} \beta(v, v') \Gamma(v') n(v', t) dv' \\ &+ \int_{x_{i-1}}^{x_i} b(v, x_i) dv \int_v^{\infty} \beta(v, v') \Gamma(v') n(v', t) dv' \end{aligned} \quad (\text{IV.15})$$

Puisque les particules sont assignées à des tailles représentatives que sont les pivots, la NDF peut s'écrire comme une somme de fonctions Dirac (équation (IV.16)) :

$$n(v, t) = \sum_{k=1}^M N_k(t) \delta(v - x_k) \quad (\text{IV.16})$$

Le terme de naissance R_B (équation IV.15) peut s'écrire alors comme :

$$R_B = \sum_{k \geq i} \Gamma_k N_k(t) \int_{x_i}^{x_{i+1}} a(v, x_i) \beta(v, x_k) dv + \sum_{k \geq i} \Gamma_k N_k(t) \int_{x_{i-1}}^{x_i} b(v, x_i) \beta(v, x_k) dv \quad (\text{IV.17})$$

L'équation (IV.17) se simplifie en remplaçant $a(v, x_i)$ et $b(v, x_i)$ par les solutions du système d'équations (IV.13) pour obtenir au final l'équation (IV.18) :

$$R_B = \sum_{k=i}^M n_{i,k} \Gamma_k N_k(t) \quad (\text{IV.18})$$

où Γ_k est la fréquence de rupture des particules de taille x_k et $n_{i,k}$ est la contribution de la rupture des particules de taille x_k au i^{me} pivot et s'écrit comme :

$$n_{i,k} = \frac{B_{i,k}^{(\zeta)} x_{i+1}^\nu - B_{i,k}^{(\nu)} x_{i+1}^\zeta}{x_i^\zeta x_{i+1}^\nu - x_i^\nu x_{i+1}^\zeta} + \frac{B_{i-1,k}^{(\zeta)} x_{i-1}^\nu - B_{i-1,k}^{(\nu)} x_{i-1}^\zeta}{x_i^\zeta x_{i-1}^\nu - x_i^\nu x_{i-1}^\zeta} \quad (\text{IV.19})$$

avec :

$$B_{i,k}^{(\zeta)} = \int_{x_i}^{x_{i+1}} v^\zeta \beta(v, x_k) dv \quad (\text{IV.20})$$

Dans le cas où les deux propriétés à conserver sont le nombre et la masse, les exposants ζ et ν prennent les valeurs 0 et 1 respectivement et $n_{i,k}$ s'écrit sous la forme simple suivante :

$$n_{i,k} = \int_{x_i}^{x_{i+1}} \frac{x_{i+1} - v}{x_{i+1} - x_i} \beta(v, x_k) dv + \int_{x_{i-1}}^{x_i} \frac{v - x_{i-1}}{x_i - x_{i-1}} \beta(v, x_k) dv \quad (\text{IV.21})$$

Il suffit donc de se donner un noyau de rupture $\beta(v, x_k)$ et par intégration de l'équation (IV.21), $n_{i,k}$ se calcule aisément soit analytiquement (si l'expression de $\beta(v, x_k)$ est simple) ou numériquement.

Terme de disparition

Le terme de disparition des particules suite à leur rupture est noté R_D et donné par :

$$R_D = \int_{v_i}^{v_{i+1}} \Gamma(v) n'(v, t) dv \quad (\text{IV.22})$$

En remplaçant la NDF par son expression dans l'équation (IV.16), l'équation (IV.22)

se réduit à :

$$R_D = \Gamma_i N_i(t) \quad (\text{IV.23})$$

Ainsi, l'équation globale de la rupture pure s'écrit sous sa forme discrète comme :

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = \sum_{k=i}^M n_{i,k} \Gamma_k N_k(t) - \Gamma_i N_i(t) \quad (\text{IV.24})$$

Pour valider cette technique des pivots fixes, (Kumar & Ramkrishna, 1996a) ont comparé les résultats des simulations à des solutions analytiques pour différents phénomènes, entre autres le cas de la rupture pure (Ziff & McGrady, 1985) et de l'agrégation pure (Scott, 1968) en considérant une distribution initiale monodisperse avec des classes distribuées selon une suite géométrique tout en conservant le nombre et la masse comme propriétés. Ces tests ont été effectués en faisant varier le nombre de classes (raison de la suite géométrique) afin d'évaluer l'importance de ce paramètre.

Pour la rupture pure, uniforme et binaire/multiple, les résultats numériques obtenus sont en concordance avec la solution analytique avec une amélioration de la précision en augmentant le nombre de classes. Néanmoins, dans le cas de l'agrégation pure (cas que nous n'avons pas développé ici), les résultats numériques rejoignent la solution analytique pour les particules fines et moyennes mais surestiment les grosses particules. La qualité des résultats s'améliore en augmentant le nombre de classes mais cela se répercute sur le temps de calcul qui augmente puisque le système d'équations à résoudre devient plus conséquent. Pour résoudre ce problème, en d'autres termes, avoir une bonne précision sur l'ensemble de la distribution tout en optimisant le nombre de classes, deux stratégies peuvent être adoptées à savoir (i) l'utilisation d'une grille variable pour la distribution des classes au lieu d'une distribution géométrique fixe (ii) l'utilisation d'une grille glissante qui sera fonction du temps et adaptée à la nature du(es) phénomène(s) mis en place pour capter l'ensemble de l'intervalle de définition de la variable volume, ce qui a amené au développement de la technique présentée brièvement dans la section suivante.

IV.2.1.2 Technique des pivots glissants

Cette technique est présentée par (Kumar & Ramkrishna, 1996b). Avec la méthode des pivots fixes, les tailles minimale et maximale sont fixées dès le départ. Au début d'un

processus d'agrégation par exemple, la distribution est portée par les pivots correspondant aux petites particules mais en fin de procédé, la distribution a migré vers la droite. Un grand nombre de pivots sont nécessaires alors même qu'à chaque instant seul un petit nombre d'entre eux sont utiles. L'idée est de déplacer la grille à mesure que les particules évoluent. L'évolution des pivots ne se fait pas d'une façon aléatoire mais en cohérence avec la NDF. Nous donnons dans les équations (IV.25) et (IV.26) l'évolution de la NDF (en terme de nombre total de particules dans chaque classe) et des pivots respectivement dans le cas de la rupture pure en conservant le nombre et la masse comme propriétés. Pour plus de détail, le lecteur peut se référer au travail original de (Kumar & Ramkrishna, 1996b).

$$\frac{dN_i}{dt} = \sum_{j \geq i} \Gamma(x_j) N_j \bar{B}_{i,j}^{(1)} - \Gamma(x_i) N_i \quad (\text{IV.25})$$

$$\frac{dx_i}{dt} = -\frac{1}{N_i} \sum_{j \geq i} \Gamma(x_j) N_j \left[\bar{B}_{i,j}^{(\nu)} - x_i \bar{B}_{i,j}^{(1)} \right] \quad (\text{IV.26})$$

où

$$\bar{B}_{i,j}^{(1)} = \int_{v_i}^{v_{i+1}} \beta(v, x_j) dv \quad \text{et} \quad \bar{B}_{i,j}^{(\nu)} = \int_{v_i}^{v_{i+1}} v \beta(v, x_j) dv \quad (\text{IV.27})$$

Dans le cas de la rupture pure, il y a de plus en plus de petites particules qui apparaissent dans le système suite à la fragmentation des plus grosses. De ce fait, pour suivre cette évolution, les pivots glissent vers les petites tailles (d'où le signe négatif dans l'équation (IV.26)). Cela permet, en utilisant le même nombre de classes, de les répartir d'une façon optimale pour capter l'évolution de la FDN avec précision. Cela est crucial dans le cas de l'agrégation pour éviter une discrétisation surestimée dès le début pour éviter que de nouvelles particules ne soient en dehors de la grilles. (Kumar & Ramkrishna, 1996b) ont comparé les résultats des deux techniques dans le cas de l'agrégation pure et ont conclu que la technique des pivots glissant est plus précise et ne surestime pas les grosses particules.

IV.2.2 Méthode des moments

Contrairement à la méthode de discrétisation, la méthode des moments ne s'intéresse pas à l'évolution de la FDN directement mais à ses propriétés via les moments. Le suivi de l'évolution d'un nombre fini de moments de la FDN réduit significativement le nombre d'équations à résoudre et offre ainsi une possibilité de couplage avec des outils de mécanique des fluides numériques (CFD). Cette méthode est introduite initialement par (Hulburt & Katz, 1964).

Le moment d'ordre k (k est un entier positif) d'une densité de probabilité $f(x)$ est défini par la relation :

$$m_k = \int_0^{\infty} x^k f(x) dx \quad (\text{IV.28})$$

Les moments permettent d'accéder aux grandeurs caractéristiques d'une population de particules. Si la variable interne est la taille des particules ($x \equiv L$), le moment d'ordre $k = 0$ est le nombre total de particules (par unité de volume), le moment d'ordre $k = 1$ représente la somme des tailles L , le moment m_2 la surface totale développée par les particules et le moment m_3 le volume total des particules. Les diamètres moyens de la population de particules (Tableau II.2) peuvent être calculés via les rapports des moments $\frac{m_p}{m_q}$. A titre d'exemple, le diamètre moyen en volume est $d_{4,3} = \frac{m_3}{m_2}$.

En considérant v proportionnel à L^3 , l'équation de bilan de population basée sur la taille des particules comme coordonnée interne s'écrit, en tenant compte de la croissance et de la rupture, comme :

$$\begin{aligned} \frac{\partial n(L, t)}{\partial t} &= S(L, t) \\ &= -\frac{\partial [G(L)n(L, t)]}{\partial L} + \int_L^{\infty} \beta(L, L')\Gamma(L')n(L', t)dL' - \Gamma(L)n(L, t) \end{aligned} \quad (\text{IV.29})$$

où $n(L, t)$ est la fonction densité en nombre basée sur la taille. Pour plus de détail sur le passage de la variable volume à la variable taille comme coordonnée interne (de l'équation (IV.7) à l'équation IV.29), le lecteur peut se référer à (Marchisio *et al.*, 2003a).

Le passage à une équation de transport des moments se fait par multiplication de l'équation (IV.29) par L^k et intégration :

$$\begin{aligned} \frac{\partial m_k(t)}{\partial t} &= \int_0^\infty kL^{k-1}G(L)n(L,t)dL \\ &+ \int_0^\infty L^k \int_0^\infty \Gamma(L')\beta(L,L')n(L',t)dL'dL \\ &- \int_0^\infty L^k\Gamma(L)n(L,t)dL \end{aligned} \tag{IV.30}$$

L'utilisation des moments pour la résolution de l'équation de bilan de population pose le problème de la fermeture du système d'équations à l'aide d'un nombre fini de moments. Pour illustrer ce point, appuyons nous sur l'équation (IV.30). Si la vitesse de dissolution $G(L)$ est constante, le premier terme à droite s'écrit comme (kGm_{k-1}) et m_{k-1} est résolu. Si maintenant nous considérons une fréquence de rupture proportionnelle à la taille ($\Gamma(L) \propto L$) par exemple, le dernier terme de l'équation (IV.30) fera intervenir le moment m_{k+1} qui n'est pas connu. Pour résoudre ce problème de fermeture, des méthodes sont proposées dans la littérature. Nous explicitons ci-après deux techniques basées sur le principe de quadrature de Gauss à savoir la méthode de quadrature des moments (QMOM) et la méthode de quadrature des moments directe (DQMOM).

IV.2.2.1 Méthode de quadrature des moments (QMOM)

Le principe de la méthode QMOM est l'approximation de la FDN par une quadrature de Gauss à N points telle que (McGraw, 1997) :

$$n(L,t) \approx \sum_{i=1}^N w_i(t)\delta(L - L_i(t)) \tag{IV.31}$$

où δ est la fonction de Kronecker ou Dirac (i.e. vaut 1 si $L = L_i(x,t)$ et 0 si $L \neq L_i(t)$), $w_i(t)$ est le poids associé au Dirac centré sur la taille L_i et $L_i(t)$ est l'abscisse du Dirac i .

Ce qui permet d'avoir cette approximation pour le calcul des moments :

$$m_k(t) = \int_0^\infty L^k n(L,t)dL \approx \sum_{i=1}^N w_i(t)L_i^k(t) \tag{IV.32}$$

En substituant les équations (IV.32) et (IV.31) dans l'équation (IV.30), nous obtenons (Marchisio *et al.*, 2003a) :

$$\frac{\partial m_k}{\partial t} = kGm_{k-1} + \sum_i \Gamma_i \bar{b}_i^{(k)} w_i - \sum_i L_i \Gamma_i w_i \quad (\text{IV.33})$$

Avec :

$$\bar{b}_i^{(k)} = \int_0^\infty L^k \beta(L, L_i) dL \quad (\text{IV.34})$$

Nous obtenons un système à $2N$ équations nécessitant la connaissance des $2N$ premiers moments de la FDN. Le choix de l'ordre de la quadrature est un compromis entre le nombre de moments que l'on veut suivre, le temps de calcul et la précision voulue. Néanmoins, il est montré qu'une quadrature à trois points ($N = 3$) donne généralement des résultats avec une bonne précision (Marchisio *et al.*, 2003b).

Les poids (w_i) et les abscisses (L_i) peuvent être déterminés en utilisant l'algorithme produit-différence (PD) proposé par (Gordon, 1968). Cet algorithme est basé sur la minimisation de l'erreur commise en remplaçant l'intégrale dans l'équation (IV.32) par son approximation quadratique. En partant des $2N$ premiers moments, il est possible de déterminer les N poids et les N abscisses minimisant l'erreur en dérivant une matrice tridiagonale de rang N et en cherchant ses valeurs et vecteurs propres. Ainsi, les valeurs propres sont les abscisses et le carré de la première composante des vecteurs propres sont les poids (Marchisio *et al.*, 2003a). Le détail de l'algorithme est donné dans l'Annexe B. D'autres procédures tel que l'algorithme de Wheeler peuvent être utilisées pour remonter aux couples (L_i, w_i) (Wheeler & others, 1974).

IV.2.2.2 Méthode de quadrature des moments directe (DQMOM)

Contrairement à la méthode QMOM où un nombre fini de moments de la NDF est transporté, dans la méthode DQMOM le calcul concerne directement l'évolution des poids et des abscisses de la quadrature de la NDF sans passer par les moments et donc sans recours à un algorithme d'inversion. Nous donnons ci-après une description succincte de cette méthode dans le cas d'un système homogène et mono-variable, pour plus de détails, le lecteur peut se référer au travail original de (Marchisio & Fox, 2005).

En remplaçant la NDF par sa forme discrète (équation (IV.31)) dans l'équation

(IV.29), nous obtenons :

$$\sum_{i=1}^N \delta(L - L_i) \frac{\partial w_i}{\partial t} - \sum_{i=1}^N \delta'(L - L_i) w_i \frac{\partial L_i}{\partial t} = S_L(L, t) \quad (\text{IV.35})$$

où $\delta'(L - L_i)$ est la dérivée première de la fonction Dirac $\delta(L - L_i)$.

En introduisant les abscisses pondérées c_i à la place des abscisses L_i (équation (IV.36))

$$c_i = w_i L_i \quad (\text{IV.36})$$

et en posant :

$$\frac{\partial w_i}{\partial t} = a_i \quad \frac{\partial c_i}{\partial t} = b_i \quad (\text{IV.37})$$

(Marchisio & Fox, 2005) reformulent l'équation (IV.35) comme :

$$\sum_{i=1}^N [\delta(L - L_i) + \delta'(L - L_i) L_i] a_i - \sum_{i=1}^N \delta'(L - L_i) b_i = S_L(L, t) \quad (\text{IV.38})$$

Les inconnues a_i et b_i dépendent uniquement du temps et sont accessibles via l'inversion des moments. Moyennant les propriétés de la fonction Dirac (équations (IV.39) et (IV.40)) :

$$\int_0^{\infty} L^k \delta(L - L_i) dL = L_i^k \quad (\text{IV.39})$$

$$\int_0^{\infty} L^k \delta'(L - L_i) dL = -k L_i^{k-1} \quad (\text{IV.40})$$

Le passage aux moments (multiplication par L^k et intégration sur L) de l'équation (IV.38) aboutit à :

$$(1 - k) \sum_{i=1}^N L_i^k a_i + k \sum_{i=1}^N L_i^{k-1} b_i = \int_0^{\infty} L^k S_L(L, t) dL \quad (\text{IV.41})$$

Le passage aux moments pour le terme source aboutit à :

$$\int L^k S_L(L, t) dL = k \sum_{i=1}^N w_i L_i^{k-1} G(L_i) + \sum_{i=1}^N \Gamma_i \bar{b}_i^{(k)} w_i - \sum_{i=1}^N L_i \Gamma_i w_i \quad (\text{IV.42})$$

L'équation (IV.41) s'écrit alors :

$$(1 - k) \sum_{i=1}^N L_i^k a_i + k \sum_{i=1}^N L_i^{k-1} b_i = k \sum_{i=1}^N w_i L_i^{k-1} G(L_i) + \sum_{i=1}^N \bar{b}_i^{(k)} \Gamma_i w_i - \sum_{i=1}^N L_i^k \Gamma_i w_i \quad (\text{IV.43})$$

Le système d'équations (IV.43) peut être écrit sous forme matricielle comme :

$$Ax = d \quad (\text{IV.44})$$

où A est une matrice $(2N, 2N)$, x est le vecteur des inconnues $(2N : a_1, \dots, a_N, b_1, \dots, b_N)$ et d est le vecteur du terme source $(2N)$. De ce fait, $2N$ moments ($k = 0, \dots, 2N - 1$) sont nécessaires pour résoudre le système. L'initialisation de la résolution nécessite la connaissance des couples $(L_i(0), w_i(0))$ de la NDF initiale, pour cela l'algorithme PD ou un autre algorithme similaire peut être utilisé.

Comme dans le cas de QMOM, une quadrature à trois points nécessitant la connaissance des six premiers moments de la NDF est nécessaire pour avoir un résultat suffisamment précis. L'avantage principal de la méthode DQMOM est sa flexibilité dans les cas multidimensionnels ce qui la rend particulièrement intéressante pour le couplage avec la CFD (Computational Fluid Dynamics).

Les méthodes de résolution de l'équation de BP basées sur les moments sont intéressantes d'un point de vue coût de calcul qui est très raisonnable comparé à la méthode des classes par exemple. Par contre, elles donnent accès à l'évolution des moments exclusivement et aucune information sur la NDF elle-même ou sur une valeur ponctuelle de la distribution n'est directement accessible, ce qui est un inconvénient majeur dans nombre d'applications où ces informations sont nécessaires. Pour résoudre ce problème, des techniques de reconstruction de la NDF via la connaissance d'un nombre fini de ses moments sont développées. Nous donnons dans la section suivante une description des techniques les plus répandues.

IV.2.3 Reconstruction d'une distribution à partir de ses moments

La reconstruction d'une distribution (PDF : fonction densité de probabilité) par l'intermédiaire de la connaissance d'un nombre fini de ses moments, c'est-à-dire à partir d'une

information partielle véhiculée par les moments, est un problème mathématique connu de longue date (Stieltjes, 1894), rencontré dans des domaines très variés (e.g. physique, procédés, finance).

Dans le cas d'une distribution monovariante, le problème se décline sous trois variantes :

- $\text{supp}(f) = [a, b]$: problème des moments de *Hausdorff*
- $\text{supp}(f) = [a, +\infty)$: problème des moments de *Stieltjes*
- $\text{supp}(f) = (-\infty, +\infty)$: problème des moments de *Hamburger*

Où $\text{supp}(f)$ est le support de la fonction densité de probabilités (intervalle de définition).

Dans notre cas, nous nous intéressons à des PDFs (définies positives de ce fait), donc nous cherchons à résoudre le problème des moments de *Stieltjes*.

D'un point de vue mathématique, le problème des moments est largement étudié en se basant sur les conditions d'existence d'une ou plusieurs solutions (Shohat & Tamarkin, 1943; Studden, 1997). Théoriquement, une reconstruction parfaite peut être obtenue par la connaissance d'une infinité de moments de la PDF (John *et al.*, 2007). Numériquement, le problème est connu pour être difficilement inversible puisque le nombre fini de moments disponibles définit un système d'équations mal-conditionné (Athanasoulis & Gavriliadis, 2002). De ce fait, il n'y a pas une méthode absolue pour reconstruire une PDF d'une façon précise via la connaissance d'un nombre fini de ses moments.

La méthode de reconstruction la plus intuitive est l'approximation de la PDF recherchée par une série de distributions élémentaires (e.g. gaussienne, log-normale) quand une information sur la forme de la PDF est disponible *à priori* (Diemer & Olson, 2002). Dans ce cas, le problème est réduit à un simple fitting de paramètres. L'avantage de cette technique est le nombre réduit de moments qu'elle nécessite mais son inconvénient majeur reste la forme de la PDF qu'il faut prédire ce qui est loin d'être évident notamment dans les cas où cette forme change significativement durant le process. Nous présenterons ci-après trois techniques de reconstruction différentes qui ne nécessitent pas la connaissance de la forme de la PDF recherchée : la méthode des splines, la méthode basée sur la fonction densité de noyau bêta et la méthode du maximum d'entropie.

IV.2.3.1 Méthode des splines

Cette technique est développée par (John *et al.*, 2007). Elle consiste à subdiviser le support $[a, b]$ de la PDF en n sous-intervalles tel que $a = x_1 < x_2 < \dots < x_{n+1} = b$ et dans chaque sous-intervalle $[x_i, x_{i+1}]$, la PDF est approximée par un polynôme $s^{(l)}(x)$ d'ordre l explicité pour l'ordre 3 dans l'équation (IV.45).

$$s_i(x) = \sum_{j=0}^3 s_{i,j}(x - x_i)^j, \quad x \in [x_i, x_{i+1}], \quad i = 1, \dots, n \quad (\text{IV.45})$$

Pour chaque polynôme, 4 coefficients sont à déterminer, ce qui fait pour l'ensemble des polynômes $4n$ inconnues $s_{i,j}$. L'enjeu est donc de trouver $4n$ équations pour pouvoir déterminer l'ensemble des inconnues.

La première et la seconde dérivées de chaque polynôme sont données dans les équations (IV.46) et (IV.47).

$$s'_i(x) = \sum_{j=1}^3 s_{i,j}(x - x_i)^{j-1} \quad (\text{IV.46})$$

$$s''_i(x) = \sum_{j=2}^3 s_{i,j}(x - x_i)^{j-2} \quad (\text{IV.47})$$

La fonction $f(x)$ à reconstruire est une PDF dont les valeurs aux bornes de l'intervalle de définition sont nulles et nous assumons une transition lisse. Cela signifie pour la borne à gauche que :

$$s_1(x_1) = 0, \quad s'_1(x_1) = 0, \quad s''_1(x_1) = 0 \quad (\text{IV.48})$$

En remplaçant, nous obtenons les trois équations suivantes :

$$s_1(x_1) = s_{10} = 0, \quad s'_1(x_1) = s_{11} = 0, \quad s''_1(x_1) = 2s_{12} = 0 \quad (\text{IV.49})$$

Par analogie, nous avons pour la borne de droite :

$$s_n(x_{n+1}) = 0, \quad s'_n(x_{n+1}) = 0, \quad s''_n(x_{n+1}) = 0 \quad (\text{IV.50})$$

Ce qui donne ce système de trois équations :

$$\begin{pmatrix} 1 & x_{n+1} - x_n & (x_{n+1} - x_n)^2 & (x_{n+1} - x_n)^3 \\ 0 & 1 & 2(x_{n+1} - x_n) & 3(x_{n+1} - x_n)^2 \\ 0 & 0 & 2 & 6(x_{n+1} - x_n) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} s_{n0} \\ s_{n1} \\ s_{n2} \\ s_{n3} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (\text{IV.51})$$

Considérons maintenant la continuité des splines $s^{(3)}(x)$ aux nœuds x_{i+1} ($i = 1, \dots, n-1$), c'est à dire $s_i(x_{i+1}) = s_{i+1}(x_{i+1})$, cela donne les $(n-1)$ équations suivantes :

$$\begin{pmatrix} 1 & x_{i-1} - x_i & (x_{i-1} - x_i)^2 & (x_{i-1} - x_i)^3 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} s_{i0} \\ s_{i1} \\ s_{i2} \\ s_{i3} \\ s_{(i+1)0} \end{pmatrix} = 0 \quad (\text{IV.52})$$

Intéressons nous à présent à la continuité de la première dérivée des splines $s^{(3)}(x)$ aux nœuds x_{i+1} ($i = 1, \dots, n-1$), en d'autres termes $s'_i(x_{i+1}) = s'_{i+1}(x_{i+1})$, cela nous donne les $(n-1)$ équations suivantes :

$$\begin{pmatrix} 1 & 2(x_{i-1} - x_i) & 3(x_{i-1} - x_i)^2 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} s_{i1} \\ s_{i2} \\ s_{i3} \\ s_{(i+1)0} \end{pmatrix} = 0 \quad (\text{IV.53})$$

Finalement, nous établissons $(n-1)$ équations à partir de la continuité de la seconde dérivée des splines $s^{(3)}(x)$ aux nœuds x_{i+1} ($i = 1, \dots, n-1$) : $s''_i(x_{i+1}) = s''_{i+1}(x_{i+1})$.

$$\begin{pmatrix} 2(x_{i-1} - x_i) & 6(x_{i-1} - x_i)^2 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} s_{i2} \\ s_{i3} \\ s_{(i+1)0} \end{pmatrix} = 0 \quad (\text{IV.54})$$

Nous avons donc jusque-là, dans le cas des splines cubiques, $(3n-3)$ équations issues des conditions aux limites de l'intervalle de définition $[a, b]$, de la continuité des splines au nœuds ainsi que leurs dérivées premières et secondes, cela pour un système contenant $4n$

inconnues. Il nous manque donc $(n - 3)$ conditions pour avoir un système carré. Ces équations manquantes seront établies à partir des moments. Considérons le moment d'ordre k du spline cubique $s^{(3)}$.

$$\int_{x_1}^{x_{n+1}} x^k s^{(3)}(x) dx = \sum_{i=1}^n \int_{x_i}^{x_{i+1}} x^k s_i(x) dx = \sum_{i=1}^n \sum_{j=0}^3 s_{ij} \int_{x_i}^{x_{i+1}} x^k (x - x_i)^j dx \quad (\text{IV.55})$$

Notons :

$$I_1 = \frac{x_{i+1}^{k+1} - x_i^{k+1}}{k+1}, I_2 = \frac{x_{i+1}^{k+2} - x_i^{k+2}}{k+2}, I_3 = \frac{x_{i+1}^{k+3} - x_i^{k+3}}{k+3}, I_4 = \frac{x_{i+1}^{k+4} - x_i^{k+4}}{k+4} \quad (\text{IV.56})$$

Nous obtenons alors :

$$\begin{aligned} m_k &= \int_{x_1}^{x_{n+1}} x^k s^{(3)}(x) dx \\ &= \sum_{i=1}^n [I_1 s_{i0} + (I_2 - x_i I_1) s_{i1} + (I_3 - 2x_i I_2 + x_i^2 I_1) s_{i2} \\ &\quad + (I_4 - 3x_i I_3 + 3x_i^2 I_2 - x_i^3 I_1) s_{i3}] \end{aligned} \quad (\text{IV.57})$$

L'équation ci-dessus sera utilisée pour les $(k = n - 3)$ premiers moments. Cela signifie que le nombre de moments connus fixe le nombre de splines. Nous avons au final un système linéaire $4n \times 4n$ à résoudre.

Pour optimiser le support de reconstruction et augmenter ainsi la précision de la technique, les valeurs de la PDF reconstruite $f^{(k)}(x)$ aux limites du support (i.e. les deux sous-intervalles $[x_1^{(k)}, x_2^{(k)}]$ et $[x_n^{(k)}, x_{n+1}^{(k)}]$). Pour cela, ces deux sous-intervalles sont subdivisés en dix classes équidistantes chacun, les valeurs de $f^{(k)}(x)$ sur les noeuds des classes sont comparées à la valeur maximale de $f^{(k)}$ pour réduire éventuellement la taille du support. Ce test est donné pour la limite droite comme :

$$\left(\sum_{j=1}^{10} [(f^{(k)}(x_{nj}))^2] + (f^{(k)}(x_{n+1}^{(k)}))^2 \right)^{1/2} \leq tol_{red} f_{max}^{(k)} \quad (\text{IV.58})$$

Si l'équation (IV.58) est satisfaite, le support est réduit en mettant $x_{n+1}^{(k+1)} = (x_n^{(k)} +$

$x_{n+1}^{(k)}/2$. Pour le nouveau intervalle $[x_1^{(k+1)}, x_{n+1}^{(k+1)}]$, une redistribution équidistante des nœuds est effectuée. Pour éviter que la PDF reconstruite prenne des valeurs négative, ce qui n'a pas de sens physique, $f^{(k)}(x)$ est évaluée aux nœuds $x_i (i = 1, \dots, n + 1)$ et au milieu des sous-intervalles et comparée à une tolérance tol_{neg} (équation (IV.59)).

$$f_{min,max} := \min_{j=1,\dots,k} f_{max}^{(j)}, \quad \frac{f^{(j)}(x_i)}{f_{min,max}} \geq tol_{neg}, \quad \frac{f^{(j)}(x_{i6})}{f_{min,max}} \geq tol_{neg} \quad (\text{IV.59})$$

avec $tol_{neg} \leq 0$.

Dans (John *et al.*, 2007), les nœuds x_i sont distribués d'une façon équidistante. Cela n'est pas adapté pour les distributions bi- ou multi-modales. (De Souza *et al.*, 2010) ont développé un algorithme adaptatif où les nœuds ne sont pas équidistants mais distribués d'une façon optimale pour capter au mieux les zones singulières de la PDF.

IV.2.3.2 Méthode de reconstruction pas la fonction densité de noyau bêta

Dans cette méthode, la PDF est approximée par une somme de fonctions densité de noyau (KDF : Kernel Density Function) pondérées (Athanassoulis & Gavriiladis, 2002) :

$$f(x) = \sum_{i=1}^I p_i K(x; x_i, h) \quad (\text{IV.60})$$

où $K(x; x_i, h)$ sont les KDFs centrées sur x_i , h est un paramètre d'étalement et I est le nombre total de KDFs utilisé pour la reconstruction. Les coefficients de pondération p_i satisfont les relations :

$$p_i \geq 0, \quad i = 1, 2, \dots, I; \quad \sum_{i=1}^I p_i = 1 \quad (\text{IV.61})$$

Puisque la PDF recherchée est mono-variable et définie sur un support fermé qui peut être aisément normalisé sur $[0, 1]$, la KDF choisie est une fonction noyau Bêta. La fonction Bêta est donnée par sa forme normalisée avec κ et λ comme paramètres par l'équation (IV.62) :

$$g(x; \kappa, \lambda) = \frac{\Gamma(\kappa + \lambda)}{\Gamma(\kappa)\Gamma(\lambda)} x^{\kappa-1} (1 - x)^{\lambda-1}, \quad \kappa, \lambda > 0 \quad (\text{IV.62})$$

où Γ est la fonction *Gamma* usuelle. La fonction noyau Bêta est définie comme :

$$K(x; x_*, h) \equiv g(x; \kappa, \lambda) \quad x \in A = [0, 1] \quad (\text{IV.63})$$

Les paramètres de la PDF Bêta (κ and λ) sont reliés à ceux de la Bêta KDF (x_* et h) comme suit : $\kappa = \kappa(x_*, h)$ est la solution unique de l'équation cubique suivante :

$$A_3\kappa^3 + A_2\kappa^2 + A_1\kappa + A_0 = 0 \quad (\text{IV.64})$$

Les coefficients du polynôme (IV.64) sont :

$$\left\{ \begin{array}{l} A_3 = \frac{h^2}{x_*^3} \\ A_2 = \frac{(x_*^3 - x_*^2 + 7h^2x_* - 3h^2)}{x_*^3} \\ A_1 = \frac{(2x_* - 1)(-x_*^2 + 8h^2x_* - 3h^2)}{x_*^3} \\ A_0 = \frac{h^2(3x_* - 1)(2x_* - 1)^2}{x_*^3} \end{array} \right. \quad (\text{IV.65})$$

Et $\lambda = \lambda(x_*, h)$ est la solution de l'équation (IV.66) :

$$\lambda = M_1\kappa + M_0 \quad (\text{IV.66})$$

avec $M_1 = \frac{1-x_*}{x_*}$ et $M_0 = \left(\frac{2x_*-1}{x_*}\right)$

Les moments du noyau Bêta peuvent être estimés analytiquement par l'équation IV.67 ci-après :

$$B_k(x_*) = B_k(\kappa, \lambda) = \int_0^1 x^k g(x; \kappa, \lambda) dx = \frac{\Gamma(\kappa + \lambda)\Gamma(\kappa + k)}{\Gamma(\kappa)\Gamma(\kappa + \lambda + k)} \quad (\text{IV.67})$$

En substituant l'équation (IV.67) dans l'équation (IV.60), nous obtenons les moments m_k^+ de la PDF reconstruite :

$$m_k^+ = \sum_{i=1}^I B_{k,i} p_i, \quad k = 0, 1, \dots, N_1 \quad (\text{IV.68})$$

Pour déterminer les coefficients de pondération p_i le problème des moments est reformulé comme un problème d'optimisation sous contraintes (équation (IV.69)) :

$$\|m_k - m_k^+\|_{L^2} = \min, \quad \left(p_i \geq 0, \sum_{i=1}^I p_i = 1 \right) \quad (\text{IV.69})$$

L'équation (IV.69) peut être résolue numériquement en utilisant l'algorithme des moindres carrés non-négatifs (NNLS : Nonnegative Least Square). Pour améliorer l'efficacité de cette technique d'une part et réduire le nombre de moments nécessaires pour la reconstruction d'autre part, différentes techniques d'optimisation peuvent être utilisées. Dans notre cas, nous utilisons, en plus des moments ordinaires, les moments décalés pour rajouter des contraintes supplémentaires au système d'équations et ainsi réduire le nombre de moments. Cette technique est décrite dans le travail original de (Gavriliadis & Athanassoulis, 2003).

Les moments décalés \tilde{m}_k de la PDF $f(x)$ sont définis comme :

$$\tilde{m}_k = \int_0^1 (x - \bar{x})^j f(x) dx, \quad k = 1, 2 \dots N_2 \leq N_1, \quad \bar{x} \in [0, 1] \quad (\text{IV.70})$$

Dans le problème des moments, $f(x)$ est la distribution recherchée, de ce fait, les moments décalés \tilde{m}_k sont dérivés des moments ordinaires m_k comme suit :

$$\tilde{m}_k = \sum_{j=0}^k (-1)^j \binom{k}{j} \bar{x}^j \mu_{k-j}, \quad k = 1, 2 \dots N_1 \leq N \quad (\text{IV.71})$$

Les moments décalés d'une Bêta KDF sont calculés via l'équation (IV.72) :

$$\tilde{B}_k = \int_0^1 (x - \bar{x})^k K(x; x_i, h) dx \quad (\text{IV.72})$$

Ce qui donne les moments décalés \tilde{m}_k^+ de la reconstruction :

$$\tilde{m}_k^+ = \sum_{i=0}^I \tilde{B}_{ki} p_i, \quad k = 1, 2 \dots N_1 \leq N \quad (\text{IV.73})$$

Le problème de minimisation (équation (IV.69)) est reformulé alors comme :

$$\left\| \begin{pmatrix} \mu_k \\ \tilde{\mu}_k \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} B_k \\ \tilde{B}_k \end{pmatrix} p_I \right\|_{L^2} = \min, \quad \left(p_i \geq 0, \sum_{i=1}^I p_i = 1 \right) \quad (\text{IV.74})$$

Ce nouveau problème de minimisation sous contraintes peut être résolu en utilisant les algorithmes *NNLS* ou *LSQLIN* disponibles sous MATLAB (*optimization toolbox*).

Ainsi, l'algorithme de cette technique de reconstruction peut être réduit à ces étapes :

- Définir l'intervalle de reconstruction $[a, b]$
- Transformation des moments sur l'intervalle normalisé $[0, 1]$

- Calcul des moments décalés à partir des moments ordinaires
- Fixer le nombre I de BKDFs et le paramètre d'étalement h
- Calculer les coefficients $B_{k,i}$ et $\tilde{B}_{k,i}$
- Déterminer les coefficients p_i en résolvant le problème de minimisation sous contraintes défini par l'équation (IV.74)

IV.2.3.3 Méthode du maximum d'entropie

La méthode du maximum d'entropie (ME) approxime la PDF par une distribution lisse qui maximise l'entropie de Shannon $H[f]$ connue dans la théorie de l'information (Mead & Papanicolaou, 1984) et donnée dans l'équation (IV.75).

$$H[f] = - \int_0^{\infty} f(x) \ln f(x) dx \quad (\text{IV.75})$$

Sous les contraintes des moments (équation (IV.28)). L'existence d'une telle distribution est discutée dans (Tagliani, 1999). Ce problème standard d'optimisation sous contraintes aboutit à la représentation explicite de l'approximation $f_M(x)$ sous la forme :

$$f_M(x) = \exp \left(- \sum_{j=0}^N \varphi_j x^j \right) \quad (\text{IV.76})$$

A compléter avec les $(N + 1)$ contraintes des moments suivantes :

$$m_i = \int_0^{\infty} x^i f_M(x) dx \quad i = 0, 1, \dots, N \quad (\text{IV.77})$$

Les coefficients $\varphi_0, \dots, \varphi_N$ sont les multiplicateurs de Lagrange. En minimisant le potentiel convexe suivant :

$$\Delta = \int_0^{\infty} \left[\exp \left(- \sum_{j=0}^N \varphi_j x^j \right) - 1 \right] dx + \sum_{j=0}^N \varphi_j m_j \quad (\text{IV.78})$$

En d'autres termes, en cherchant ses points stationnaires $\frac{\partial \Delta}{\partial \varphi_i} = 0$, nous aboutissons à ce système d'équations non linéaires :

$$\int_0^{\infty} x^i \exp \left(- \sum_{j=0}^N \varphi_j x^j \right) dx = m_i \quad i = 0, 1, \dots, N \quad (\text{IV.79})$$

Il suffit donc de résoudre le système (IV.79) pour avoir accès aux multiplicateurs

de Lagrange et donc à la reconstruction. Numériquement, des méthodes itératives de type Newton sont utilisées pour la résolution avec une initialisation $\varphi^{(0)}$ et une tolérance donnée comme critère d'arrêt du calcul itératif.

La validation numérique de ces trois techniques de reconstruction des PDFs ainsi que la discussion sur leur précision, temps de calcul nécessaire et le nombre de moments requis pour avoir un résultat satisfaisant sont discutées dans l'Annexe (Publication 2).

IV.3 Validation numérique des méthodes de résolution du BP

Nous avons abordé dans la section précédente les méthodes numériques de résolution de l'équation de BP choisies à savoir la méthode des classes et la méthode des moments sous ses deux variantes QMOM et DQMOM. Nous nous sommes appuyés sur ces méthodes pour résoudre le BP dans le cas de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Pour valider numériquement ces approches, elles ont été confrontées à une solution analytique que nous développerons ci-après. La comparaison entre la solution analytique et les résultats numériques est donnée en dernier lieu.

IV.3.1 Résolution analytique de l'équation de BP

Nous cherchons à résoudre analytiquement l'équation (IV.9) avec la taille comme coordonnée interne. Pour cette équation de rupture, (Ziff & McGrady, 1985) proposent une solution dans le cas spécifique où la fréquence de rupture est $\Gamma = L^2$ et le noyau de rupture $\beta = 2/L'$. Sous ces conditions, l'équation de rupture est réécrite comme :

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = 2 \int_L^\infty L' n(L', t) dL' - L^2 n(L, t) \quad (\text{IV.80})$$

La solution générale de l'équation (IV.80) est (Ziff & McGrady, 1985) :

$$n(L, t) = e^{-tL^2} \left(n(L, 0) + 2t \int_L^\infty L' n(L', 0) dL' \right) \quad (\text{IV.81})$$

où $n(L, 0)$ est la NDF initiale.

Pour expliciter cette solution, nous supposons que la distribution initiale suit une loi normale (équation (IV.82)) avec (μ, σ) sa moyenne et son écart-type.

$$n(L, 0) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(L-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{IV.82})$$

En substituant l'équation (IV.82) dans (IV.81), nous avons :

$$n(L, t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-tL^2} \left(e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{L-\mu}{\sigma}\right)^2} + 2t \int_L^\infty L' e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{L'-\mu}{\sigma}\right)^2} dL' \right) \quad (\text{IV.83})$$

Notons I le terme intégral et procédons au changement de variable suivant :

$$L' - \mu = \hat{L}' \mapsto L' = \hat{L}' + \mu \mapsto dL' = d\hat{L}' \quad (\text{IV.84})$$

Le terme intégral est écrit alors comme :

$$I = \int \hat{L}' e^{-\frac{1}{2\sigma^2}\hat{L}'^2} d\hat{L}' + \mu \int e^{-\frac{1}{2\sigma^2}\hat{L}'^2} d\hat{L}' \quad (\text{IV.85})$$

Rappelons que :

$$\int e^{-ax^2} dx = \frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{a}} \operatorname{erf}(x\sqrt{a}) \quad (\text{IV.86})$$

et

$$\int x e^{-ax^2} dx = -\frac{1}{2a} e^{-ax^2} \quad (\text{IV.87})$$

De ce fait :

$$I = \sigma^2 e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{L-\mu}{\sigma}\right)^2} + \mu\sigma\sqrt{\frac{\pi}{2}} \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}}\frac{L-\mu}{\sigma}\right) \right) \quad (\text{IV.88})$$

En remplaçant l'équation (IV.88) dans (IV.83), nous obtenons la solution explicite finale :

$$n(L, t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-tL^2} \left[(2t\sigma^2 + 1) e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{L-\mu}{\sigma}\right)^2} + \mu\sigma t\sqrt{2\pi} \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}}\frac{L-\mu}{\sigma}\right) \right) \right] \quad (\text{IV.89})$$

où erf est la fonction *erreur*.

L'équation (IV.89) donne l'évolution temporelle de la NDF gaussienne dont les particules subissent une rupture pure avec des paramètres spécifiques (noyau et fréquence de rupture). Cette solution est illustrée dans la Figure IV.2 dans le cas où $\mu = 3$ et $\sigma = 0.25$ avec $t \in [0, 0.5]$.

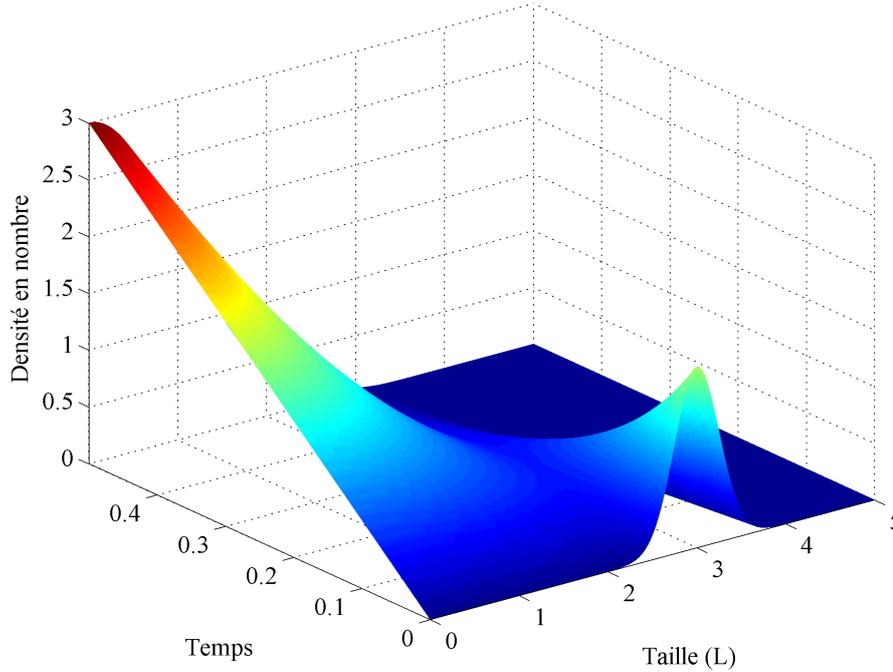


FIGURE IV.2 – *Solution analytique pour une distribution initiale gaussienne dans le cas d'une rupture pure*

IV.3.2 Validation de la méthode des classes

Pour valider l'implémentation de la méthode des classes sous MATLAB, nous comparons la solution analytique donnée par l'équation (IV.89) au résultat obtenu par la méthode des classes avec la technique des pivots fixes. Nous utilisons une grille géométrique pour générer les classes avec un premier terme $u_0 = 0.01$ et une raison $r = 2^{0.05}$. Le système d'équations discrétisées (IV.24) est intégré en utilisant `ode45` sous MATLAB. La comparaison est donnée dans la Figure IV.3.

La méthode des classes donne de très bons résultats qui s'éloignent peu de la solution analytique. Néanmoins, il a fallu utiliser un nombre important de classes pour avoir une bonne précision. A titre d'exemple, dans ce cas nous avons utilisé 180 classes.

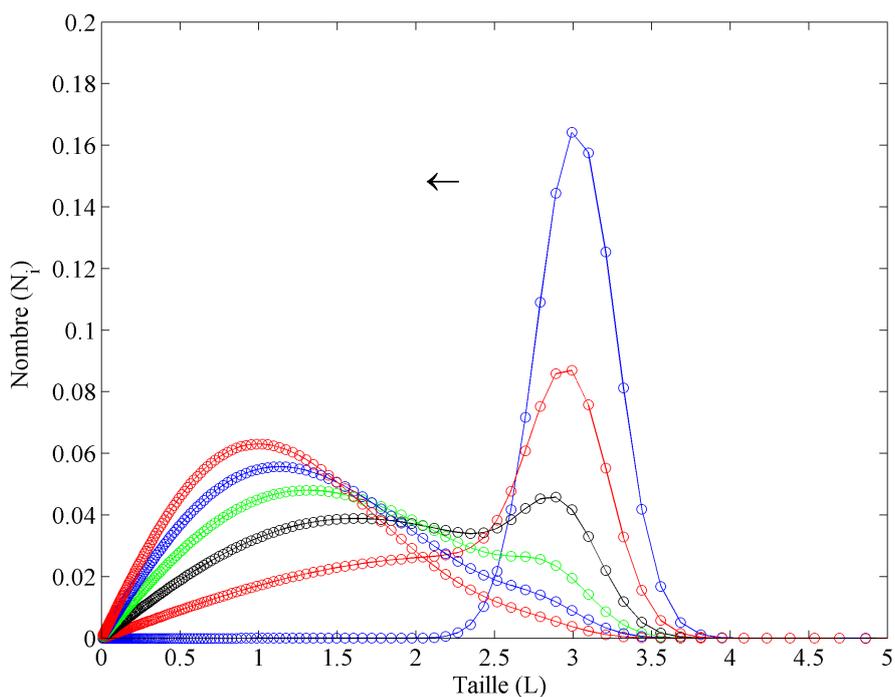


FIGURE IV.3 – Comparaison entre la solution analytique (en continu) et la résolution par la méthode des classes (en ronds) à différents instants

IV.3.3 Validation de la méthode des moments

Pour valider les méthodes QMOM et DQMOM, nous avons estimé numériquement les premiers moments de la solution analytique (IV.89) via l'équation (IV.28) que nous avons comparé avec l'évolution des moments prédits par QMOM et DQMOM en intégrant les systèmes (IV.33) et (IV.43) respectivement sous MATLAB en utilisant *quad45* et une quadrature à trois points. Le résultat est donné pour les quatre premiers moments (normalisés par les moments initiaux) dans la Figure IV.4.

Les deux méthodes donnent le même résultat et arrivent à prédire avec une bonne précision l'évolution des moments analytiques avec une quadrature à trois points. Il suffit donc de suivre l'évolution des six premiers moments de la distribution initiale, en d'autres termes résoudre un système de six équations, ce qui explique la rapidité de ces méthodes.

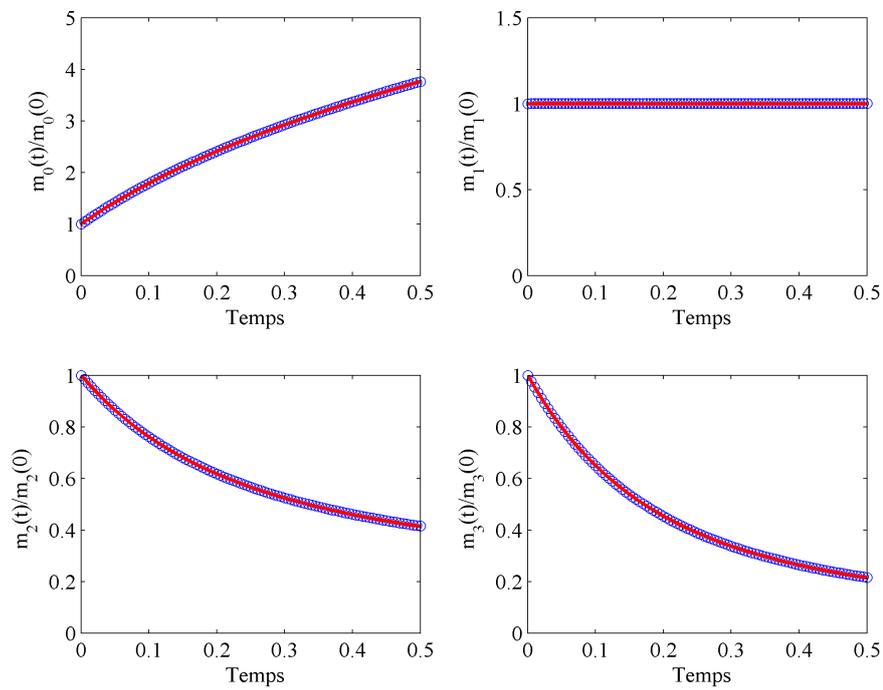


FIGURE IV.4 – Comparaison de l'évolution des moments analytiques (en continu) et des moments résolus via QMOM et DQMOM (en ronds) avec une quadrature à $N = 3$

Chapitre V

Résultats

Nous présentons dans ce dernier chapitre l'ensemble des résultats numériques et expérimentaux obtenus dans le cadre de cette étude.

Dans la partie numérique, nous explorons en premier lieu le cas d'un substrat soluble. L'équation de bilan de population est résolue par la méthode des classes puis par la méthode des moments (DQMOM) en passant par une étude comparative des techniques de reconstruction des distributions via la connaissance d'un nombre fini de leurs moments. En deuxième lieu, le cas d'un substrat particulaire est traité avec la méthode des moments.

Dans la partie expérimentale, les résultats obtenus avec les différentes techniques de caractérisation physiques et biochimiques (morphogranulométrie, FBRM, granulométrie laser, DNS) sont exposés et commentés.

V.1 Résultats numériques dans le cas d'un substrat soluble

V.1.1 Résolution par la méthode des classes

La méthode de résolution de l'équation de bilan de population la plus directe est celle des classes. Nous développons dans ce qui suit un modèle de BP dans le cas de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et nous explorons la résolution par cette méthode.

V.1.1.1 Introduction

Comme première approche, nous considérons un substrat simple de type cellulose pure soluble dans l'eau. Ainsi, ce substrat se retrouve sous forme de chaînes polysaccharides dans le milieu réactionnel. Il est converti en sucres simples grâce à l'action combinée des endoglucanases (EG) et des cellobiohydrolases (CBH). Ces deux activités principales sont prises en compte dans la modélisation.

L'activité EG, de part son mécanisme d'hydrolyse aléatoire des liaisons glycosidiques, est assimilée à une rupture pure des chaînes aboutissant à l'apparition de nouvelles chaînes de plus en plus petites. Nous admettons que la rupture dans ce cas est binaire, hypothèse valable puisque la réaction est relativement lente. Cette rupture pure est caractérisée, à l'échelle de la distribution de taille des chaînes, par une fréquence d'occurrence liée à la concentration en enzymes actives dans le système. Au niveau d'une chaîne, l'activité enzymatique est traduite par une probabilité d'attaque qui donne la position de la liaison qui sera rompue. Dans le cas précis des EG, la probabilité d'avoir une chaîne de taille x issue de la rupture d'une chaîne de taille supérieure x' est de $2/x'$. Cela signifie qu'il existe uniquement deux positions le long de x' qui, potentiellement, peuvent donner naissance à des chaînes de taille x inférieure à x' . Numériquement, la méthode des classes avec la technique des pivots fixes (Kumar & Ramkrishna, 1996a) est utilisée pour résoudre l'équation de BP dans le cas de la rupture pure. Les deux propriétés conservées lors de la redistribution des nouvelles particules qui apparaissent dans le système sont le nombre et la masse.

L'activité CBH n'est pas aléatoire, chaque attaque libère une molécule de cellobiose et la taille de la chaîne mère est, de ce fait, réduite de deux monomères. Ainsi, les chaînes cellulosiques voient leurs tailles diminuer progressivement jusqu'à la dissolution complète. Nous proposons de modéliser cette activité comme une dissolution des chaînes (croissance négative) caractérisée par une vitesse $G(x)$. De ce fait, l'utilisation de la technique des pivots glissants (Kumar & Ramkrishna, 1996b) pour la résolution numérique de l'équation de BP dans ce cas est plus appropriée. Contrairement à la technique des pivots fixes, nous n'aurons pas ici à traiter de la redistribution des particules filles sur les pivots adjacents. En effet, avec la technique des pivots glissants, la vitesse à laquelle les pivots glissent est directement reliée à la vitesse de décroissance, $G(x)$, qui, elle, traduit l'activité CBH. Par contre, pour éviter le glissement des pivots vers des tailles trop petites voire même

négative, ce qui n'a pas un sens physique, nous fixons le premier pivot sur la taille minimale à savoir celle d'un cellobiose et il reste fixe le long du processus. En glissant, quand le pivot adjacent atteint cette taille minimale, son poids est versé sur le premier pivot (pour conserver la masse totale) et le nombre total de pivots diminue de un.

Dans un cocktail cellulolytique, nous retrouvons les deux activités EG et CBH d'où la nécessité de combiner ces deux activités dans le modèle de bilan de population. Pour cela, les caractéristiques (du point de vue modélisation) de chaque activité restent inchangées, mais la résolution numérique de l'activité EG est adaptée à la technique des pivots glissants pour pouvoir la combiner facilement avec l'activité CBH. Dans ce cas, la redistribution des chaînes filles issues de la fragmentation des chaînes mères s'effectue d'une façon dynamique puisque la position des pivots est fonction du temps (glissent vers les petites tailles) tout en conservant les deux propriétés d'intérêt à savoir le nombre et la masse.

Nous détaillons dans l'article suivant (V.1.1.2) la résolution numérique de l'équation de BP dans les deux cas des EG et CBH séparément avant de les combiner pour explorer l'effet de synergie. La sensibilité du modèle aux différents paramètres est testée. En dernier lieu, une ouverture est suggérée pour tenir compte notamment de l'effet d'inhibition des enzymes par l'accumulation des produits. Dans ce cas, les vitesses d'hydrolyse par les EG/CBH sont fonction de la concentration en sucres simples.

V.1.1.2 **Article 1 : Population balance approach for the modelling of enzymatic hydrolysis of cellulose**

Cet article est publié dans "*The Canadian Journal of Chemical Engineering*", il est accessible en ligne sous le lien : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cjce.22088/pdf>

Population balance approach for the modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose

Noureddine Lebaz^{a,b,c,d}, Arnaud Cockx^{b,c,d}, Mathieu Spérandio^{b,c,d}, Jérôme Morchain^{b,c,d,*}

^aToulouse White Biotechnology (UMS INRA/INSA/CNRS), 3 rue Ariane, 31520 Ramonville Saint Agne, France

^bUniversité de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077, Toulouse, France

^cINRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, Toulouse, France

^dCNRS, UMR5504, F-31400, Toulouse, France

Abstract

In this numerical work, a population balance based model is proposed in order to describe the cellulose particles size evolution during the enzymatic hydrolysis. Two kinds of actions are considered: endoglucanase activity that cleaves randomly β -1,4-glycosidic linkages of cellulose and exoglucanase activity which reduces the particles size with chain-end-cleaving producing cellobiose (a dimer of two glucoses linked by a β -1,4-glycosidic bond). A discretization method with a fixed pivot technique is used for the endoglucanase action and a moving pivot technique for exoglucanase attack. The numerical resolution is then validated by analytical solutions available in literature. Afterwards, the combination of the two actions is investigated for different enzyme ratios in order to reproduce the endo-exo synergism numerically. Since the biodegradation of cellulose releases D-glucose as a final product due to β -glucosidase which hydrolyzes cellobiose into two molecules of glucose, numerical kinetic model predicting the fractional conversion of cellulose is derived from the population balance developed model. The enzymes activity is strongly affected by the accumulation of the end-products (cellobiose and glucose) during the hydrolysis, the inhibition effect is thereby incorporated in the model. The numerical model prediction is compared to experimental data in the case of combined activity and shows a promising approach for the modeling of cellulose-cellulase systems.

Keywords: Hydrolysis, population balance model, enzymes, cellulases, mathematical modelling

1. Introduction

The use of lignocellulosic materials, known as the largest renewable carbohydrate source on earth (Jørgensen et al., 2007), for biofuels and chemicals production has been widely studied since the global supply of fossil fuels is limited (Philippidis & Wyman, 1992; Sun & Cheng, 2002; Van Dyk & Pletschke, 2012).

The focus has been on the bioconversion of biomass by means of hydrolytic enzymes capable of degrading these insoluble materials to soluble and fermentable sugars. However, both the enzyme systems and the understanding of cell wall structure are still subject to improvement (Kristensen, 2008). Indeed, the hydrolysis

*Corresponding author. Address: INSA, LISBP, 135, avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France. Tel.: +33 56 155 9774; Fax: +33 56 155 9760

Email address: jerome.morchain@insa-toulouse.fr (Jérôme Morchain)

reaction, considered as one of the main limiting steps of the bioconversion process (Chauve et al., 2010), has a multidimensional mechanism. It depends on the chemical and structural substrate features (chemical composition especially lignin content, accessibility, reactive area) (Lin et al., 2010; Bansal et al., 2012) as well as on the biocatalyst (nature and enzymatic cocktail composition) (Medve et al., 1998; Hoshino et al., 1997) and on the operating conditions (temperature, pH and mixing) (Samaniuk et al., 2011; Chen et al., 2012). In addition to that, one has to consider complex substrate-biocatalyst interactions which remain to be elucidated (Levine et al., 2010). This complexity makes the kinetic modeling of such systems delicate and the experimental determination of the role of each parameter on the whole reaction unobvious.

Nevertheless, several kinetic models based on different assumptions have been developed for the enzymatic hydrolysis of pure cellulose and lignocellulosic materials, reviewed by Bansal et al. (2009). Michaelis-Menten based models, developed initially for homogenous reaction (such as the action of β -glucosidases on soluble cellobiose) have been used by many authors to describe the whole hydrolysis process (Bezerra & Dias, 2004; Teoh & Don, 2011). Since hydrolysis is a heterogeneous reaction, the overall rate depends on the amount of adsorbed cellulases. Adsorption models based generally on Langmuir adsorption isotherm are, thereby, used for fitting experimental data (Gan et al., 2003; Zhang et al., 2006). In these models it is assumed that the limiting step is related to the enzyme adsorption. Irreversible adsorption on lignin has been reported for lignocellulosic materials (Converse et al., 1990; Lee et al., 1994) as well as non-reactive adsorption on crystalline cellulose (Ohmine et al., 1983; Sinitsyn et al., 1989). It is important to observe that Michaelis-Menten and adsorption models share the same mathematical formalism. The parameters have different meaning but they are only apparent and global constants. For example, the fact that the specific area changes during the reaction because of the substrate liquefaction cannot be taken into account by these models (Hong et al., 2007).

More comprehensive models have been proposed integrating the rate limiting factors such as the synergistic interaction of cellulases, the activity inhibition by products accumulation and the enzyme accessibility to the hydrolysable fractions (Zhang et al., 2006; Okazaki & Moo-Young, 1978). But they are based on the same approach as those described before. Movagarnejad et al. combined Langmuir isotherm concept and shrinking particle theory (Movagarnejad et al., 2000) assuming that the particles are cylindrical and preserve their shape during the shrinkage process with an invariant diameter to height ratio. The weakness of such models lies in their inability to integrate heterogeneous particles size distribution with different shapes.

In the light of these considerations, population balance modeling can be an alternative for developing mechanistic models for systems as complex as lignocellulosic materials hydrolysis. In fact, population balance equations, used for diverse applications, draw strength from their ability to describe dynamic systems evolution taking into consideration particular level processes (breakage, aggregation ...). Except Hosseini and Shah (Hosseini & Shah, 2011b,a), no literature could be found using this approach for enzymatic lignocellulosic materials hydrolysis. In their discrete models, (Hosseini & Shah, 2011b) assimilated the cellulose hydrolysis to a linear chain depolymerisation. But for cellulose hydrolysis by endoglucanase, the discretiza-

tion scans all possible polymer lengths leading to an onerous resolution since the number of equations is proportional to the maximum initial chain length.

In this paper, we develop models for cellulose particles size evolution during their hydrolysis by endoglucanase and exoglucanase enzymes. For the resolution of the population balance equations, we use the discretization method developed by Kumar and Ramkrishna (Kumar & Ramkrishna, 1996a,b, 1997) with a fixed pivot technique for the endoglucanase activity and a moving pivot technique for the exoglucanase attack. Once these two models are validated, a combined model for both activities is proposed and solved using the moving pivot technique. This model predicts the particles size distribution during hydrolysis as well the conversion yield of the substrate. The originality of the work proposed here is to incorporate enzyme activity mechanisms into the robust framework of population balance modeling. Finally, the extension of the developed model in order to take into account the end-products inhibition effect is explored.

2. Model framework and numerical method

Population balance general equations describe particulate systems behavior when submitted to a dynamic evolution of their physical or chemical properties. In our case, we consider pure cellulose particles assimilated to polymer chains with a given initial size distribution. Enzymatic hydrolysis of this substrate leads to a progressive decrease in the chains length due to breakage and chain-end-cleaving processes. As a first step, each enzymatic activity is treated separately and the associated numerical method is presented. Then, the full model combining the two activities is described.

For a continuous and homogeneous system, the evolution of the particles size distribution undergoing binary break-up and constant growth is described by the kinetic equation (Kumar & Ramkrishna, 1997):

$$\frac{\partial n(x)}{\partial t} = -\frac{\partial [G(x)n(x)]}{\partial x} - n(x)\Gamma(x) + \int_x^\infty \beta(x, x')\Gamma(x')n(x', t)dx' \quad (1)$$

The first term on the right hand side corresponds to the net accumulation related to the growth of particles which is a kinetic phenomenon. The second term represents the loss (death) of particles with a size x due to their break-up (with a frequency $\Gamma(x)$). The last term describes the production of new particles with a size x (birth) due to the breakage of larger particles. The birth and death terms are discrete events. The last integral term represents the main issue in solving the equation (1). Except in some particular cases for which analytical solutions exist, population balance equations resolution is carried out by numerical techniques. Here, we chose the discretization method (method of classes) developed by Kumar & Ramkrishna (1996a).

2.1. Discretization method

The discretization method consists of dividing the entire property ξ range (size, volume, specific area ...) into a finite number of intervals, noted M . All particles for which the property ξ lies in the interval $[\xi_i; \xi_i + d\xi_i]$ are attributed to the i th interval represented by its center x_i called pivot. Thus, the initial problem

is transformed into a set of M equations, regarding the number of particles, $N_i(t)$, in the i^{th} interval. The integral term in each equation is approximated numerically using the same discretization.

2.2. Modeling the endoglucanase activity

The hydrolysis due to endoglucanases solely is assimilated to a pure breakage process ($G = 0$ in equation (1)). Endoglucanases are known for internally cleaving cellulose chains (figure 1). Their random actions on β -1,4-glycosidic bonds lead to binary breakages without any position preference but as admitted by Hosseini & Shah (2011b) the breakup frequency is a function of chain length since longer chains are more susceptible to be attacked. Thus, as a first approach, we consider the breakage frequency Γ proportional to cellulose chains length.

As the polymers breakage is a discrete process, it has a probabilistic foundation. Considering a cellulose chain with an initial length x' , we look for the probability $\beta(x, x')$ to form a new chain with a length x after the breakup of the chain x' . Since the breakage is binary, there are only two possible locations along the initial chain length x on which the enzymes can act in order to form the chain x (figure 1). Thus, the probability expression is $2/x'$ (Ziff & McGrady, 1985).

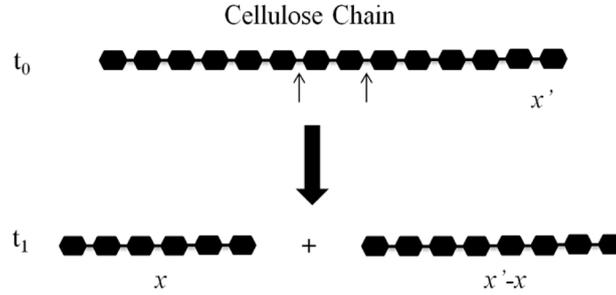


Figure 1: Schematic representation of the endoglucanases activity. Random scission with a given nature (binary in this scheme) and breakage frequency Γ . The arrows show the two possible locations leading to a particle of length x from the breakage of a particle of length x' .

During the population particles evolution, new particles are formed by breakup. The size of the newly formed particle may not correspond to an existing pivot. So this particle has to be affected to the neighboring pivots. Considering a new particle with a size ξ in the range $[x_i, x_{i+1}]$, one has to calculate the fractions $a(\xi, x_i)$ and $b(\xi, x_{i+1})$ that will be affected to the pivots x_i and x_{i+1} . Following the approach proposed by Kumar and Ramkrishna, we chose to preserve the particle number and mass, noted f_1 and f_2 , which lead to equations (2) and (3) (Kumar & Ramkrishna, 1996a).

$$a(\xi, x_i)f_1(x_i) + b(\xi, x_{i+1})f_1(x_{i+1}) = f_1(\xi) \quad (2)$$

$$a(\xi, x_i)f_2(x_i) + b(\xi, x_{i+1})f_2(x_{i+1}) = f_2(\xi) \quad (3)$$

The breakage process is defined as a continuous event over a given cellulosic chain length. It could be thought that this is in contradiction with the fact that breakup actually occur at the glycosidic linkages. In fact, the new formed chains appearing in the system are distributed on two adjacent pivots, as described previously. This solves the apparent contradiction since the pivots correspond to polymer lengths which are physically possible.

After several mathematical transformations, Kumar and Ramkrishna establish the discrete equation for the pure breakup process as the linear sum of the birth and death particles terms given below (Kumar & Ramkrishna, 1996a):

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = -\Gamma_i N_i(t) + \sum_{k=i}^M n_{ik} \Gamma_k N_k(t) \quad (4)$$

The left hand side term of the equation (4) corresponds to the variation of the total number of the particles in the i^{th} interval ($1 \leq i \leq M$) per unit time. This variation is the consequence of two phenomena appearing on the right hand side of the equation. The first term refer to the particles in the i th interval disappearing at the frequency Γ_i because of hydrolysis. It corresponds to the number of the particles of length x_i undergoing breakage process per unit time, i.e. the second term on the right hand side of equation (1). The second phenomenon is related to the particles of length $x_k \geq x_i$ which may give, after breakage, at least one particle in the i th interval. The number of the new particles appearing in the i th interval per unit time is given by the second term of the equation (4) corresponding to the discretization of the integral term of the equation (1). For further details regarding the calculation of n_{ik} , please refer to the original work cited. It is worth noting that these n_{ik} values can be calculated a priori, i.e. before starting the resolution of the set of equations (4). Indeed, the n_{ik} values depend only on the properties f_1 and f_2 and the value of the pivots.

The numerical resolution of the discretized population balance equation was performed using the fixed pivot technique and was validated by analytical solutions available in literature. Ziff and McGrady proposed analytical solutions in the cases where the breakage frequency is ($\Gamma = 1$) or ($\Gamma = x^\alpha$) (Ziff & McGrady, 1985). Once the model is validated, other breakage frequency mathematical expressions can be easily implemented.

2.3. Modeling the exoglucanase activity

The second major hydrolytic enzyme is exoglucanase, called also cellobiohydrolase. It acts on the ends of cellulose chains and releases cellobiose (figure 2). This action causes a progressive decrease of the cellulose chains length. Unlike endoglucanases requiring probabilities for predicting daughter particles length, exoglucanase activity leads invariably to a chain with a degree of polymerization decreased by two after each attack. An equal reactivity, irrespective of the chain length, is assumed.

We propose to model this hydrolytic activity as a pure growth (Kumar & Ramkrishna, 1997) with a negative rate defined as the rate of decrease of the chains length ($G(x) = dx/dt$). The hydrolysis by exoglucanases

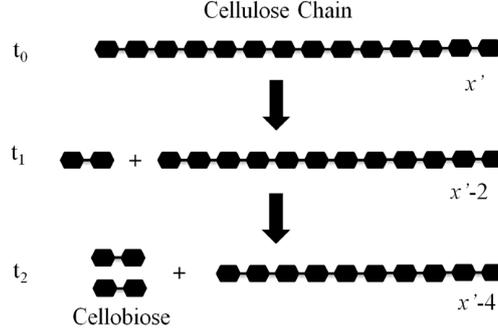


Figure 2: Schematic representation of the exoglucanases activity. Each attack produces one cellobiose and reduces the length of the initial chain by two monomers

is thus described as a continuous dissolution of the cellulose polymers. The equation to solve is obtained by setting $\Gamma = 0$ in equation (1). In that case, the moving pivot technique (Kumar & Ramkrishna, 1996b) is more appropriate for resolving the discretized population balance equation. The gradual decrease of the cellulose chains length can be related to the pivot moving rate, thus the technique reproduces indirectly the enzymatic hydrolysis rate. Generally, the moving pivot rate is either constant ($G(x) = \sigma_0$) or depending on the particles size ($G(x) = \sigma_0 x$). In the two cases, analytical solutions exist (Kumar & Ramkrishna, 1997) and are used in this work to validate the numerical results.

Compared with similar growth systems available in literature (Madras & McCoy, 1998; Woodward et al., 1988), it should be noted that in our case, in view of negative moving rate (rate of the chains dissolution by the exoglucanase activity), we must avoid switching to negative pivots which is nonsense. Note that the first pivot corresponds to a chain length of 2 monomers of glucose (cellobiose). Considering this, we set the first pivot equal to the smallest chain length in the system (cellobiose). This pivot is not moving. The other pivots move to the left at a constant rate, this means that all the cellulose chains (except cellobiose) are attacked at a same frequency. The first pivot being fixed, knowing the initial chain lengths and the moving rate, the time necessary for the second pivot to reach the first one is calculated as:

$$\tau = \frac{x_2(t) - x_1}{G(x)} \quad (5)$$

The PBE is integrated over this time interval. At the end of the time interval, the second pivot is eliminated and its final number density or total particles number is assigned to the first pivot. The procedure is repeated until the final simulation time is reached.

Since the pivots level is a chain length, their moving to smaller chain lengths induces weight loss corresponding to the produced cellobiose which can be easily evaluated. The total mass of the polymers is conserved through the process. The first moment of the distribution multiplied by the molar mass of the monomer (glucose in the present case) corresponds to the total mass of all chains. Given the initial mass,

m_T , is known and that the PBM leads to the chain length distribution at any time, the difference between the initial mass and the mass of all chains longer than 2 corresponds to the mass, m_c , that was transformed into cellobiose. Then it comes that

$$\frac{m_c(t)}{m_T} = \frac{m_T - \frac{M_{Gluc}}{N} \int_{x_2}^{\infty} xN(x,t)dx}{m_T} \quad (6)$$

Where the integral term corresponds to the total mass of the chains larger than cellobiose. Being capable of assessing the amount of the cellobiose produced during the process by means of the equation (6), one can deduce at any given time the fraction of converted substrate.

2.4. Combined model and synergistic interaction of cellulases

The discretized population balance equation (1) for a combined endoglucanase-exoglucanase activity is resolved with the moving pivot technique. This technique is chosen because it is judicious to treat the pure growth (exoglucanase activity) part of the equation (1). However since the pivot are now moving, the n_k values involved in the breakage part of the equation are no longer constant and their values have to be updated throughout the solution procedure as proposed by Kumar & Ramkrishna (1997).

The resolution of the discretized population balance equation in the different considered cases was performed with Matlab software.

3. Results and discussion

3.1. Endoglucanase activity

As discussed previously, the discretized population balance equation in the case of the endoglucanase activity is resolved with a fixed pivot technique. The initial distribution used in order to validate the numerical approach is monodisperse (all the chains have the same initial length). The breakage frequency depends on the particles size ($\Gamma = x$) and the analytical solution has been discussed by Ziff & McGrady (1985).

The Figure 3 represents a comparison between analytical and numerical number distributions during the hydrolysis reaction by endoglucanase. The Figure 4 represents the effectiveness of the breakage in terms of new particles formed in the system during the reaction. The numerical results are very close to the analytical solutions in the two cases, the error is insignificant at this level. The numerical approach is, thereby, validated.

3.2. Exoglucanase activity

The initial pivots grid is defined according to an arithmetic sequence where the first pivot corresponding to the elementary particles produced by the exoglucanase chain-end-cleaving is fixed, when the others move at a constant rate. The cellobiose as the smallest and indestructible particle in such system is chosen for the fixed pivot.

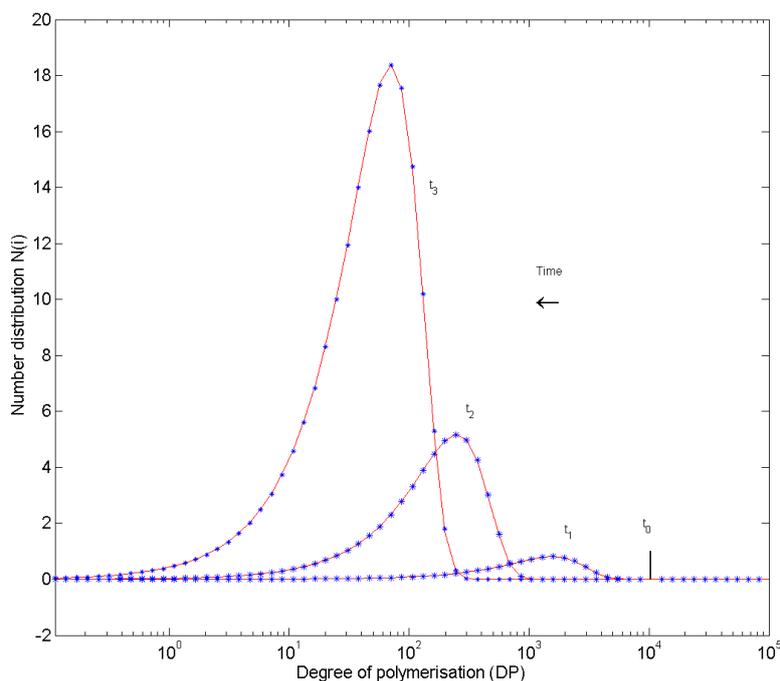


Figure 3: Number distribution evolution : comparison between analytical (continuous line) and numerical results (stars). The initial distribution is monodisperse and undertakes pure breakup with a breakage frequency $\Gamma = \alpha x$.

As expected in the case of pure growth, the Figure 5 shows a constant translation without any deformation of the initial distribution. The number of chains represented by the pivots weight remains unchanged while all the cellobiose produced during the reaction accumulates on the first pivot as we can see in the Figure 6. It can be noticed that the cellobiose production rate is constant until the left side of the distribution reaches the first pivot. From that point onward, the number of chains decreases meaning that the rate of cellobiose production becomes limited by the amount of available hydrolysable chains. At the end of the process, it can be seen that the mass conservation is satisfied since a 100% conversion is reached. This mass conservation after total hydrolysis validates the accuracy of the numerical procedure.

3.3. Endoglucanase-Exoglucanase combination activity

Once the models for the two main cellulolytic activities have been validated independently, they were combined in a global model accounting for both activities. The results obtained with a Gaussian initial size distribution are shown in the figures 7 and 8.

As we can see in the Figure 7, the combined endo/exoglucanase activity results in a progressive deformation of the initial number distribution. In fact, the particles size is reduced as a consequence of the exoglucanase action while new particles are produced by the chains cleavage leading to an increase in the number of small particles. Here again the mass balance is preserved along the conversion as illustrated in

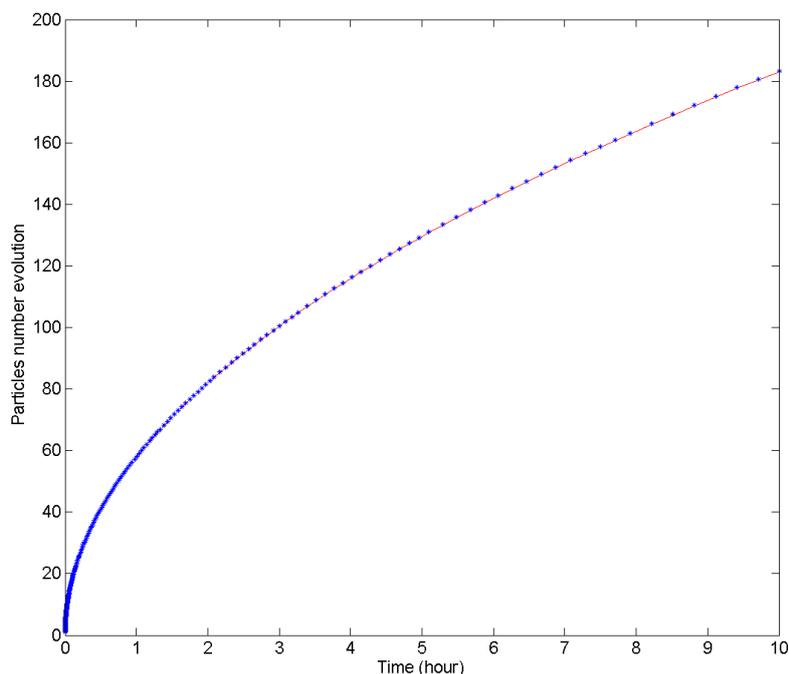


Figure 4: Total particle number evolution under the endoglucanase activity : analytical solution (continuous line), model simulation (stars)

Figure 8. In addition to that, if we assume that all the produced cellobiose is converted into glucose (disregarding the inhibition effect and the concentration of the β -glucosidases), the Figure 8 is also representative of the cellulosic fraction converted into glucose. Knowing the initial amount of substrate, the produced glucose can be assessed at any given time.

Generally, the elementary mechanisms of both cellulolytic activities can be recognized. In order to test the robustness of the model, we have compared the results obtained with various values for Γ and G which is analogous to testing different enzymes ratios (see the Table 1). In the Figure 9, we report the results obtained when only the endoglucanase activity increases (which can be experimentally correlated with the enzyme concentration). In the Figure 10, the endoglucanase activity remains constant while that of exoglucanase changes.

The increase on the activity of each enzyme leads to an enhancement of the cellulose hydrolysis rate, the maximum conversion is reached more rapidly. These results are consistent and show that the model offers an assessment of the contribution of each enzyme activity.

Furthermore, the results obtained by the combined model have been compared to those given by the two models developed initially for the two cellulolytic activities as shown by the Figure 11.

The comparison between the sum of conversions obtained by the endoglucanase and the exoglucanase

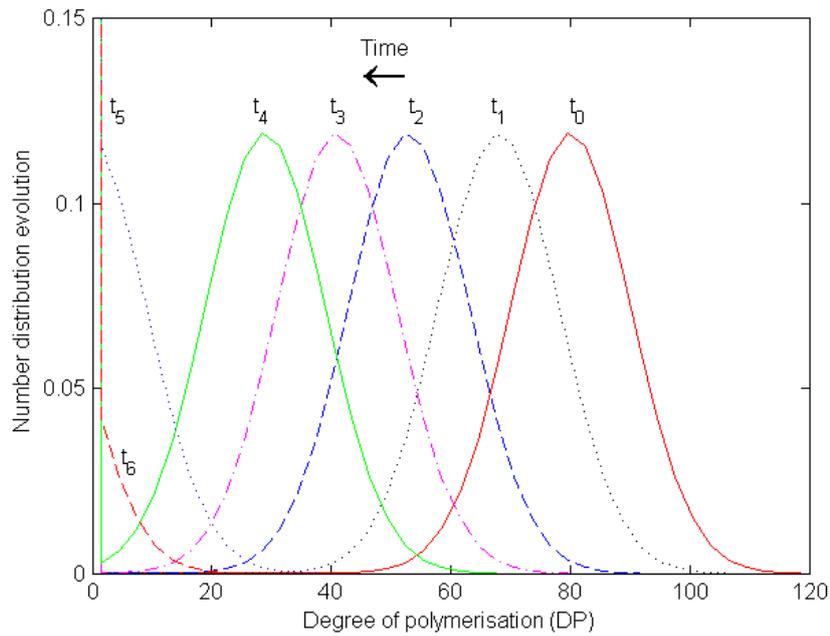


Figure 5: Number distribution evolution under exoglucanase activity ($G = -5$)

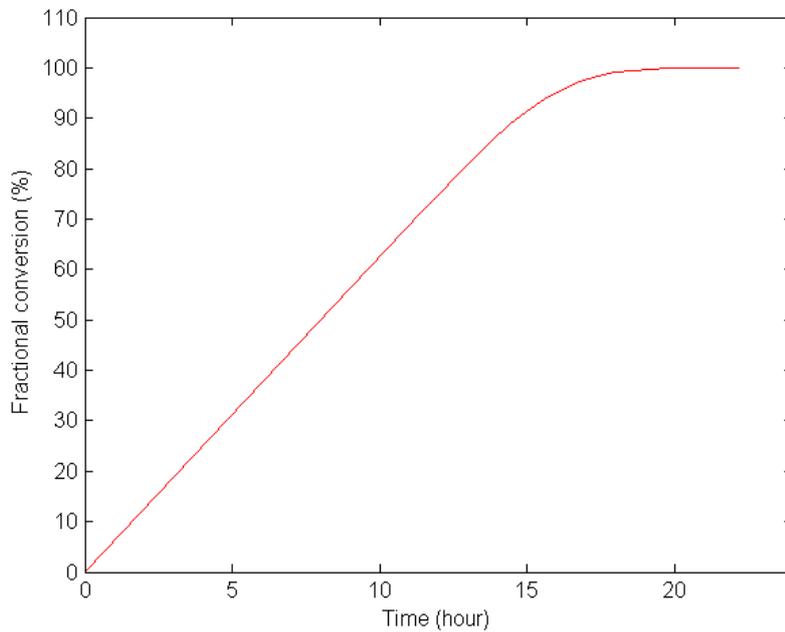


Figure 6: Substrate conversion during hydrolysis by exoglucanases. The total mass is conserved

activities separately and that given by the combined model respecting the same rates for the two activities shows a difference due to the endo-exo synergism. These results confirm that the global model can predict

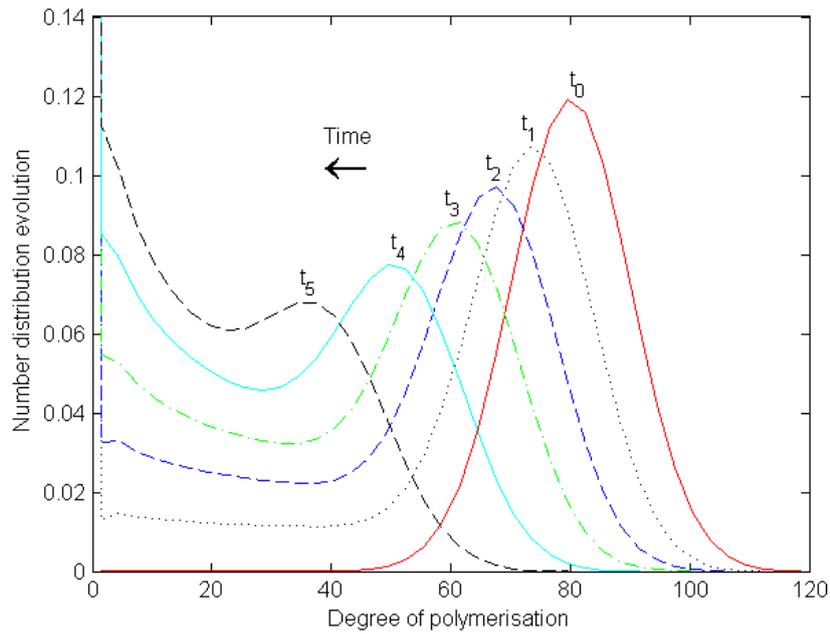


Figure 7: Number distribution evolution under combined endo/exo activities ($\Gamma = 0.25, G = -10$).

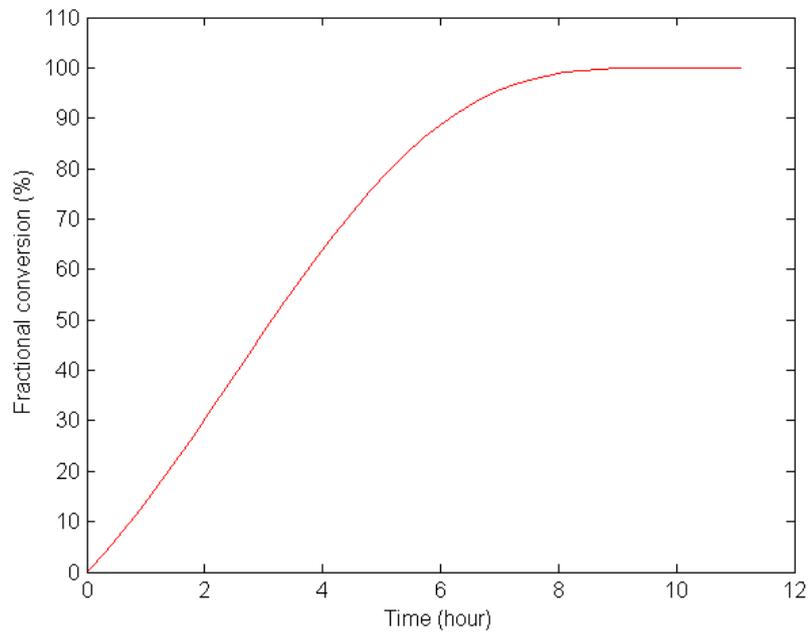


Figure 8: Simulated substrate conversion during the hydrolysis considering endo and exo activities. The masse balance is conserved ($\Gamma = 0.25, G = -10$).

Γ	0.01	0.5	1	2
G				
0.5	168	30	16	11
5	18.4	12	8.4	5.6
10	9.1	7.2	5.8	4.6
15	6	5.2	4.5	3.5

Table 1: Reaction time prediction (hours) for a conversion of 99 % of the substrate under endo/exoglucanase activity

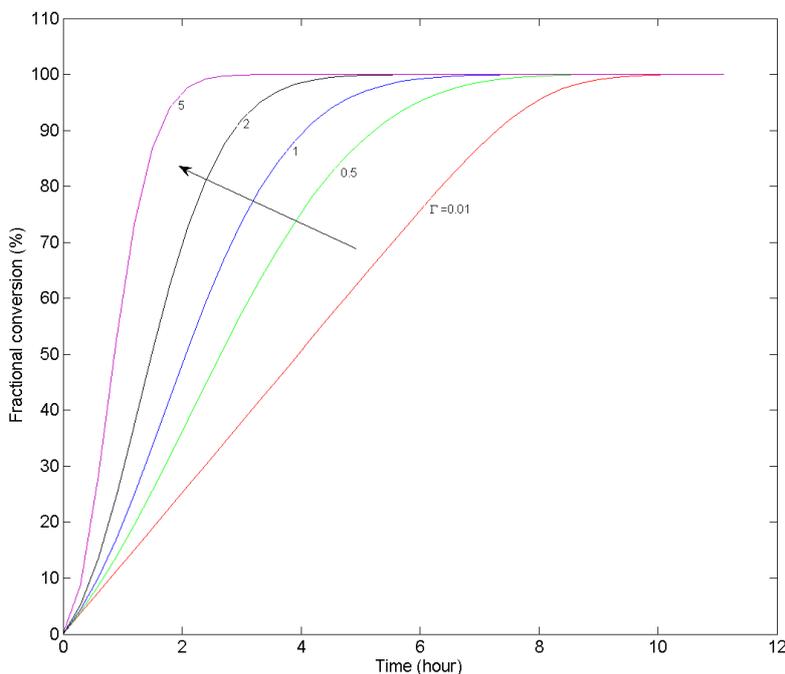


Figure 9: Substrate conversion evolution under different endoglucanase rates Γ .

and assess the synergy effect numerically according to the initially imposed enzymes activity.

In order to test the applicability of the developed model to fit experimental data in term of fractional substrate conversion, we refer to the experimental work of Woodward et al. (1988) as an example. In their experiments, they have studied the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose (Avicel PH-105) using a mixture of endoglucanase/exoglucanase from *Trichoderma reesei* and β -glucosidase from *Aspergillus niger*. The initial average degree of polymerisation of Avicel PH-105 is 230 (Jumaa et al., 2000). We assume a normal initial size distribution of the polymers with a peak at 230.

Model parameters (breakage frequency and moving rate) have been estimated assuming a maximal con-

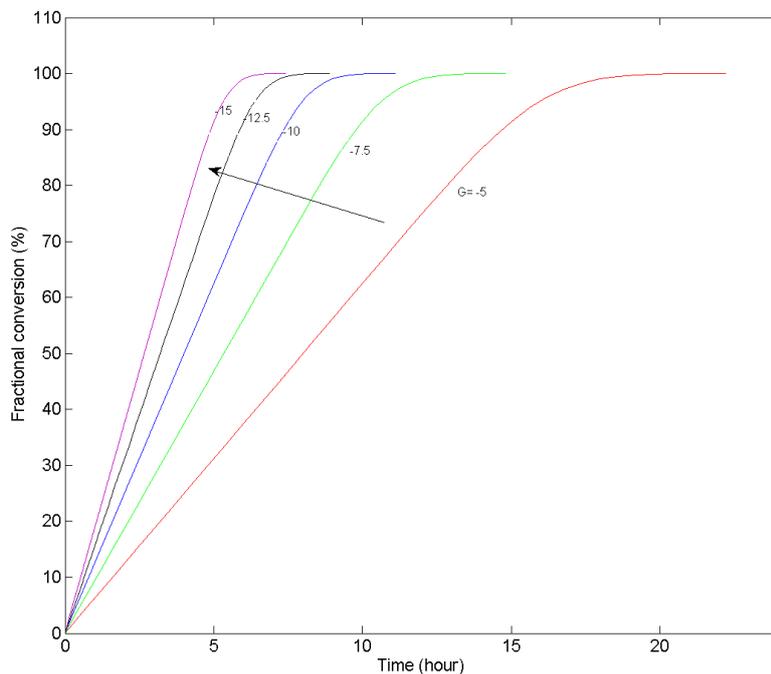


Figure 10: Substrate conversion evolution under different exoglucanase rates G .

version of 40% of initial substrate mass. As shown in the Figure 12, the model prediction is very close to the experimental results. It must be highlighted that, due to the recalcitrant nature of microcrystalline cellulose (high crystallinity index) and other parameters affecting the reaction rate, incomplete conversion is observed.

4. Discussion

The developed models for each of the two main cellulolytic activities show predictable results, successfully validated against analytical solutions. This section mainly focused on the results obtained when the two enzymatic activities are considered. Regarding the substrate conversion, typical enzymatic hydrolysis rate behavior characterized by a rapid initial rate and a progressive slowdown is reproduced by the model. In our case, the decrease of the overall hydrolysis rate is due to the substrate limitation (the number of hydrolysable chains finally goes to zero), and reaction stops when the converted fraction reaches 100%.

As far as the number of chains is concerned, the total particles number increases because of the appearance of smaller chains in the system due to the endoglucanase activity that cleaves randomly the cellulose chains. The exoglucanase activity leads to a progressive dissolution of the chains. The associated particle mass loss produces cellobiose as a final product. The model gives access to the changes in the chains length distribution. The evolution of this distribution is markedly different depending on the magnitude of each enzymatic activity considered (Table 1). The increase in chain number is related to endoglucanases whereas

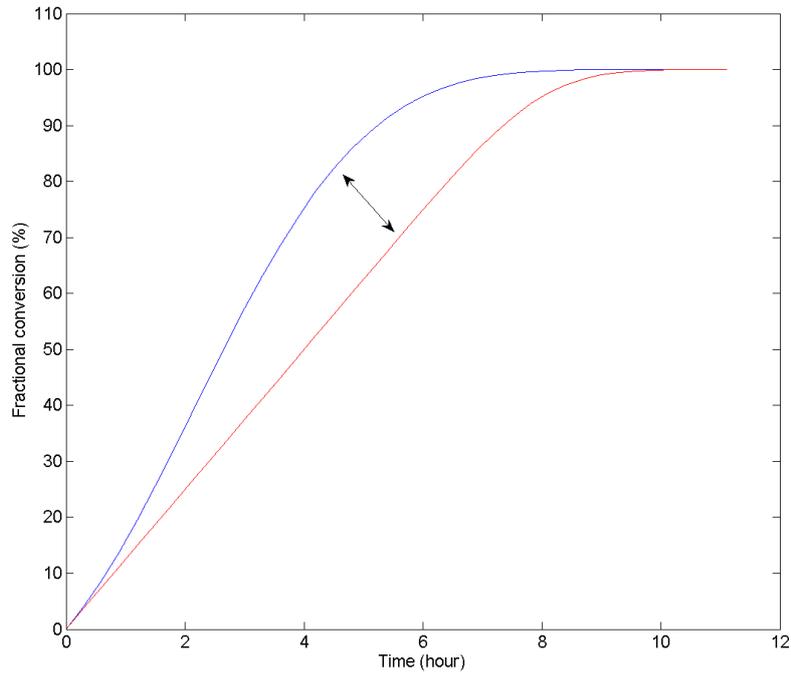


Figure 11: Substrate conversion during hydrolysis (red line) endo+exo separately, (blue line) endo and exo in cocktail ($\Gamma = 0.5, G = -10$). The arrow quantifies the gain due to the synergistic effect of the two cellulases.

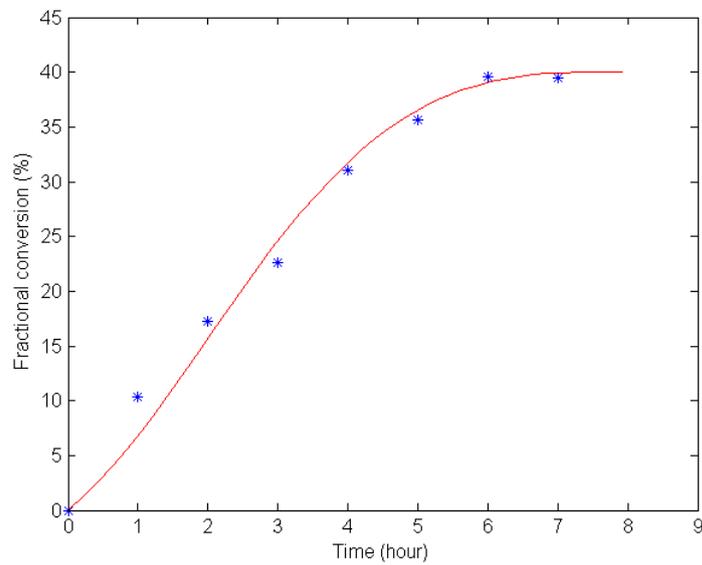


Figure 12: Substrate conversion of Avicel PH-105: (-) model prediction, (*) experimental results[35] ($\Gamma = 0.5, G = -48$)

the production of cellobiose is mostly due to the action of exoglucanases that leave the number of chains unchanged. It is remarkable that the substrate conversion curves (figures 9 and 10) are very similar to that observed in most experiments. In that sense the numerical results could be fitted with a kinetic model (Michaelis-Menten model) to identify the apparent constants. However, we can claim that the apparent values of the parameters V_{max} and K_m would be dependent on the actual values of Γ and G . It is significant that the Michaelis-Menten like shape of the conversion curve does not come from the combination of multiple enzymatic reaction models: Γ and G are true constants.

The numerical parameters Γ and G are considered as constants in this first step of the model development. It is proposed here to relate them to the enzymatic activities. On one hand, the break-up frequency (Γ) expressed as the number of chains breakages by time unit is easily turned into an enzymatic activity as defined in literature by a simple units conversion (breakages number to molar amount of reduced sugars).

$$U = \frac{\Gamma}{\mathcal{N}} \quad (7)$$

Where \mathcal{N} is the Avogadro number and U the activity in mole of product (reduced sugars in our case) formed by unit time.

On the other hand, the amount of produced cellobiose can be deduced from the constant rate (G) used for modeling the exoglucanase activity, as follows. During the hydrolysis by exoglucanases, the number of chains is constant. Assuming that the chains are polymers of a known monomer (ex. glucose) with an initial total mass m_T and that the degree of polymerization (DP) of the substrate is known, the initial number of chains is given by:

$$N(0) = \frac{m_T}{M_{Glu} DP} \quad (8)$$

If one assumes that the amount of enzyme is sufficient to attack all chains, the amount of cellobiose formed by time unit due to the action of exoglucanases is:

$$\frac{dm_c}{dt} = \frac{G}{2} \frac{N(0)}{\mathcal{N}} M_{Cello} \quad (9)$$

Recall that $G = dx/dt$, that is to say the rate of chain length reduction expressed in monomers. The coefficient 2 indicates that two monomers are needed to form one cellobiose molecule. Then $G/2$ times $N(0)$ represents the number of molecules of cellobiose formed by unit time.

$$U = \frac{1}{M_{Cello}} \frac{dm_c}{dt} = \frac{G}{2} \frac{N(0)}{\mathcal{N}} \quad (10)$$

Knowing the cellobiose releasing rate, the exoglucanase activity (U) can be easily deduced. When the three major hydrolytic enzyme activities (endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase) are combined, it is demonstrated (see Figure 11) that the hydrolysis rate exceeds the sum of the rates of the single enzymes

showing a synergistic interaction of the cellulases system (Nidetzky et al., 1994). Different synergisms depending on the nature of the cellulase system have been reported (Medve et al., 1998; Zhang et al., 2004), the main one is between endoglucanase and exoglucanase called endo-exo synergism Hoshino et al. (1997); Mooney et al. (1999). The endoglucanase internal chain-cleaving makes available additional chain ends for the action of exoglucanases, that's why, when the reaction is not limited by the concentration of exoglucanases, the hydrolysis rate increases.

One of the critically important barriers affecting the enzymatic hydrolysis rate is the end-products inhibition. The accumulation of cellobiose and glucose is partially responsible for the deceleration of the cellulases activity even at low degree of conversion of the substrate.

This means that the effectiveness of the hydrolytic enzymes falls as the end-products concentration increases in the reactor. Incorporating this phenomenon in the population balance model is quite straightforward. The model parameters characterizing the two main activities (breakage frequency and growth rate) have to be related instantaneously to the end-products concentration. We give in the equations (11) and (12) the kinetic rate expressions used in the case of non-competitive inhibition. The degree of inhibition in the system is controlled numerically by the constants K_Γ and K_G . The specific constants K_Γ and K_G can be experimentally determined. Here, they are set to arbitrary values. Γ and G are no longer constants, they are inversely proportional to the end-products concentration.

$$\Gamma(C_s) = \Gamma_0 \frac{K_\Gamma}{C_s + K_\Gamma} \quad (11)$$

$$G(C_s) = G_0 \frac{K_G}{C_s + K_G} \quad (12)$$

In the Figure 13, we compare the degree of conversion of the same initial chains population with and without taking into account the inhibition effect. These numerical results are obtained by the population balance model.

The implementation of the new parameters expressions in the population balance model gives interesting results. Unlike the previous cases where the enzymes activities are only limited by the availability of the substrate leading finally to a total conversion, the introduction of the inhibition effect reflects more the reality, the substrate conversion rate falls drastically thus, the substrate is partially converted.

The results obtained in this work in terms of the substrate particles size distribution evolution during enzymatic hydrolysis are qualitatively similar to those obtained experimentally by Mooney et al. (1999) who measured the fiber length distribution of Douglas-fir kraft pulp during enzymatic hydrolysis (Figure 14). A direct comparison between our model and these data was not attempted since the data correspond to fibers. Indeed, in the latter case, one has to think about how to express the effectiveness of each enzyme activity knowing that during the reaction, the two soluble/insoluble substrate systems coexist. Nevertheless, the similarity is encouraging and this tends to demonstrate that the numerical approach proposed here can be generalized to insoluble particles.

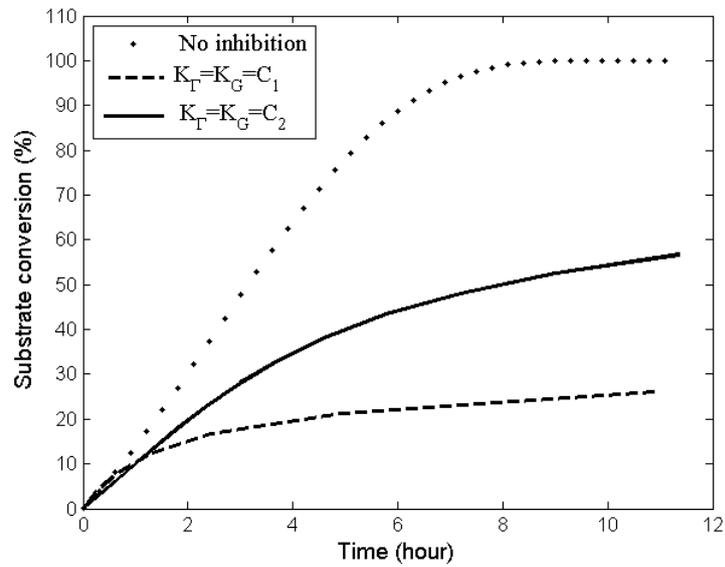


Figure 13: The inhibition effect. The cellulases activities slow down with conversion leading to a partial substrate conversion. Two cases with different inhibition constants are shown ($\Gamma = 0.25, G(0) = -10$).

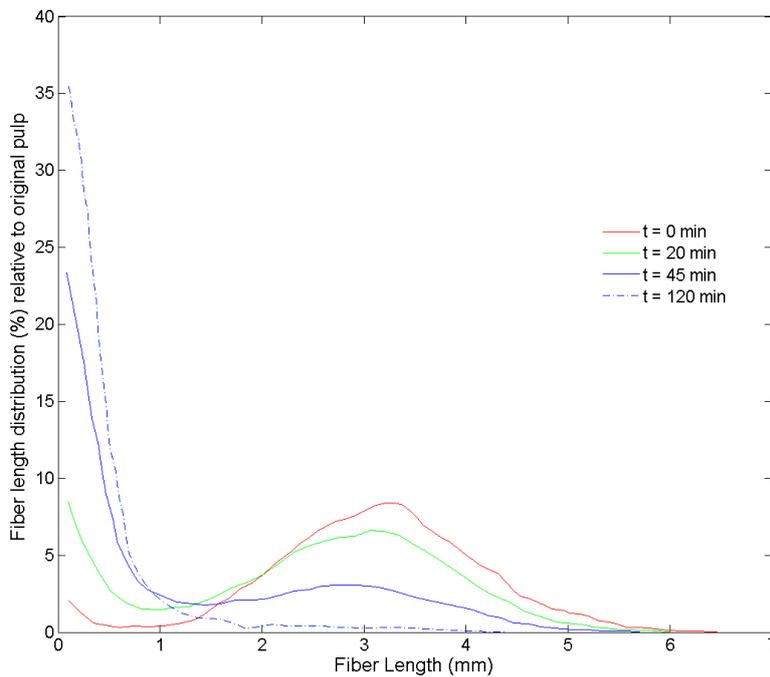


Figure 14: Changes in population fiber-length distribution of Douglas fir kraft pulp resulting from hydrolysis Mooney et al. (1999)

If one assumes that the β -glucosidase activity is such that the conversion of cellobiose into glucose is instantaneous, then the glucose concentration should evolve as the cellobiose concentration. But if one considers also the inhibitory effect on β -glucosidase, the whole degradation kinetic will become dependent on the three enzymatic activities. These inhibitory effects have been identified (Eriksson et al., 2002) and can be further incorporated in the model through the introduction of a kinetic rate expression for the β -glucosidase.

Experimental data (Woodward et al., 1988), as those of major works (Smith et al., 2010; Hall et al., 2010), show partial substrate conversion because of its decreasing reactivity due to several parameters: changes in crystallinity index (Hall et al., 2010), accessible surface area (Bansal et al., 2012) and chemical composition (Zhao et al., 2012). Incorporating these factors and their interactive effects in the model requires the development of the appropriate parameters expressions (this is done in the case of end-products inhibition effect) or the addition of other dimensions to the existing model.

5. Conclusion

A population balance based kinetic model has been developed for the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials. The pure cellulose has been assimilated to polymer chains with given initial length distribution leading, in the case of enzymatic hydrolysis, to a depolymerisation process. Firstly, the two main activities have been modeled separately in order to validate the numerical approach. A discretization method has been used for the resolution with a fixed pivot technique for the endoglucanase activity and a moving pivot technique for the exoglucanase action. Afterwards, a combined model for endoglucanase-exoglucanase activity has been proposed. Under some assumption, the kinetics of final product release are also readily accessible through this model. This model has been tested for different enzyme ratios and shows coherent results. In addition, the comparison between the conversion obtained by the global model and those given by the two initial models separately in the same conditions shows a difference attributed to the endo-exo synergism. Since the enzymatic activity is inhibited by the products, this critically important phenomenon is incorporated in the model. Finally, the prediction of the population balance model compares favorably with the experimental results available in the literature.

In this study, the formulation of a one-dimensional model is based only on the hydrolytic enzyme elementary mechanisms known in the literature disregarding other factors affecting cellulose hydrolysis rate. The principal aim was the validation of the population balance approach using simple mathematical breakage frequency and growth rate expressions. According to the results, this approach presents a real potential for a better description of the enzymatic hydrolysis of such complex systems.

Acknowledgments

The authors would like to thank *Toulouse White Biotechnology* and *Région Midi-Pyrénées* for their financial support.

Nomenclature

x, x'	Chain length
t	Time
$n(x, t)$	Number density of chains with a length x at time t
$G(x)$	Growth rate for chains of length x [monomer. t^{-1}]
$\Gamma(x)$	Breakage frequency for a chain of length x [t^{-1}]
Γ_k	Defined as $\Gamma(x_k)$
$\beta(x, x')dx'$	Number of daughter chains formed in length range x to $x + dx$ due to the breakage of x'
ξ	Property of the population
$a(x, x_i)$	Number of chains x_i assigned when a chain of length x , such that $x_i \leq x \leq x_{i+1}$, is formed
$b(x, x_{i+1})$	Number of chains x_{i+1} assigned when a chain of length x , such that $x_i \leq x \leq x_{i+1}$, is formed
f_1, f_2	Properties (number and mass) which have to be preserved
$N(t)$	Total number of chains at time t
$N_i(t)$	Total number of chains in the i th interval at time t
M	Total number of classes (chains length ranges) used to represent the total chains population
x_i	Representative length for the i^{th} length range (pivot)
n_{ik}	Total number of chains assigned to representative length x_i when a chain of length x_k breaks
τ	Characteristic time defined as the necessary time for the second pivot to reach the first one
m_c	Mass of cellobiose
M_{Glu}	Molecular mass of glucose
M_{Cello}	Molecular mass of cellobiose
\mathcal{N}	Number of Avogadro
U	Enzyme activity
m_T	Total chains mass at time $t = 0$
DP	Degree of polymerization
K_Γ, K_G	Constants introduced for the non-competitive inhibition
C_S	End-products concentration

References

- Bansal, P., Hall, M., Realff, M. J., Lee, J. H., & Bommarius, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology advances*, *27*, 833–848. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009001402>.
- Bansal, P., Vowell, B. J., Hall, M., Realff, M. J., Lee, J. H., & Bommarius, A. S. (2012). Elucidation of cellulose accessibility, hydrolysability and reactivity as the major limitations in the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource technology*, *107*, 243–250. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411018098>.

- Bezerra, R. M., & Dias, A. A. (2004). Discrimination among eight modified Michaelis-Menten kinetics models of cellulose hydrolysis with a large range of substrate/enzyme ratios. *Applied biochemistry and biotechnology*, *112*, 173–184. URL: <http://link.springer.com/article/10.1385/ABAB:112:3:173>.
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., & Ferreira, N. L. (2010). Comparative kinetic analysis of two fungal -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, *3*, 3. URL: <http://www.biomedcentral.com/1754-6834/3/3>.
- Chen, Y., Wen, Y., Zhou, J., Xu, C., & Zhou, Q. (2012). Effects of pH on the hydrolysis of lignocellulosic wastes and volatile fatty acids accumulation: The contribution of biotic and abiotic factors. *Bioresource technology*, *110*, 321–329. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412000557>.
- Converse, A. O., Ooshima, H., & Burns, D. S. (1990). Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on lignin and cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *24*, 67–73. URL: <http://www.springerlink.com/index/52842H128V0W7155.pdf>.
- Eriksson, T., Karlsson, J., & Tjerneld, F. (2002). A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7a) and endoglucanase I (Cel7b) of *Trichoderma reesei*. *Applied biochemistry and biotechnology*, *101*, 41–60. URL: <http://link.springer.com/article/10.1385/ABAB:101:1:41>.
- Gan, Q., Allen, S. J., & Taylor, G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, *38*, 1003–1018. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202002200>.
- Hall, M., Bansal, P., Lee, J. H., Realff, M. J., & Bommarius, A. S. (2010). Cellulose crystallinity a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *FEBS journal*, *277*, 1571–1582. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2010.07585.x/pdf>.
- Hong, J., Ye, X., & Zhang, Y.-H. P. (2007). Quantitative determination of cellulose accessibility to cellulase based on adsorption of a nonhydrolytic fusion protein containing CBM and GFP with its applications. *Langmuir*, *23*, 12535–12540. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la7025686>.
- Hoshino, E., Shiroishi, M., Amano, Y., Nomura, M., & Kanda, T. (1997). Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *84*, 300–306. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0922338X97892483>.
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2011a). Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model. *biomass and bioenergy*, *35*, 3830–3840. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411002315>.
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2011b). Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I: Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase. *Biomass and Bioenergy*, *35*, 3841–3848. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411002285>. doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.026.
- Jrgensen, H., Kristensen, J. B., Felby, C., & others (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *1*,

119–134. URL: http://www.researchgate.net/profile/Henning_Jorgensen/publication/227849114_Enzymatic_conversion_of_lignocellulose_into_fermentable_sugars_challenges_and_opportunities/links/546f3d960cf2d67fc031033a.pdf.

Jumaa, M., El Saleh, F., Hassan, I., Mller, B. W., & Kleinebudde, P. (2000). Influence of cellulose type on the properties of extruded pellets. Part I. Physicochemical characterisation of the cellulose types after homogenisation. *Colloid and Polymer Science*, 278, 597–607. URL: <http://link.springer.com/article/10.1007/s003960000292>.

Kristensen, J. B. (2008). *Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: Substrate interactions and high solids loadings*. Ph.D. thesis Kbenhavns Universitet'Kbenhavns Universitet', LUKKET: 2012 Det Biovidenskabelige Fakultet for Fdevarer, Veterin\ a ermedicin og NaturressourcerFaculty of Life Sciences, LUKKET: 2012 Skov & LandskabForest & Landscape Denmark, 2012 Skov & Landskab, 2012 Afd. for Skovdrift og Tr\ a eprodukterForest & Landscape Denmark, Forestry and wood products. URL: http://curis.ku.dk/ws/files/20572426/nr_42_phd_jan__web.pdf.

Kumar, S., & Ramkrishna, D. (1996a). On the solution of population balance equations by discretizationI. A fixed pivot technique. *Chemical Engineering Science*, 51, 1311–1332. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009250996884892>.

Kumar, S., & Ramkrishna, D. (1996b). On the solution of population balance equations by discretizationII. A moving pivot technique. *Chemical Engineering Science*, 51, 1333–1342. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000925099500355X>.

Kumar, S., & Ramkrishna, D. (1997). On the solution of population balance equations by discretizationIII. Nucleation, growth and aggregation of particles. *Chemical Engineering Science*, 52, 4659–4679. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250997003072>.

Lee, D., Alex, H. C., Wong, K. K., & Saddler, J. N. (1994). Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45, 407–415. URL: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02941815>.

Levine, S. E., Fox, J. M., Blanch, H. W., & Clark, D. S. (2010). A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 107, 37–51. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22789/full>.

Lin, L., Yan, R., Liu, Y., & Jiang, W. (2010). In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: cellulose, hemicellulose and lignin. *Bioresource Technology*, 101, 8217–8223. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410009429>.

Madras, G., & McCoy, B. J. (1998). Time evolution to similarity solutions for polymer degradation. *AIChE journal*, 44, 647–655. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.690440313/abstract>.

Medve, J., Karlsson, J., Lee, D., & Tjerneld, F. (1998). Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and bioengineering*, 59, 621–634. URL: <http://lup.lub.lu.se/record/125572>.

- Mooney, C. A., Mansfield, S. D., Beatson, R. P., & Saddler, J. N. (1999). The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, *25*, 644–650. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022999000988>.
- Movagarnejad, K., Sohrabi, M., Kaghazchi, T., & Vahabzadeh, F. (2000). A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solidliquid systems. *Biochemical engineering journal*, *4*, 197–206. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X99000492>.
- Nidetzky, B., Steiner, W., Hayn, M., & Claeysens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.*, *298*, 705–710.
- Ohmine, K., Ooshima, H., & Harano, Y. (1983). Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulose from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and bioengineering*, *25*, 2041–2053. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260250813/full>.
- Okazaki, M., & Moo-Young, M. (1978). Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: analytical description of a mechanistic model. *Biotechnology and bioengineering*, *20*, 637–663. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260200503/pdf>.
- Philippidis, G. P., & Wyman, C. E. (1992). Production of alternative fuels: modeling of cellulosic biomass conversion to ethanol. *Recent Advances in Biotechnology*, (pp. 405–11). URL: <http://www.cert.ucr.edu/research/ses/wymanpublications/Production%20of%20alternative%20fuels.pdf>.
- Samaniuk, J. R., Scott, C. T., Root, T. W., & Klingenberg, D. J. (2011). The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresource technology*, *102*, 4489–4494. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410019206>.
- Sinitsyn, A. P., Mitkevich, O. V., Gusakov, A. V., & Klyosov, A. A. (1989). Decrease in reactivity and change of physico-chemical parameters of cellulose in the course of enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate polymers*, *10*, 1–14. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0144861789900283>.
- Smith, B. T., Knutsen, J. S., & Davis, R. H. (2010). Empirical evaluation of inhibitory product, substrate, and enzyme effects during the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*, *161*, 468–482. URL: <http://link.springer.com/article/10.1007/s12010-010-8931-2>.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, *83*, 1–11. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401002127>.
- Teoh, Y. P., & Don, M. M. (2011). Kinetic model for the hydrolysis of sterilized palm press fibre. *Chemical Engineering Science*, *66*, 3523–3530. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250911002533>.
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymesfactors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology advances*, *30*, 1458–1480. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000687>.

- Woodward, J., Hayes, M. K., & Lee, N. E. (1988). Hydrolysis of Cellulose by Saturating and NonSaturating Concentrations of Cellulase: Implications for Synergism. *Nature Biotechnology*, 6, 301–304. URL: <http://www.nature.com/nbt/journal/v6/n3/abs/nbt0388-301.html>.
- Zhang, Y.-H. P., Lynd, L. R., & others (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, 88, 797–824. URL: http://www.researchgate.net/profile/Yi-Heng-Percival_Zhang/publication/51369730_Toward_an_aggregated_understanding_of_enzymatic_hydrolysis_of_cellulose_noncomplexed_cellulase_systems/links/0c9605281590f4ebed000000.pdf.
- Zhang, Y. P., Lynd, L. R., & others (2006). A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnology and Bioengineering*, 94, 888–898. URL: http://www.researchgate.net/profile/Yi-Heng-Percival_Zhang/publication/7094976_A_functionally_based_model_for_hydrolysis_of_cellulose_by_fungal_cellulase/links/0deec528158a3ed124000000.pdf.
- Zhao, X., Zhang, L., & Liu, D. (2012). Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6, 465–482. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bbb.1331/pdf>.
- Ziff, R. M., & McGrady, E. D. (1985). The kinetics of cluster fragmentation and depolymerisation. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, 18, 3027. URL: <http://iopscience.iop.org/0305-4470/18/15/026>.

V.1.1.3 Conclusion sur la méthode des classes

Nous avons développé un modèle de bilan de population pour l'hydrolyse enzymatique de la cellulose à une seule dimension, basé sur la taille des chaînes comme variable, en considérant les deux activités cellulolytiques principales à savoir les EG et CBH. L'activité EG est traduite par une rupture binaire aléatoire tandis que l'activité CBH est assimilée à un processus de dissolution des chaînes. Dans les deux cas, le bilan de population est résolu par la méthode des classes avec la technique des pivots fixes pour l'activité EG et la technique des pivots glissants pour l'activité CBH. Les deux activités ont été testées et validées séparément avant d'être combinées. Nous avons considéré des cas simples où la fréquence de rupture (activité EG) et la vitesse de dissolution (activité CBH) sont constantes.

Comme résultat, le modèle nous donne accès à l'évolution temporelle de la distribution de taille des chaînes ainsi que la cinétique de conversion en sucres simples. L'activité EG, de part son mode d'action, génère de nouvelles chaînes qui s'accumulent sur les petites tailles et induit de ce fait une forte déformation de la distribution initiale. L'activité CBH conserve la forme de la distribution initiale tout en glissant vers les petites tailles et la perte en masse qui s'en suit se retrouve sous forme de cellobiose sur le premier pivot. De plus, la combinaison des deux activités dans un seul modèle reproduit numériquement l'effet de synergie Endo/Exo. En effet, l'augmentation du nombre de chaînes dans le milieu réactionnel grâce à l'activité EG induit une disponibilité croissante d'extrémités susceptibles d'être attaquées par les CBH. Nous retrouvons aussi la forme classique d'une cinétique enzymatique qui démarre vite avant de décroître progressivement et de se stabiliser. Néanmoins, dans notre cas, cette décroissance est gérée uniquement par la disponibilité du substrat qui est l'unique limitation. La vitesse globale de conversion s'annule une fois que l'ensemble du substrat est transformé. L'ajout de l'effet d'inhibition introduit une limitation par l'accumulation du produit ce qui induit une décroissance de la vitesse d'hydrolyse avant d'atteindre la conversion totale.

En terme de temps de calcul, malgré l'utilisation d'un nombre relativement réduit de classes (environ 40 classes dans les exemples de l'article) et des paramètres ayant des expressions mathématiques simples (pour $\beta(x, x')$, $\Gamma(x)$ et $G(x)$), le temps de calcul reste élevé (quelques heures), ce qui reste l'un des inconvénients majeurs de la méthode des classes. De plus, son couplage avec la CFD ou son extension pour des cas multidimen-

sionnels reste complexe. Cela nous a motivé pour explorer la méthode des moments.

V.1.2 Résolution par la méthode des moments

La méthode des moments, sous ses différentes variantes, a été introduite dans le Chapitre IV. Elle donne une information exclusive sur l'évolution d'un nombre fini de moments de la NDF initiale selon le(s) processus considéré(s). Le nombre réduit de moments nécessaires pour avoir une bonne précision améliore grandement la vitesse de résolution.

Néanmoins, cette méthode ne permet pas d'avoir accès à l'évolution de la NDF elle-même ni à une information partielle relative à la NDF (une valeur ponctuelle par exemple). Or, ce type d'information, selon le domaine d'étude, peut s'avérer crucial pour des besoins d'identification/comparaison avec des résultats expérimentaux à titre d'exemple ou de conduite du procédé en question tout simplement. Pour cela, différentes techniques de reconstruction existent et les plus répandues font l'objet d'une étude comparative présentée ci-après (partie V.1.2.2). Cette étude est menée sur un problème de rupture pure.

Avant d'entrer dans la description technique, il nous semble important de justifier cette partie du travail dans notre cas. Lors d'un suivi expérimental de l'évolution de la distribution de taille des particules du substrat au cours de la réaction d'hydrolyse enzymatique, quelque soit la technique utilisée, le résultat sera donnée dans un intervalle de taille imposé par la sensibilité de l'outil d'analyse. Cela signifie que nous ne pourrons pas accéder à l'ensemble de la distribution de taille réelle mais uniquement à une partie. Or, les méthodes numériques considèrent l'ensemble des tailles possibles. Ainsi, pour des besoins de comparaison, l'accès à la distribution de taille durant la résolution numérique est primordial. Cela permettrait, une fois tronquée sur l'intervalle de taille adéquat, soit une comparaison directe avec l'expérience, ou l'extraction des moments numériques sur ce même intervalle pour l'exploitation des propriétés moyennes. Cela n'est pas accessible directement via les méthodes aux moments.

V.1.2.1 Reconstruction des PDFs à partir des moments

L'étude qui suit concerne la comparaison de trois techniques de reconstruction des PDFs via la connaissance d'un nombre fini de leurs moments dans le cas d'un processus de dépolymérisation. Les critères de comparaison sont la qualité de la reconstruction, le nombre minimal de moments nécessaires et le temps de calcul.

Le cas d'étude concerne un processus de dépolymérisation où les chaînes subissent une rupture aléatoire. De plus, nous nous plaçons dans des conditions favorables (fréquence et noyau de rupture) où une solution analytique existe (Ziff & McGrady, 1985). Cette solution analytique est discutée dans le Chapitre IV. Ainsi, nous avons accès analytiquement à l'évolution temporelle de la distribution de taille des chaînes et donc à l'évolution de leurs moments analytiques.

Trois techniques sont présentées dans le Chapitre IV : la technique BKDF basée sur une approximation de la PDF via une somme finie de fonctions densité de noyau Bêta (Athanasoulis & Gavriliadis, 2002), la technique des splines qui est une approximation de la PDF par une série de polynômes (John *et al.*, 2007) et enfin la technique du maximum d'entropie de Shannon (Mead & Papanicolaou, 1984).

En premier lieu, les moments analytiques (à différents temps) sont utilisés pour alimenter la reconstruction via ces trois différentes techniques. La méthode la plus précise/rapide nécessitant un nombre minimal de moments est sélectionnée.

En deuxième lieu, le même problème de dépolymérisation est résolu par la méthode des moments (QMOM/DQMOM) et les moments numériques obtenus servent à alimenter la méthode de reconstruction sélectionnée auparavant. La reconstruction se fait simultanément avec la résolution par la méthode des moments. Le but de cette approche est d'analyser la sensibilité de la technique de reconstruction aux erreurs numériques induites par la résolution via QMOM/DQMOM. Ces erreurs reflètent la précision de la quadrature de Gauss et sont induites essentiellement par l'algorithme servant à déterminer les nœuds (les poids et les abscisses) de la quadrature.

Ainsi, contrairement à la plupart des études traitant de la reconstruction des PDFs via les moments qui s'intéressent à la reconstruction des distributions usuelles, notre approche consiste à traiter un cas réel en couplant la méthode des moments à une reconstruction simultanée. Cela permet de tester la robustesse des techniques de reconstruction, l'effet des erreurs numériques sur la qualité de la reconstruction et le temps de calcul induit par ce couplage.

V.1.2.2 Article 2 : Reconstruction of a distribution from a finite number of its moments : a comparative study in the case of depolymerization process

Cet article regroupe, en première partie, les aspects théoriques relatifs aux techniques de reconstruction, à la méthode des moments pour la résolution du BP et à la dépolymérisation. En deuxième partie, les différents résultats de la reconstruction via les moments analytiques puis via les moments numériques sont discutés. Il est accepté pour publication dans *Computers and Chemical Engineering*.

Reconstruction of a distribution from a finite number of its moments: a comparative study in the case of depolymerization process

Noureddine Lebaz^{a,b,c,d,*}, Arnaud Cockx^{b,c,d}, Mathieu Spérandio^{b,c,d}, Jérôme Morchain^{b,c,d}

^aToulouse White Biotechnology (UMS INRA/INSA/CNRS), 3 rue Ariane, 31520 Ramonville Saint Agne, France

^bUniversité de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077, Toulouse, France

^cINRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, Toulouse, France

^dCNRS, UMR5504, F-31400, Toulouse, France

Abstract

The resolution of the Population Balance Equation (PBE) using moment-based methods offers a high computational efficiency however, information on the time evolution of the probability density function (PDF) is out of reach. For this, several PDF reconstruction methods using a finite number of moments are proposed in the literature. In this contribution, three different methods (i.e. Beta Kernel Density Function based method, Spline based technique and the Maximum Entropy based approach) are tested and compared to the analytical solution of a depolymerization process. The Maximum Entropy method gives the most accurate approximations using only a set of six moments. This method is combined with the Quadrature Method of Moments (QMOM) for a simultaneous reconstruction during the PBE resolution. A three nodes and a four nodes quadrature are tested. The results show that the quality of the reconstruction is highly dependent on the accuracy of the computed moments.

Keywords: Moment problem, population balance, reconstruction methods, maximum entropy

1. Introduction

The recovery of a probability density function (PDF) knowing only a finite number of its moments is known as the finite-moment problem in mathematical analysis and arises in different scientific applications (e.g. physics, chemical engineering, economics) (Gavriliadis & Athanassoulis, 2012; John et al., 2007). This problem is generally declined in three different problem categories for the mono-variate case (Abramov, 2007):

- The *Hausdorff* moment problem: the PDF is supported on the closed interval $[a, b]$
- The *Stieltjes* moment problem: the PDF is supported on $[0, +\infty)$
- The *Hamburger* moment problem: the PDF is supported on the real line $(-\infty, +\infty)$

In chemical engineering, especially for particulate/dispersed systems (e.g. crystallization, polymerization/depolymerization, liquid-liquid extraction, multiphase systems), population balance models (PBM) are

*Corresponding author. Address: INSA, LISBP, 135, avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France. Tel.: +33 56 155 9798; Fax: +33 56 155 9760

Email address: lebaz@insa-toulouse.fr (Noureddine Lebaz)

widely used for the description of the time evolution of the variable-based distribution (e.g. size, volume) undergoing elementary processes. Among these processes, one commonly finds breakage, aggregation/coalescence, nucleation, growth/dissolution ... etc (Ramkrishna & Mahoney, 2002). The resolution of the population balance equation (PBE) is computationally intensive when using classical approaches (e.g. Monte Carlo methods (Lin et al., 2002), discretization methods (Kumar & Ramkrishna, 1996)). This drawback is limiting when population balance modelling is coupled with Computational Fluid Dynamics (CFD) which is the case for multiphase systems. In order to overcome this issue, moment based methods (MOM: Standard Method of Moments (Hulburt & Katz, 1964), QMOM: Quadrature Method of Moments (McGraw, 1997; Marchisio et al., 2003a), DQMOM: Direct Quadrature Method of Moments (Marchisio & Fox, 2005)) have been developed. The problem is reduced to the time-tracking of a finite number of the PDF moments offering by the fact a high computational efficiency. In QMOM the transported moments are calculated by reducing the PDF to an n -point distribution (sum of n weighted Dirac delta functions), the corresponding weights and abscissas are computed using specific algorithms (John & Thein, 2012). In DQMOM, the weights and the abscissas of the initial n -point distribution are directly tracked instead of the moments.

Even though the moment-based methods are computationally efficient, information regarding either the shape or pointwise values of the PDF are identically out of reach. However, this level of knowledge is important for different applications as in the case of evaporation process where one needs to accurately evaluate the PDF at zero size (Massot et al., 2010) or in the enzymatic hydrolysis of particulate substrates where the loss of small solubilized particles produced by the enzymatic attacks has to be taken into account (Lebaz et al., 2015). To address this issue, different numerical techniques have been proposed for the reconstruction of the PDF from its moments reviewed by John et al. (2007), mainly for the Hausdorff moment problem since in chemical engineering applications, the support of the PDF is known in most cases.

From a mathematical point of view, the moment problem has been extensively studied focusing on the conditions of existence of a unique or infinite solution(s) (Shohat & Tamarkin, 1943; Akhiezer, 1965; Dette, 1997). Theoretically, a perfect reconstruction can be obtained using an infinity of PDF moments with an *a priori* restriction of the class of basis functions (John et al., 2007). Numerically, this problem is known as a difficult inverse problem since the finite number of moments define a high ill-posed system of equations (Athanasoulis & Gavriiadis, 2002). Thus, there is no absolute method for reconstructing accurately the PDF from a finite number of its moments. From an experimental point of view the number of moments that can be obtained with a reasonable accuracy is limited.

The most intuitive reconstruction technique is to approximate the target PDF by a sum of elementary distributions (e.g. Gaussian, log-normal) (Lee, 1983; Diemer & Olson, 2002) when an information on the shape of the PDF is available *a priori*. Thus, the problem is reduced to a simple parameter fitting. This technique offers some advantages like the reduced number of moments required for the reconstruction, its simplicity and fastness but the shape of the target PDF has to be stipulated. This constitutes its principal limitation when the initial shape of the PDF changes dramatically during the course of the process. Inspired by this

approach, Athanassoulis & Gavriiadis (2002) proposed a robust technique based on the PDF approximation by a finite superposition of kernel density functions (KDF) for the *Hausdorff* moment problem, tested and validated successfully against both monomodal and bimodal PDFs. This approach has been extended for the *Stieltjes* moment problem using a generalized Gamma function as the kernel density function (Gavriiadis & Athanassoulis, 2012, 2009) but unfortunately it was not confronted to realistic cases.

John et al. (2007) proposed an innovative technique using a piecewise polynomial function without any *a priori* assumption about the shape of the target PDF. Linear, quadratic or cubic splines can be used, their coefficients are computed by solving an ill-conditioned linear system of equations. De Souza et al. (2010) improved the spline-based method by developing an adaptive algorithm in order to optimize the distribution of the grid nodes and capture more accurately the PDF in critical domains. This technique has been coupled recently with a PBE describing aggregation of urea particles (Hackbusch et al., 2012), droplet coalescence (Bordás et al., 2012) and pharmaceutical drying process (granules) (Mortier et al., 2014).

The third class of methods that will be considered in this paper is the Maximum entropy (ME) method which received increasing interest in the last two decades (Mead & Papanicolaou, 1984; Tagliani, 1999, 2001; Biswas & Bhattacharya, 2010). This technique is based on the maximization of the Shannon entropy from information theory, by solving a constraint optimization problem. Abramov (2006) extended it to multi-dimensional problems. Massot et al. (2010) coupled this technique with DQMOM in the case of droplet evaporation process.

In this paper we propose firstly an assessment of these methods in terms of accuracy, rapidity and minimum number of moments required for the reconstruction. The issue concerns the identification of the most efficient method to perform the reconstruction throughout the process (not only for a particular distribution). The performances of the three methods will be evaluated through a comparison of the reconstructed PDFs with an analytical solution of the PBE accounting for a breakage process. Finally, the implementation of the relevant method in the QMOM code for a simultaneous resolution of the PBE and reconstruction of the PDF is investigated. The outlines of this contribution are schematically summerized in figure 1.

2. Reconstruction methods

The purpose of the reconstruction techniques is to recover a function $f(x)$, given its integer moments sequence μ_n defined as:

$$\mu_n = \int x^n f(x) dx, \quad n = 0, 1, \dots \quad (1)$$

We give hereafter a succinct description of the reconstruction techniques used in this contribution. For more detail, one can refer to the original works cited and/or to Appendix A. As common point, the bounded support $[a,b]$ is rescaled to $[0,1]$ for a general formulation.

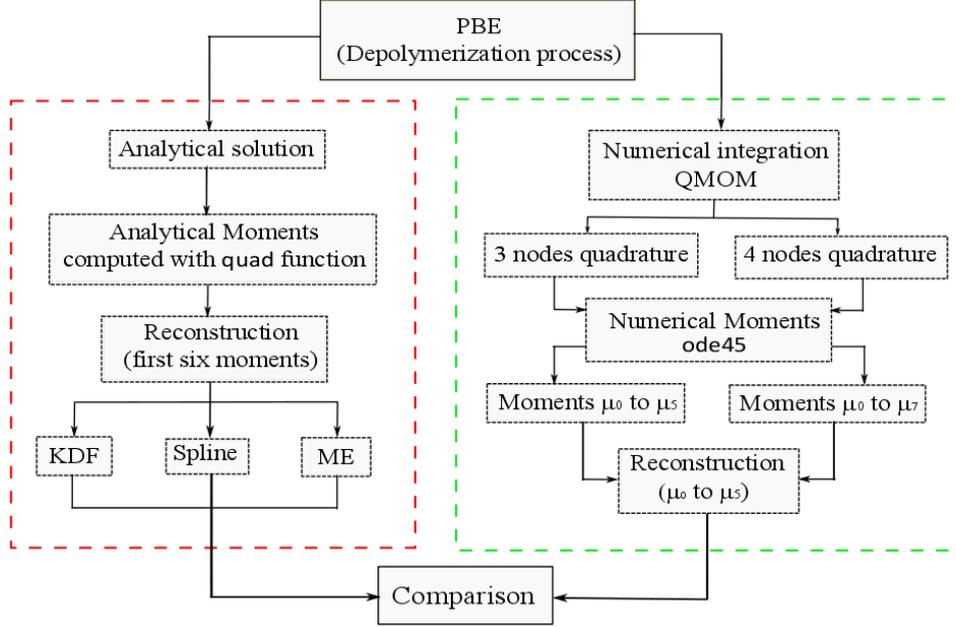


Figure 1: Schematic representation of the organigram of the contribution

2.1. Kernel Density Function-based method

In the KDF based technique, the target PDF is approximated by a sum of weighted kernel density functions (equation 2) (Athanasoulis & Gavriliadis, 2002):

$$f(x) = \sum_{i=1}^I p_i K(x; x_i, h) \quad (2)$$

where $K(x; x_i, h)$ are the KDFs, centered at x_i , with bandwidth h , I is the total number of kernel density functions used for the reconstruction. The coefficients p_i satisfy:

$$p_i \geq 0, \quad i = 1, 2, \dots, I; \quad \sum_{i=1}^I p_i = 1 \quad (3)$$

Since the target PDF is univariate, the KDF is chosen as a Beta Kernel. Thus, the objective is the determination of the optimal coefficients p_i . For this, the finite-moment problem is reformulated as a constrained optimization problem aiming to find the coefficients p_i which minimize the error between the set of initial moments and those estimated via the sum of Beta KDFs. Numerically, Nonnegative Least Square algorithm (NNLS) can be used in this case. Optimization techniques are to be supplemented in order to improve the efficiency of this procedure. The properties of the Beta Kernel Function, the formulation of the constrained optimization problem, the optimization technique based on the shifted moments and the general algorithm

of this method are described in Appendix A.1.

2.2. Spline-based method

This method is extensively described by John et al. (2007). The support of the target PDF $[a, b]$ is subdivided into n subintervals such as $a = x_1 < x_2 < \dots < x_{n+1} = b$. In each subinterval $[x_i, x_{i+1}]$, the target PDF is approximated by a piecewise polynomial $s^{(l)}(x)$ of degree l . The system of equations is detailed for cubic splines ($l = 3$). The unknowns are the four coefficients of the n splines. A smooth transition at the boundaries of the interval is assumed meaning that the PDF, its first and second derivatives are null at the boundaries, this gives 2×3 equations. The continuity of the splines, their first and second derivatives at the nodes provides $3(n - 1)$ equations. The remaining $(n - 3)$ equations are supplemented by the moments. This leads to solve a $4n \times 4n$ ill-conditioned linear system.

Since the set of the known moments limits the number of splines, one has to compute the reconstruction in the optimal support of $f(x)$ thus, the reconstruction is computed iteratively starting from an initial reconstruction $f^{(0)}(x)$ in an initial interval $[x_1^{(0)}, x_{n+1}^{(0)}]$. To ensure the positivity of the reconstructed PDF a tolerance tol_{neg} is introduced. Furthermore, the optimization of the distribution of the nodes improves the efficiency of the method especially for multimodal functions. More details on these techniques are given in Appendix A.2

2.3. Maximum Entropy method

The Maximum Entropy method is based on the maximization of the Shannon entropy $H[f]$ from information theory given by:

$$H[f] = - \int_0^\infty f(x) \ln f(x) dx \quad (4)$$

Under the moments constraints defined by equation 1.

The explicit representation of the ME approximation $f_M(x)$ of the target PDF takes the form:

$$f_M(x) = \exp \left[- \sum_{j=0}^N \xi_j x^j \right] \quad (5)$$

To be supplemented by the $(N + 1)$ constraints:

$$\mu_i = \int_0^\infty x^i f_M(x) dx \quad i = 0, 1, \dots, N \quad (6)$$

The $(N + 1)$ Lagrange's multipliers ξ_0, \dots, ξ_N are obtained through the resolution of the following set of $(N + 1)$ nonlinear equations:

$$\int_0^\infty x^i \exp \left[- \sum_{j=0}^N \xi_j x^j \right] dx = \mu_i \quad i = n, 1, \dots, N \quad (7)$$

Numerically, iterative methods are used to solve equation 7 (Mead & Papanicolaou, 1984). In our case, we use the standard Newton method starting from an initial choice of the Lagrange's multipliers $\xi^{(0)}$ with a given tolerance for stopping the iterative procedure. Commonly used parameters are given in the results section.

3. Population balance modelling (PBM)

The mathematical modelling of polymer chain fragmentation processes (thermal, thermochemical and biological) is a fundamental issue in polymer science and engineering (McCoy & Madras, 2001; Bose & Git, 2004). Population balance modelling (PBM) is the classical approach since it describes the dynamical evolution of the Chain Length Distributions (CLD) (or MWD: Molecular Weight Distributions) during depolymerization reactions (Ziff & McGrady, 1985; Madras & McCoy, 1998).

For a homogeneous system, the time evolution of the CLD undergoing fragmentation processes is described by the population balance equation (PBE) below, written in its continuous form:

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = \int_L^\infty \beta(L, L') \gamma(L') n(L', t) dL' - \gamma(L) n(L, t) \quad (8)$$

where $n(L, t)$ is the length-based number density function (CLD), $\gamma(L)$ the breakage frequency for a chain of length L , $\beta(L, L')$ is the breakage kernel giving the probability of obtaining a chain of length L from the breakup of a chain of length L' . The first term on the RHS accounts for the formation (birth) of chains with length L resulting from the breakage of longer chains L' . The last term is the death term due to the loss of chains of length L because of their breakup.

Except for some cases where analytical solutions exist, equation 8 is solved numerically. Since the resolution of this equation is not the objective of this contribution, an analytical solution is briefly described and used as reference for the moment problem.

3.1. Analytical solution of the PBE accounting for breakage process

Ziff & McGrady (1985) considered linear polymers of length L and gave the analytical solution of the equation 8 with the breakage kernel $\beta = 2/L$ and the breakage frequency $\gamma = \alpha L^2$ (α is a factor of proportionality) which can be regarded as the number of attacks per time unit. Under these considerations, equation 8 can be rewritten as:

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = 2\alpha \int_L^\infty L' n(L', t) dL' - \alpha L^2 n(L, t) \quad (9)$$

The general solution of the equation 9 is given as (Ziff & McGrady, 1985):

$$n(L, t) = e^{-\alpha t L^2} \left(n(L, 0) + 2\alpha t \int_L^\infty L' n(L', 0) dL' \right) \quad (10)$$

where $n(L, 0)$ is the initial CLD.

In order to explicit this solution, we assume that the initial chain length distribution (CLD) follows a normal law (equation 11) with (m, σ) its mean and standard deviation respectively.

$$n(L, 0) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(L-m)^2}{2\sigma^2}} \quad (11)$$

The explicit solution in this specific case is given as (details are given in Appendix B) :

$$n(L, t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\alpha t L^2} \left[(2\alpha t \sigma^2 + 1) e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{L-m}{\sigma} \right)^2} + m\sigma\alpha t \sqrt{2\pi} \left(1 - \operatorname{erf} \left(\frac{1}{\sqrt{2}} \frac{L-m}{\sigma} \right) \right) \right] \quad (12)$$

where *erf* refers to the error function.

Thus, starting with a CLD following a normal law with specific fragmentation process, one can obtain the exact CLD and compute its moments at any given time during the degradation reaction.

3.2. The Monovariate Quadrature Method of Moment (QMOM)

The PBE's resolution using Moment Methods is based on the time tracking of a finite set of the CLD moments instead of the CLD itself. This class of methods is widely used for its low computational cost thus, it can be implemented in CFD codes or extended to multidimensional problems. A succinct description of the well-known Quadrature Method of Moments (QMOM) proposed by McGraw (1997) and validated by Marchisio et al. (2003b) is given in the specific case of breakage processes.

By a moment transformation of equation 8, the transport equation for the k^{th} moment is:

$$\frac{\partial \mu_k(L, t)}{\partial t} = \int_0^\infty L^k \int_0^\infty \gamma(L') \beta(L, L') n(L', t) dL' dL - \int_0^\infty L^k \gamma(L) n(L, t) dL \quad (13)$$

The Quadrature Method of Moments (QMOM) is based on the Gaussian quadrature of the continuous CLD (McGraw, 1997):

$$n(L, t) \approx \sum_{i=1}^M w_i(t) \delta(L - L_i(t)) \quad (14)$$

where M is the number of nodes i , L_i is the property of the node (length), w_i its weight, and δ is the Dirac function. Thus, the k^{th} moment can be expressed as :

$$\mu_k(t) = \int_0^\infty n(L) L^k dL \approx \sum_{i=1}^M w_i(t) L_i^k(t) \quad (15)$$

where weights (w_i) and abscissas (L_i) are determined through the Product-Difference algorithm (Gordon, 1968). By substituting equations 14 and 15 in 13, we obtain (Marchisio et al., 2003b) :

$$\frac{\partial \mu_k}{\partial t} = \sum_{i=1}^M \gamma_i \bar{b}_i^{(k)} w_i - \sum_{i=1}^M L_i \gamma_i w_i \quad (16)$$

with

$$\bar{b}_i^{(k)} = \int_0^\infty L^k \beta(L, L_i) dL \quad (17)$$

Generally, the QMOM requires at least a three nodes quadrature ($M = 3$) for an accurate time-tracking of the moments (Marchisio et al., 2003b).

MATLAB is used under a work-station comprising of an Intel[®] Core[™]i7-3740QM CPU with a clock speed of 2.7 GHz and 16 GB of installed memory (RAM).

4. Results and discussion

The reasons for searching efficient reconstruction techniques when one deal with solving PBM are multiple. First of all, Methods of Moments are rather powerful in terms of numerical performance but since these are integral methods the connection with the physical distribution (Chain Length Distribution or Molecular Weight Distribution) is lost. Moreover, high order moments of an experimental distribution are often hard to evaluate and the direct comparison of numerical and experimental moments remains difficult to analyze. In some cases, the distribution itself is necessary to evaluate some terms in the equations. To finish with, experimental and numerical distributions are not always known over the same range: the range of experimental methods is limited by lower and upper detection bounds. For all these reasons, an accurate reconstruction of a PDF from its moments is an essential tool for those involved in the analysis of experimental results with the help of mathematical models such as PBM solved with a method of moments.

4.1. Reconstruction of the analytical solution

As described before, the three reconstruction methods will be compared to the analytical solution given in section 3-1. We assume that the initial CLD is given by a normal law centered at a Degree of Polymerization (DP) of 60 (the mean number of monomers constituting a given polymer) with a standard deviation (σ) of 7. Equation 12 gives the time evolution of the CLD for ($\beta = 2/L$ and $\gamma = \alpha L^2$). This solution is illustrated in figure 2 with $\alpha = 10^{-3}$ and $t \in [t_i, t_f] = [0, 1]$.

Figure 2 shows a rapid degradation of the long polymers since the breakage frequency is proportional to L^2 , the concentration of the small polymer chains increases all along the depolymerization process.

For sake of clarity, the ability of the different methods to reconstruct the time evolution of the CLD is described separately and illustrated for five different instants: $t_0 = t_i$, $t_1 = \frac{1}{4}t_f$, $t_2 = \frac{1}{2}t_f$, $t_3 = \frac{3}{4}t_f$ and $t_4 = t_f$ before addressing a comparative analysis. At any given instant, the reconstruction is initiated by computing the set of the moments of the analytical CLD given in equation (12). The integrations leading to the associated moments, equation (1), are performed using the Matlab function *quad* with a tolerance set to 10^{-6} . Since the number of the moments required for the reconstruction is critical, the methods are tested with the same set of moments transformed systematically to the normalized interval $[0,1]$ before rescaling the reconstruction result (figure 1).

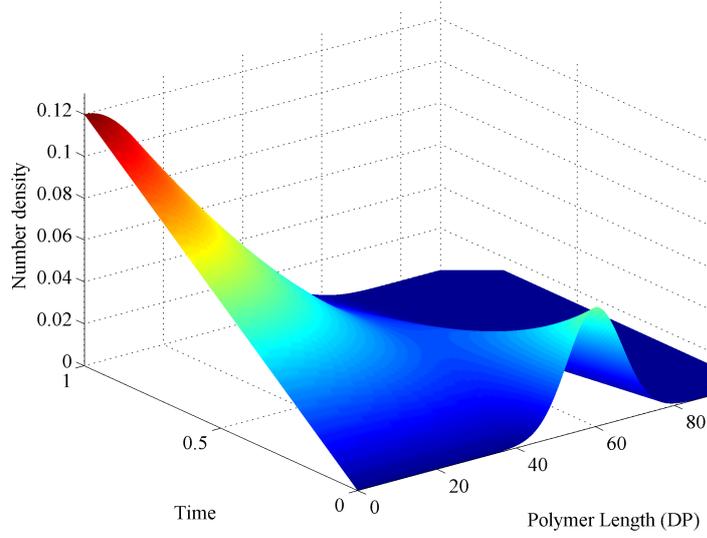


Figure 2: Time evolution of the CLD given by the analytical solution of Ziff & McGrady (1985)

In order to compare the different reconstruction methods, we introduce the mean absolute error between the reconstructed CLD ($f_M(x)$) and the analytical solution used as a reference ($f(x)$):

$$Er(t) = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q |f(x, t) - f_M(x, t)| \quad (18)$$

where q is the length of the discretized support.

4.1.1. Kernel Density Function-based method

The algorithm of this method was implemented in Matlab using the set of moments of each target CLD with their associated shifted moments by setting $\bar{x} = 0.8$ in order to increase the number of the constraints and thus improve the efficiency of this technique. The number of Beta Kernel Density Functions (BKDFs) I is set to 15 thus, the support $[0,1]$ is divided into 15 equal intervals, each BKDF is centered on the midpoint of its corresponding interval. Athanassoulis & Gavriliadis (2002) showed that the optimal bandwidth parameter h varies in the interval $[0.04,0.09]$. In order to identify the optimal values for h , the interval is scanned and the reconstruction is conducted at different parameter values before selecting the most accurate. Once the BKDFs parameters are fixed, the associated Beta PDF parameters are calculated and the coefficients $B_{n,i}$ and $\tilde{B}_{n,i}$ (equations A.3 and A.8) are computed. The constraint minimization problem (equation A.10) is solved using LSQLIN subroutine.

Figure 3 shows the results for the five different instants using the first six moments of each target CLD.

Although the initial CLD is reconstructed with great accuracy most probably because of its simple form, the other CLDs are not recovered. Their singular shape mainly around the origin makes their reconstruction challenging. The reconstructions are oscillating around the target CLDs and take the value zero at the origin.

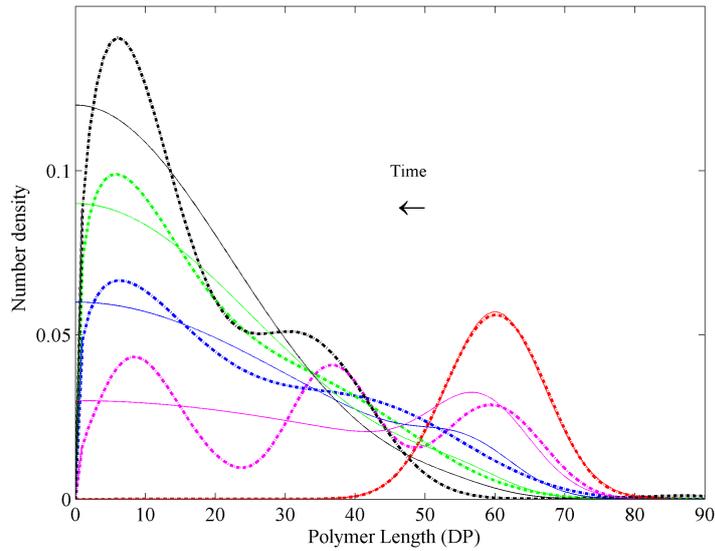


Figure 3: Comparison between the target CLDs (continuous line) and their reconstructions (dashed line) using the BKDF based technique with a sequence of six analytical moments

To be more accurate, this technique requires a large number of constraints which means a higher number of moments. In figure 4, the same problem is treated using the first eleven moments of each target CLD.

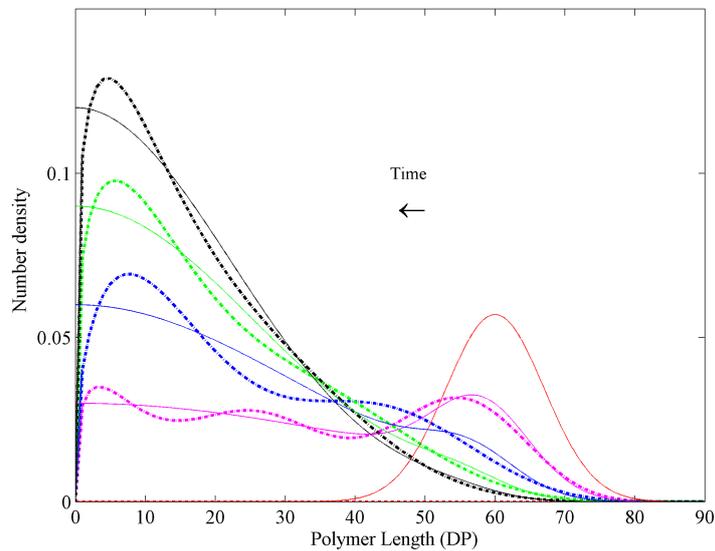


Figure 4: Comparison between the target CLDs (continuous line) and their reconstructions (dashed line) using the BKDF based technique with a sequence of eleven analytical moments

The figure 4 shows that the use of a high number of moments can improve the reconstruction quality

as illustrated in Table 1 where the mean absolute errors (equation 18) are calculated in both cases. But, since the technique is treating a highly ill-posed problem, the solution of the constraint system of equations may diverge. This is for example the case when the reconstruction of the initial CLD using eleven moments is attempted (figure 4). To sum up, this method requires a finetuning of the numerical parameters and an increase in the number of moments does not always guaranties an easier reconstruction. However if the reconstruction is successful, the accuracy increases with the number of moments.

Time	Mean absolute error	
	BKDF: 6 moments	BKDF: 11 moments
t_0	0.0002	/
t_1	0.0061	0.0014
t_2	0.0026	0.0033
t_3	0.0028	0.0024
t_4	0.0068	0.0023

Table 1: Reconstruction accuracy using the BKDF based technique with 6 and 11 moments

4.1.2. Spline-based method

The adaptive algorithm with cubic splines proposed by De Souza et al. (2010) is implemented and used in this contribution. The Matlab script for the original algorithm was freely downloaded from (<http://www.uni-magdeburg.de/isut/LSS>). The default tolerances proposed by the authors (tol_{red} and tol_{sing}) are kept unchanged. This procedure is adopted deliberately because when the reconstruction is conducted simultaneously with the PBE resolution, one has to set the parameters of the algorithm *a priori*. The authors recommended to set tol_{neg} at a very small negative value instead of 0. In our case, $tol_{neg} = -10^{-1}$ is used initially. The results of the reconstruction using the spline based method with six moments are shown in figure 5.

Only the initial CLD has been recovered using the parameters described before. For the other instants, the algorithm has been stopped after 10^3 iterations. The modification of the negative tolerance to $tol_{neg} = -5.10^{-3}$ leads to the convergence of the algorithm for t_1 but the reconstruction is highly oscillating. As mentioned by Mortier et al. (2014), the algorithm is highly sensitive to the negative tolerance leading to different reconstructions for the same target PDF as illustrated in figure 6. This is a main drawback since tol_{neg} may affect the algorithm and even its rate of convergence. In fact, for the example given in figure 6, the convergence is reached after 27 iterations for the case where $tol_{neg} = -10^{-1}$ when the algorithm needs 42 iterations for the second case ($tol_{neg} = -10^{-2}$).

Furthermore, a smooth transition at the boundaries of the reconstruction interval was assumed. This is the case only for the initial distribution thus, one has to change the boundary conditions during the process. This is not reachable without an *a priori* information on the shape of the target PDF.

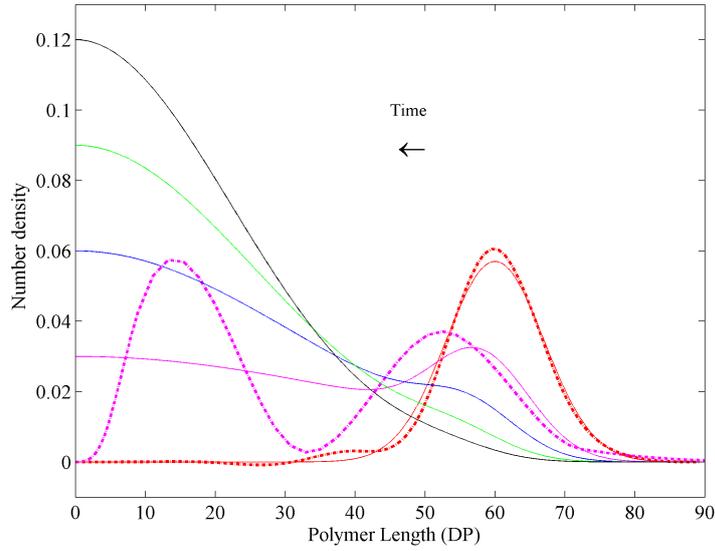


Figure 5: Comparison between the target CLDs (continuous line) and their reconstructions (dashed line) using the spline based technique with a sequence of six analytical moments

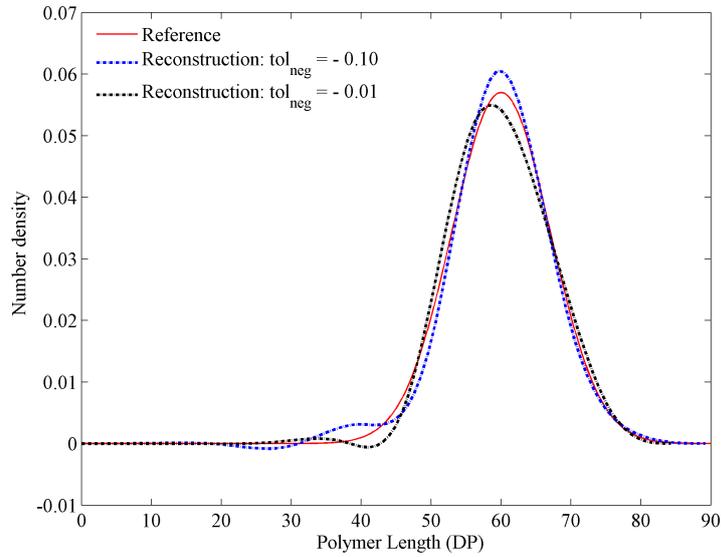


Figure 6: The sensitivity of the spline based method to tol_{neg}

4.1.3. Maximum Entropy based method

The non-linear system in equation 7 is solved using Newton method starting from an initial choice of the Lagrange's multipliers as $\xi^{(0)} = (-\ln(\mu_0)/(x_{max} - x_{min}), 0, \dots, 0)$ with a tolerance of 10^{-6} (Massot et al., 2010). The moments are scaled to $[0,1]$ and normalized before such as $\mu_0 = 1$. The results are given in figure

7.

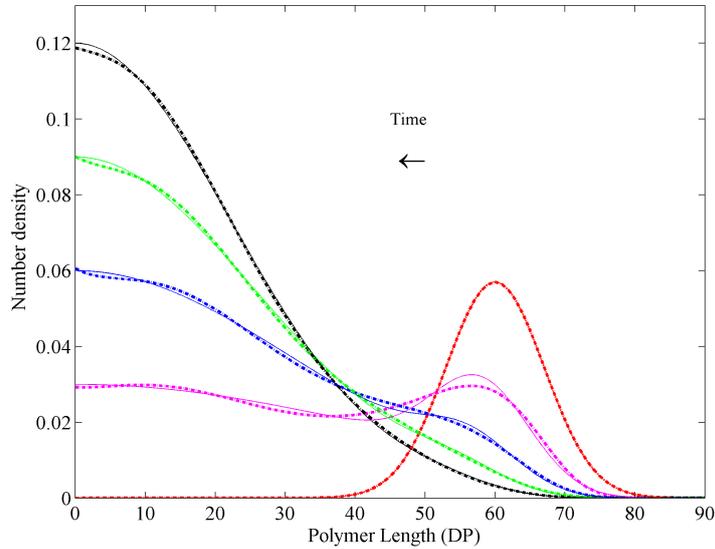


Figure 7: Comparison between the target CLDs (continuous line) and their reconstructions (dashed line) using the ME based technique with a sequence of six analytical moments

Unlike the two previous methods, the Maximum Entropy technique reconstructs the analytical CLDs with high accuracy even when they are singular using only the first six moments. The Newton method used in this case converges in a few iterations (< 10) making the coupling of the PBE resolution with the PDF reconstruction possible. In addition, except for the tolerance of the Newton method, there is no additional parameter to set which simplifies its use.

Time	BKDF based method		Spline based method		ME based method	
	Error	Cost (s)	Error	Cost (s)	Error	Cost (s)
t_0	0.0002	6.48	0.0011	6.48	0.0000	0.27
t_1	0.0061	6.47	0.0105	5.86	0.0008	0.26
t_2	0.0026	6.39	/	/	0.0005	0.23
t_3	0.0028	6.31	/	/	0.0004	0.20
t_4	0.0068	6.30	/	/	0.0004	0.20

Table 2: Comparison of the three different reconstruction methods (using the first six analytical moments) in terms of mean absolute error and computational cost

Table 2 gives the comparison between the three methods according to the quality of the reconstructed CLDs (mean absolute error) and the computational cost using the first six moments. The ME method gives

the best results for this case of study not only for the reconstruction efficiency but also for the number of moments required and the computational cost among other criterions as resumed in Table 3. For these reasons, this method is selected to be implemented in the QMOM code for coupling the PBE resolution in the case of depolymerization process with the CLD reconstruction.

Criterion	Beta KDF method	Spline-based method	ME based method
Principle	Approximation via a sum of kernel density functions	Approximation via connected peicewise polynomials	Approximation based on the maximization of Shannon entropy
Target PSD	No <i>a priori</i> information on its shape	No <i>a priori</i> information on its shape	No <i>a priori</i> information on its shape
Number of moments	> 10 to be accurate	Related to the number of intervals	Six or more
Computational cost	Acceptable	Acceptable when it converges	Very low
Robustness	The convergence is not guaranteed in all cases	The convergence is highly dependent on the parameters of the method	The convergence is guaranteed in most cases
Accuracy of the reconstruction	Depends on the number of moments, acceptable for simple shapes and oscillates for complex shapes	Highly oscillating results even for simple shapes, depends on the parameters of the method	Good occuracy even with just six moments, not affected by the parameters initialisation

Table 3: General comparison between the three different reconstruction methods

4.2. QMOM coupled with ME based method

The main objective of the development of reconstruction methods from a finite set of moments, especially in the chemical engineering field, is to have access to the shape of the PSD and/or some relevant pointwise values during the process evolution. This kind of information is necessary when some aspects of the problem cannot be expressed from the moments only. This offers a valuable addition when the PBE is solved using moment methods coupling by the fact the computational efficiency of such methods with a simultaneous information on the PDF shape.

In this section, the ME based method tested successfully against an analytical solution giving the time evolution of the CLD undergoing breakage process is implemented in the QMOM code resolving the same breakage problem. Thus, on the one hand, the analytical CLDs are available for comparison, on the other

hand, the PBE accounting for the same breakage process is solved using QMOM giving the time evolution of the moments which are used for the reconstruction (see figure 1) .

For this numerical approach, a three nodes quadrature is used ($M=3$), the abscissas (L_i) and the weights (w_i) are computed using the Product-Difference algorithm (Gordon, 1968). The system of ordinary differential equations (equation 16) is integrated using *ode45* with a tolerance fixed to 10^{-6} . First, the QMOM implementation is validated by confronting the computed moments against those predicted by the analytical solution.

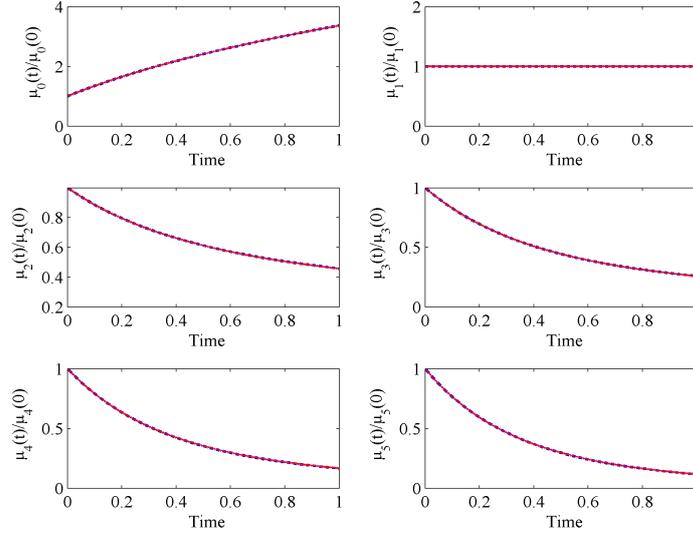


Figure 8: The time evolution of the six first moments: comparison between the analytical solution (continuous line) and QMOM with three nodes (dashed lines)

The results for the six first moments are given in figure 8. The two different methods lead to the same time evolution of the moments thus, the QMOM implementation is validated.

Since a three nodes quadrature is used, six moments are tracked. This set of moments is used as input for the ME based method. The reconstruction is conducted simultaneously with the PBE resolution. The result at different process time is shown in figure 9.

The reconstructions based on the numerical moments computed via QMOM (figure 9) are less accurate than those obtained previously with the exact analytical moments (figure 7). Note that the same number of moments is used in the two cases. This can only comes from the numerical error introduced by QMOM. In order to improve the accuracy of the method, one can increase the number of the quadrature nodes. For quantifying the gain in terms of accuracy, we introduce the global error function below:

$$E(k) = \frac{|\mu_k - \mu_k^*|}{\mu_k^*} \quad (19)$$

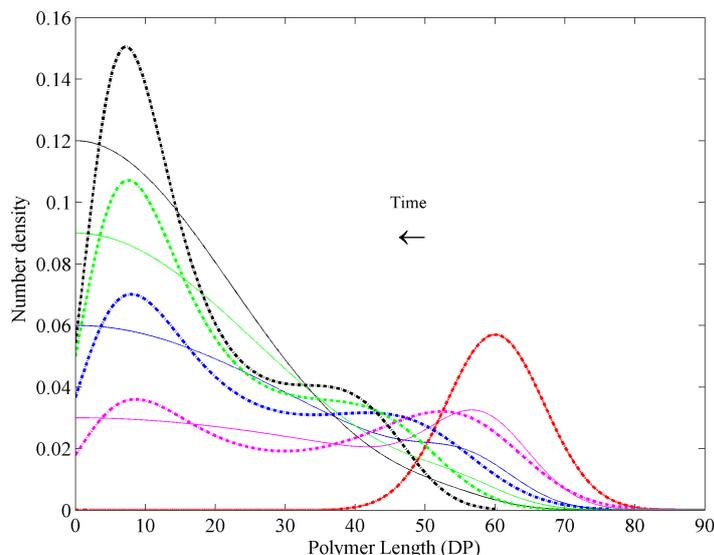


Figure 9: Comparison between the target CLDs (continuous line) and their reconstructions (dashed line) using the ME based technique with a sequence of six moments computed via QMOM with a three nodes quadrature

where μ_k is the k^{th} order moment estimated via QMOM and μ_k^* the exact k^{th} order moment calculated via the analytical solution.

We give in figure 10 the error $E(k)$ induced by QMOM for both a three and four nodes quadrature for the six first moments. Note that the use of a four nodes quadrature implies a time tracking of the first eight moments of the CLD.

The use of a four nodes quadrature in QMOM improves the accuracy of the computed moments, which constitutes a trivial and expected result. Note however that the use of a higher number of nodes induces supplementary moments meaning more equations in the system (equation 16) and may lead to near-singular matrix limiting the efficiency of PD algorithm.

Now, if the first six moments computed using a four nodes quadrature are used for the reconstruction, the result is completely different as shown in figure 11 and in Table 4.

Improving the accuracy of the tracked moments has considerably improved the reconstruction quality without reaching the same performance as with the analytical solution (figure 7). This shows that, if the ME based method is coupled with QMOM, one has to compute the moments with a high accuracy. For the reconstruction purpose, it is wise to track some additional moments in order to improve the accuracy of the set of moments that will be used.

To avoid the use of the PD algorithm for computing the weights (w_i) and the abscissas (L_i) all along the process which may introduce a subsequent error for the computed moments, the Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM) presents an alternative (Marchisio & Fox, 2005). In this method, the PD algorithm is only called once, for initializing the quadrature nodes.

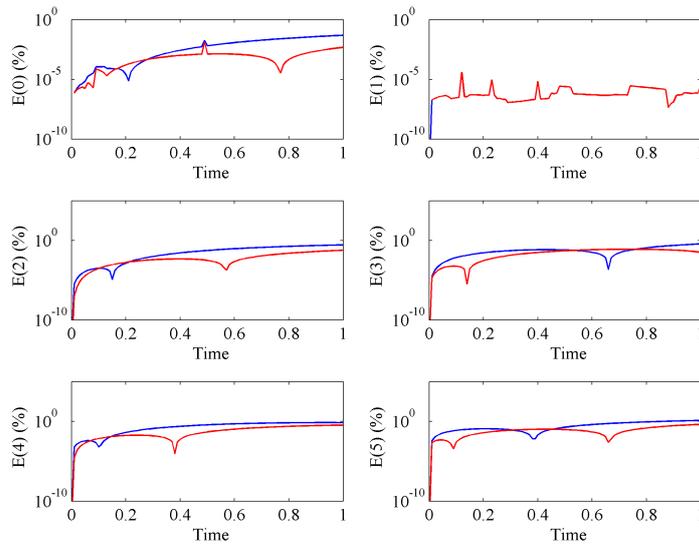


Figure 10: Comparison of the error induced by QMOM for the six first moments when using a three nodes quadrature (blue line) and a four nodes quadrature (red line)

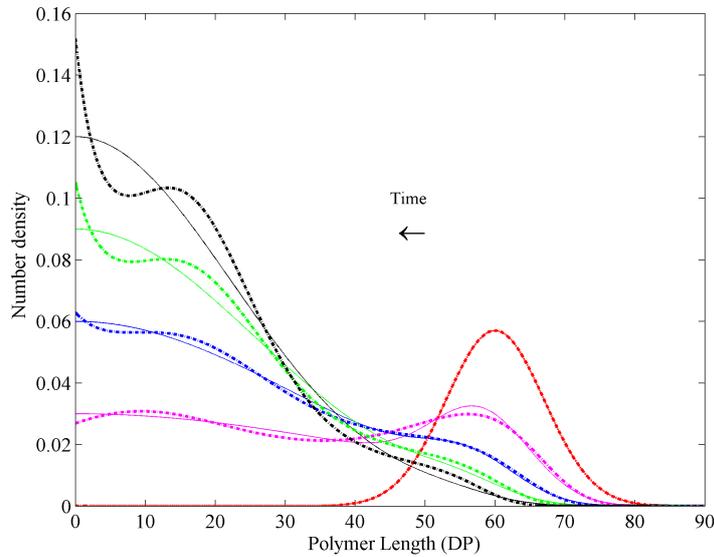


Figure 11: Comparison between the target CLDs (continuous line) and their reconstructions (dashed line) using the ME based technique with a sequence of six moments computed via QMOM with a four nodes quadrature

This method has been investigated and comparative results as with QMOM are obtained. The error on computing the initial (L_i, w_i) is transported throughout the process time. In addition, it has been shown that more accurate and robust algorithms can be used instead of the PD algorithm for computing the nodes (John & Thein, 2012). The use of the Wheeler algorithm (called also LQMDA for Long Quotient-Modified

Time	Mean absolute error	
	QMOM-ME: M=3	QMOM-ME: M=4
t_0	0.0000	0.0000
t_1	0.0027	0.0010
t_2	0.0037	0.0007
t_3	0.0054	0.0019
t_4	0.0080	0.0031

Table 4: Reconstruction accuracy using the ME based technique with six moments: comparison between the use of the moments computed with a three nodes quadrature and those obtained with a four nodes quadrature

Difference Algorithm or Chebyshev algorithm) (Wheeler, 1974), recommended for computing optimal weights and abscissas (Yuan et al., 2012; John & Thein, 2012), leads to the same results as those shown before. So in the case studied here, combining DQMOM with the Wheeler algorithm does not seem to improve the accuracy of the reconstruction. The advantage of this algorithm is to avoid the limitation of the PD algorithm when near-singular matrix arise.

5. Conclusion

The reconstruction of a full PDF knowing only a finite/small number of its moments is of critical importance especially for particulate systems where information on the PDF shape is needed for process follow-up. Different reconstruction methods are available in literature but none of them is able to recover all the possible PDF shapes perfectly.

In this contribution, three different methods are investigated and their results confronted firstly against an analytical solution in the specific case of depolymerization process. The BKDF based method approximates the target PDFs by a finite sum of elementary Beta Kernel Density Functions and gives relative accurate results but requires a high number of moments for complex PDF shapes. The spline based method is highly dependent on the tolerance parameters. Finetuning of these parameters affects the rate of convergence of the algorithm and the final reconstructed PDF and depends on each single target PDF. Furthermore, the transition at the boundaries of the reconstruction interval has to be assumed which is not reachable when no information about the shape of the target PDF is available. As consequence, this method is not adapted for process monitoring when the distribution is needed at different time steps. The ME based method gives the best results and reconstructs the analytical target PDFs with high accuracy using only a set of six moments. The method converges within a few iterations which makes it relevant to be coupled with the PBE resolution methods. This has been investigated in the second part.

Once the Quadrature Method of Moments accounting for breakage processes is validated against the analytical solution, the computed moments are used as inputs for the reconstruction method. The results

show that the ME based technique is highly dependent on the moments accuracy. When a three nodes quadrature is used for tracking the abscissas and the weights via the PD algorithm, the sets of associated moments lead to unsatisfactory reconstructions. Increasing the number of nodes improves significantly the moments accuracy and by the way the quality of the reconstruction. No doubt that the issue is common to all reconstruction methods: accurate values of the moments are required.

In summary, the ME based method is preferred than the BKDF and spline based methods because it requires a smaller number of moments and offers the best computational cost/reconstruction accuracy. The cases where a frequent reconstruction is needed along with the PBE resolution, the moments have to be computed accurately to achieve a good reconstruction quality using the ME based method. This is the main drawback when dealing with experimental moments. Further confrontation especially when different processes are coupled (e.g. breakage, aggregation, growth) is needed for assessing the relevance of this method.

Aknowledgments

The authors would like to thank *Toulouse White Biotechnology* and *Région Midi-Pyrénées* for their financial support.

Appendix A: Description of the reconstruction techniques

Appendix A.1: Kernel Density Function-based method

The Beta PDF is given, in its normalized form with κ and λ as parameters, by:

$$g(x; \kappa, \lambda) = \frac{\Gamma(\kappa + \lambda)}{\Gamma(\kappa)\Gamma(\lambda)} x^{\kappa-1} (1-x)^{\lambda-1}, \quad \kappa, \lambda > 0 \quad (\text{A.1})$$

where Γ is the *Gamma* function. The Beta kernel is then defined by :

$$K(x; x_*, h) = g(x; \kappa, \lambda) \quad (\text{A.2})$$

The Beta KDF parameters (x_* and h) are related to the Beta PDF parameters (κ and λ) (see Appendix A (Athanasoulis & Gavriiadis, 2002)).

The moments of the Beta kernel can be analytically calculated thanks to the equation A.3 :

$$B_n(x_*) = B_n(\kappa, \lambda) = \int_0^1 x^n g(x; \kappa, \lambda) dx = \frac{\Gamma(\kappa + \lambda)\Gamma(\kappa + n)}{\Gamma(\kappa)\Gamma(\kappa + \lambda + n)} \quad (\text{A.3})$$

By substituting equation A.3 in 2, one obtains the moments μ_n^* of the reconstructed distribution :

$$\mu_n^* = \sum_{i=1}^I B_{n,i} p_i, \quad n = 0, 1, \dots, N_1 \quad (\text{A.4})$$

For determining the unknown coefficients p_i , the finite-moment problem is reformulated as a constrained optimization problem (equation A.5):

$$\|\mu_n - \mu_n^*\|_{L^2} = \min, \quad \left(p_i \geq 0, \sum_{i=1}^I p_i = 1 \right) \quad (\text{A.5})$$

Equation A.5 can be solved numerically using a Nonnegative Least Square algorithm (NNLS). For improving the efficiency of this method and reducing the number of moments required for the reconstruction, different optimization techniques are available in literature such as the use, in addition of the given moments, of the shifted moments as described in the original work by (Gavriliadis & Athanassoulis, 2003).

The shifted moments of $f(x)$ are defined by:

$$\tilde{\mu}_n = \int_0^1 (x - \bar{x})^k f(x) dx, \quad n = 1, 2 \dots N_2 \leq N_1, \quad \bar{x} \in [0, 1] \quad (\text{A.6})$$

Since, in the finite-moment problem, $f(x)$ is the target, the shifted moments $\tilde{\mu}_n$ are derived from the integer moments μ_n as follows:

$$\tilde{\mu}_n = \sum_{k=0}^n (-1)^k \binom{n}{k} \bar{x}^k \mu_{n-k}, \quad n = 1, 2 \dots N_1 \leq N \quad (\text{A.7})$$

The shifted moments of the Beta KDF are calculated by:

$$\tilde{B}_n = \int_0^1 (x - \bar{x})^n K(x; x_i, h) dx \quad (\text{A.8})$$

Thus, the shifted moments $\tilde{\mu}_n^*$ of the reconstructed PDF are expressed as:

$$\tilde{\mu}_n^* = \sum_{i=0}^I \tilde{B}_{ni} p_i, \quad n = 1, 2 \dots N_1 \leq N \quad (\text{A.9})$$

The minimization problem (equation A.5) is reformulated as :

$$\left\| \begin{pmatrix} \mu_n \\ \tilde{\mu}_n \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} B_n \\ \tilde{B}_n \end{pmatrix} p_I \right\|_{L^2} = \min, \quad \left(p_i \geq 0, \sum_{i=1}^I p_i = 1 \right) \quad (\text{A.10})$$

This new constraint minimization problem is numerically solved using NNLS or LSQLIN (Matlab sub-routines).

The algorithm of this method can be reduced to the following steps:

1. Define the reconstruction interval $[a, b]$
2. Transform the moments to the normalized interval $[0, 1]$
3. Compute the shifted moments from the set of integer moments
4. Fix the number I of KDFs and the bandwidth parameter h
5. Compute the coefficients $B_{n,i}$ and $\tilde{B}_{n,i}$
6. Determine p_i by solving the constraint minimization problem (equation A.10)

Appendix A.2: Spline-based method

In order to optimize the reconstruction support and thus increase the accuracy of the spline-based method, the values of the reconstructed PDF $f^{(k)}(x)$ are checked at the boundaries of the support $[x_1^{(k)}, x_{n+1}^{(k)}]$ (i.e. in the subintervals $[x_1^{(k)}, x_2^{(k)}]$ and $[x_n^{(k)}, x_{n+1}^{(k)}]$). For this, these two subintervals are divided into 10 equidistant small subintervals, the values of $f^{(k)}(x)$ at the nodes of these small subintervals are checked if they are sufficiently small against the maximal value of $f^{(k)}$ in order to reduce eventually the size of the reconstruction support. This test is given for the right boundary as (John et al., 2007):

$$\left(\sum_{j=1}^{10} \left[\left(f^{(k)}(x_{nj}) \right)^2 \right] + \left(f^{(k)}(x_{n+1}^{(k)}) \right)^2 \right)^{1/2} \leq tol_{red} f_{max}^{(k)} \quad (\text{A.11})$$

If equation A.11 is satisfied, the reconstruction support is reduced by setting $x_{n+1}^{(k+1)} = (x_n^{(k)} + x_{n+1}^{(k)})/2$, otherwise the boundary remains unchanged. For the new interval $[x_1^{(k+1)}, x_{n+1}^{(k+1)}]$, the nodes are redistributed equidistantly.

It is further checked that any value of $f^{(k)}(x)$ at the nodes $x_i (i = 1, \dots, n + 1)$ and at the midpoints of the subintervals are greater than a given tolerance tol_{neg} (equation A.12). This test is implemented to ensure the positivity of the PDFs.

$$f_{min,max} := \min_{j=1,\dots,k} f_{max}^{(j)}, \quad \frac{f^{(j)}(x_i)}{f_{min,max}} \geq tol_{neg}, \quad \frac{f^{(j)}(x_{i6})}{f_{min,max}} \geq tol_{neg} \quad (\text{A.12})$$

with $tol_{neg} \leq 0$. The problem of the ill-conditioning of the linear system of equations is treated by regulizing the system. This is achieved by neglecting small singular values according to a given tolerance tol_{sing} using a pseudo inverse routine of Matlab.

Note that in John et al. (2007), an equidistant grid is used for the distribution of the nodes x_i . This is not adapted for non-smooth and/or multimodal distributions. In the adaptive algorithm by (De Souza et al., 2010), this problem is solved by introducing a non-equidistant grid where the nodes are repositionned appropriately in order to capture accurately the PDF's critical domains.

This method is extensively described by John et al. (2007). The support of the target PDF $[a, b]$ is subdivided into n subintervals such as $a = x_1 < x_2 < \dots < x_{n+1} = b$. In each subinterval $[x_i, x_{i+1}]$, the target PDF is approximated by a piecewise polynomial $s^{(l)}(x)$ of degree l . The system of equations is detailed for cubic splines ($l = 3$). The unknowns are the four coefficients of the n splines. A smooth transition at the boundaries of the interval is assumed meaning that the PDF, its first and second derivatives are null at the boundaries, this gives 2×3 equations. The continuity of the splines, their first and second derivatives at the nodes provides $3(n - 1)$ equations. The remaining $(n - 3)$ equations are supplemented by the moments. This leads to solve a $4n \times 4n$ ill-conditioned linear system.

Since the set of the known moments limits the number of splines, one has to compute the reconstruction in the optimal support of $f(x)$ thus, the reconstruction is computed iteratively starting from an initial reconstruction $f^{(0)}(x)$ in an initial interval $[x_1^{(0)}, x_{n+1}^{(0)}]$.

In order to optimize the reconstruction support and thus increase the accuracy of the method, the values of the reconstructed PDF $f^{(k)}(x)$ are checked at the boundaries of the support $[x_1^{(k)}, x_{n+1}^{(k)}]$ (i.e. in the subintervals $[x_1^{(k)}, x_2^{(k)}]$ and $[x_n^{(k)}, x_{n+1}^{(k)}]$). For this, these two subintervals are divided into 10 equidistant small subintervals, the values of $f^{(k)}(x)$ at the nodes of these small subintervals are checked if they are sufficiently small against the maximal value of $f^{(k)}$ in order to reduce eventually the size of the reconstruction support. This test is given for the right boundary as (John et al., 2007):

$$\left(\sum_{j=1}^{10} \left[\left(f^{(k)}(x_{nj}) \right)^2 \right] + \left(f^{(k)}(x_{n+1}^{(k)}) \right)^2 \right)^{1/2} \leq tol_{red} f_{max}^{(k)} \quad (\text{A.13})$$

If equation A.13 is satisfied, the reconstruction support is reduced by setting $x_{n+1}^{(k+1)} = (x_n^{(k)} + x_{n+1}^{(k)})/2$, otherwise the boundary remains unchanged. For the new interval $[x_1^{(k+1)}, x_{n+1}^{(k+1)}]$, the nodes are redistributed equidistantly.

It is further checked that any value of $f^{(k)}(x)$ at the nodes $x_i (i = 1, \dots, n+1)$ and at the midpoints of the subintervals are greater than a given tolerance tol_{neg} (equation A.14). This test is implemented to ensure the positivity of the PDFs.

$$f_{min,max} := \min_{j=1,\dots,k} f_{max}^{(j)}, \quad \frac{f^{(j)}(x_i)}{f_{min,max}} \geq tol_{neg}, \quad \frac{f^{(j)}(x_{i6})}{f_{min,max}} \geq tol_{neg} \quad (\text{A.14})$$

with $tol_{neg} \leq 0$. The problem of the ill-conditioning of the linear system of equations is treated by regularizing the system. This is achieved by neglecting small singular values according to a given tolerance tol_{sing} using a pseudo inverse routine of Matlab.

Note that in John et al. (2007), an equidistant grid is used for the distribution of the nodes x_i . This is not adapted for non-smooth and/or multimodal distributions. In the adaptive algorithm by (De Souza et al., 2010), this problem is solved by introducing a non-equidistant grid where the nodes are repositionned appropriately in order to capture accurately the PDF's critical domains.

Appendix B: Analytical solution of the PBE in the case of breakage process

We give in this appendix the details for the analytical solution in its explicit form (equation 12).

By substituting equation 11 in 10, we obtain :

$$n(L, t) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-tL^2} \left(e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{L-\mu}{\sigma}\right)^2} + 2t \int_L^\infty L' e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{L'-\mu}{\sigma}\right)^2} dL' \right) \quad (\text{B.1})$$

We note I the integral term and proceed to the change of variable :

$$L' - \mu = \hat{L}' \mapsto L' = \hat{L}' + \mu \mapsto dL' = d\hat{L}' \quad (\text{B.2})$$

The integral term is written as:

$$I = \int \hat{L}' e^{-\frac{1}{2\sigma^2} \hat{L}'^2} d\hat{L}' + \mu \int e^{-\frac{1}{2\sigma^2} \hat{L}'^2} d\hat{L}' \quad (\text{B.3})$$

Recall that :

$$\int e^{-ax^2} dx = \frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{a}} \operatorname{erf}(x\sqrt{a}) \quad (\text{B.4})$$

and

$$\int x e^{-ax^2} dx = -\frac{1}{2a} e^{-ax^2} \quad (\text{B.5})$$

Thus :

$$I = \sigma^2 e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{L-\mu}{\sigma}\right)^2} + \mu\sigma\sqrt{\frac{\pi}{2}} \left(1 - \operatorname{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}}\frac{L-\mu}{\sigma}\right)\right) \quad (\text{B.6})$$

By substituting equation B.6 in B.1, we obtain the final explicit solution given in equation 12.

Nomenclature

a, b	Lower and upper bounds of the reconstruction interval
B_n, \tilde{B}_n	Coefficients of the BKDF system of equations
$E(k)$	Global error function
$E_r(t)$	Mean absolute error for the reconstruction
$f(x)$	Probability Density Function
$f_M(x)$	The reconstructed Probability Density function
$g(x, \kappa, \lambda)$	Beta Probability Density Function
h	Bandwidth of the BKDF
$H[f]$	Shannon entropy
I	Number of BKDFs used for the reconstruction
k, n	moment's order
$K(x, x_*, h)$	Beta kernel density function
L, L'	Polymer chains length
L_i	Abscissae of the Gaussian quadrature
m	Mean of the normal law
M	Number of nodes of the Gaussian quadrature
$n(L, t)$	Length based number density function
N	Length of the set of moments
p_i	Weight coefficient, $\in [0, 1]$
q	Length of the discretized interval of reconstruction
t, t_i, t_f	Time, initial time, final time
w_i	Weights of the Gaussian quadrature
x	Variable of the PDF
\bar{x}	Parameter of the shifted moments, $\in [0, 1]$
x_*, x_i	Centers of the BKDFs

Greek Symbols

α	Factor of proportionality for the breakage frequency
β	Breakage kernel
γ	Breakage frequency
Γ	Gamma function
κ, λ	Parameters of the Beta Probability Density Function
μ	The set of moments
σ	Standard deviation for the normal law
ξ	Lagrange's multipliers

Abbreviations

BKDF	Beta Kernel Density Function
CFD	Computational Fluid Dynamics
CLD	Chain Length Distribution
DP	Degree of Polymerization
DQMOM	Direct Quadrature Method of Moments
KDF	Kernel Density Function
LQDMA	Long Quotient-Modified Difference Algorithm
LSQLIN	Constrained Linear Least Square
ME	Maximum Entropy
MWD	Molecular Weight Distribution
NNLS	Non-Negative Least Square
PBE	Population Balance Equation
PBM	Polupation Balance Modelling
PD	Product Difference Algorithm
PDF	Probability Density Function
QMOM	Quadrature Method of Moments

References

- Abramov, R. (2006). A practical computational framework for the multidimensional moment-constrained maximum entropy principle. *Journal of Computational Physics*, *211*, 198–209. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021999105002688>. doi:10.1016/j.jcp.2005.05.008.
- Abramov, R. V. (2007). An improved algorithm for the multidimensional moment-constrained maximum entropy problem. *Journal of Computational Physics*, *226*, 621–644. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021999107001994>.
- Akhiezer, N. I. (1965). *The Classical Moment Problem: N.I. Akhiezer*. Oliver & Boyd.
- Athanassoulis, G. A., & Gavriiladis, P. N. (2002). The truncated Hausdorff moment problem solved by using kernel density functions. *Probabilistic Engineering Mechanics*, *17*, 273–291. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266892002000127>.
- Biswas, P., & Bhattacharya, A. K. (2010). Function reconstruction as a classical moment problem: a maximum entropy approach. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, *43*, 405003. URL: <http://iopscience.iop.org/1751-8121/43/40/405003>. doi:10.1088/1751-8113/43/40/405003.
- Bordás, R., John, V., Schmeyer, E., & Thévenin, D. (2012). Numerical methods for the simulation of a coalescence-driven droplet size distribution. *Theoretical and Computational Fluid Dynamics*,

27, 253–271. URL: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00162-012-0275-9>. doi:10.1007/s00162-012-0275-9.

Bose, S. M., & Git, Y. (2004). Mathematical modelling and computer simulation of linear polymer degradation: Simple scissions. *Macromolecular theory and simulations*, 13, 453–473. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mats.200300036/full>.

De Souza, L. G. M., Janiga, G., John, V., & Thévenin, D. (2010). Reconstruction of a distribution from a finite number of moments with an adaptive spline-based algorithm. *Chemical Engineering Science*, 65, 2741–2750. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250910000163>.

Detle, H. (1997). *The Theory of Canonical Moments with Applications in Statistics, Probability, and Analysis*. John Wiley & Sons.

Diemer, R. B., & Olson, J. H. (2002). A moment methodology for coagulation and breakage problems: Part 2moment models and distribution reconstruction. *Chemical Engineering Science*, 57, 2211–2228. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250902001124>.

Gavriliadis, P. N., & Athanassoulis, G. A. (2003). Moment data can be analytically completed. *Probabilistic Engineering Mechanics*, 18, 329–338. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266892003000468>. doi:10.1016/j.probengmech.2003.07.001.

Gavriliadis, P. N., & Athanassoulis, G. A. (2009). Moment information for probability distributions, without solving the moment problem, II: Main-mass, tails and shape approximation. *Journal of computational and applied mathematics*, 229, 7–15. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037704270800513X>.

Gavriliadis, P. N., & Athanassoulis, G. A. (2012). The truncated Stieltjes moment problem solved by using kernel density functions. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 236, 4193–4213. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377042712002257>.

Gordon, R. G. (1968). Error Bounds in Equilibrium Statistical Mechanics. *Journal of Mathematical Physics*, 9, 655–663. URL: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jmp/9/5/10.1063/1.1664624>. doi:10.1063/1.1664624.

Hackbusch, W., John, V., Khachatryan, A., & Suci, C. (2012). A numerical method for the simulation of an aggregation-driven population balance system. *International Journal for Numerical Methods in Fluids*, 69, 1646–1660. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/flid.2656/abstract>. doi:10.1002/flid.2656.

Hulburt, H. M., & Katz, S. (1964). Some problems in particle technology: A statistical mechanical formulation. *Chemical Engineering Science*, 19, 555–574. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009250964850478>.

- John, V., Angelov, I., Öncül, A. A., & Thévenin, D. (2007). Techniques for the reconstruction of a distribution from a finite number of its moments. *Chemical Engineering Science*, *62*, 2890–2904. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250907002072>.
- John, V., & Thein, F. (2012). On the efficiency and robustness of the core routine of the quadrature method of moments (QMOM). *Chemical Engineering Science*, *75*, 327–333. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000925091200187X>. doi:10.1016/j.ces.2012.03.024.
- Kumar, S., & Ramkrishna, D. (1996). On the solution of population balance equations by discretization I. A fixed pivot technique. *Chemical Engineering Science*, *51*, 1311–1332. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009250996884892>. doi:10.1016/0009-2509(96)88489-2.
- Lebaz, N., Cockx, A., Spérandio, M., & Morchain, J. (2015). Population balance approach for the modelling of enzymatic hydrolysis of cellulose. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *93*, 276–284. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cjce.22088/abstract>. doi:10.1002/cjce.22088.
- Lee, K. W. (1983). Change of particle size distribution during Brownian coagulation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *92*, 315–325. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021979783901534>.
- Lin, Y., Lee, K., & Matsoukas, T. (2002). Solution of the population balance equation using constant-number Monte Carlo. *Chemical Engineering Science*, *57*, 2241–2252. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250902001148>. doi:10.1016/S0009-2509(02)00114-8.
- Madras, G., & McCoy, B. J. (1998). Time evolution to similarity solutions for polymer degradation. *AIChE Journal*, *44*, 647–655. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.690440313/abstract>. doi:10.1002/aic.690440313.
- Marchisio, D. L., & Fox, R. O. (2005). Solution of population balance equations using the direct quadrature method of moments. *Journal of Aerosol Science*, *36*, 43–73. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850204003052>.
- Marchisio, D. L., Piktorna, J. T., Fox, R. O., Vigil, R. D., & Barresi, A. A. (2003a). Quadrature method of moments for population-balance equations. *AIChE Journal*, *49*, 1266–1276. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.690490517/abstract>.
- Marchisio, D. L., Vigil, R. D., & Fox, R. O. (2003b). Quadrature method of moments for aggregation-breakage processes. *Journal of Colloid and Interface Science*, *258*, 322–334. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979702000541>.
- Massot, M., Laurent, F., Kah, D., & De Chaisemartin, S. (2010). A robust moment method for evaluation of the disappearance rate of evaporating sprays. *SIAM Journal on Applied Mathematics*, *70*, 3203–3234. URL: <http://epubs.siam.org/doi/abs/10.1137/080740027>.

- McCoy, B. J., & Madras, G. (2001). Discrete and continuous models for polymerization and depolymerization. *Chemical Engineering Science*, *56*, 2831–2836. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250900005169>. doi:10.1016/S0009-2509(00)00516-9.
- McGraw, R. (1997). Description of Aerosol Dynamics by the Quadrature Method of Moments. *Aerosol Science and Technology*, *27*, 255–265. URL: <http://dx.doi.org/10.1080/02786829708965471>. doi:10.1080/02786829708965471.
- Mead, L. R., & Papanicolaou, N. (1984). Maximum entropy in the problem of moments. *Journal of Mathematical Physics*, *25*, 2404–2417. URL: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jmp/25/8/10.1063/1.526446>.
- Mortier, S. T. F., De Beer, T., Gernaey, K. V., & Nopens, I. (2014). Comparison of techniques for reconstruction of a distribution from moments in the context of a pharmaceutical drying process. *Computers & Chemical Engineering*, *65*, 1–8. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135414000404>.
- Ramkrishna, D., & Mahoney, A. W. (2002). Population balance modeling. Promise for the future. *Chemical Engineering Science*, *57*, 595–606. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250901003864>. doi:10.1016/S0009-2509(01)00386-4.
- Shohat, J. A., & Tamarkin, J. D. (1943). *The Problem of Moments*. American Mathematical Soc.
- Tagliani, A. (1999). Hausdorff moment problem and maximum entropy: a unified approach. *Applied Mathematics and Computation*, *105*, 291–305. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009630039810084X>.
- Tagliani, A. (2001). Numerical aspects of finite Hausdorff moment problem by maximum entropy approach. *Applied mathematics and computation*, *118*, 133–149. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0096300399002106>.
- Wheeler, J. C. (1974). Modified moments and Gaussian quadratures. *Rocky Mountain Journal of Mathematics*, *4*, 287–296. URL: <http://projecteuclid.org/euclid.rmjm/1250130972>.
- Yuan, C., Laurent, F., & Fox, R. O. (2012). An extended quadrature method of moments for population balance equations. *Journal of Aerosol Science*, *51*, 1–23. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850212000699>.
- Ziff, R. M., & McGrady, E. D. (1985). The kinetics of cluster fragmentation and depolymerisation. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, *18*, 3027. URL: <http://iopscience.iop.org/0305-4470/18/15/026>.

V.1.2.3 Conclusion sur la reconstruction

L'analyse des différentes techniques de reconstruction face à la solution analytique dans le cas d'un processus de dépolymérisation donne des résultats intéressants. La technique BKDF aboutit à des reconstructions relativement précises mais nécessite un nombre élevé de moments (11 moments dans ce cas). La technique des splines, quand à elle, dépend fortement des paramètres de tolérance qui affectent sa vitesse de convergence ainsi que la qualité de la reconstruction. De ce fait, il n'est pas possible de fixer les paramètres optimaux pour l'ensemble des distributions à reconstruire mais uniquement individuellement, ce qui nécessite une connaissance au préalable de la forme de la distribution. Cette technique n'est pas adaptée pour le suivi et la reconstruction simultanée au cours de la dépolymérisation. La technique du maximum d'entropie donne les meilleurs résultats et reconstruit les PDFs analytiques avec une grande précision. De plus, elle converge rapidement (quelques itérations) et nécessite un nombre limité de moments (six dans ce cas), ce qui la rend particulièrement intéressante pour un couplage avec le bilan de population résolu par la méthode des moments, ce qui a été fait dans la deuxième partie de l'étude.

La méthode de Quadrature des Moments (QMOM) a été adoptée pour résoudre numériquement l'équation de BP dans le cas de la dépolymérisation. Il est admis dans la littérature qu'une quadrature à trois nœuds donne des résultats précis ([Marchisio et al., 2003b](#)) et l'algorithme Produit-Différence ([Gordon, 1968](#)) a été utilisé pour l'identification de ces nœuds. L'algorithme de la technique du maximum d'entropie a été implémenté de telle sorte à reconstruire les PDFs simultanément avec la résolution QMOM à partir des moments numériques. Les résultats obtenus montrent que les reconstructions ne sont pas satisfaisantes et s'éloignent de ce qui a été obtenu avec les moments analytiques. Pour augmenter la précision de la méthode QMOM, nous sommes passés à une quadrature à quatre nœuds, ce qui améliore considérablement la qualité de la reconstruction sans pour autant rejoindre la qualité qu'avec la solution analytique. Nous avons obtenu exactement les mêmes résultats avec la méthode DQMOM tout en contrôlant la qualité de l'intégration numérique temporelle. De même, l'utilisation de l'algorithme de Wheeler ([Wheeler & others, 1974](#)) pour la détermination des nœuds, connu pour être plus précis que l'algorithme Produit-Différence ([John & Thein, 2012](#)) n'améliore pas la qualité de la reconstruction. Cela montre que l'erreur sur l'estimation des moments induite par la quadrature prime sur celle due à l'intégration temporelle et à la qualité de l'algorithme

utilisé et affecte considérablement la technique de reconstruction par le maximum d'entropie. Ainsi, comme conclusion, une attention particulière doit être portée à la qualité des moments servant à la reconstruction (ce qui pose la question de la qualité des mesures expérimentales), ce point n'a pas été rapporté dans la littérature.

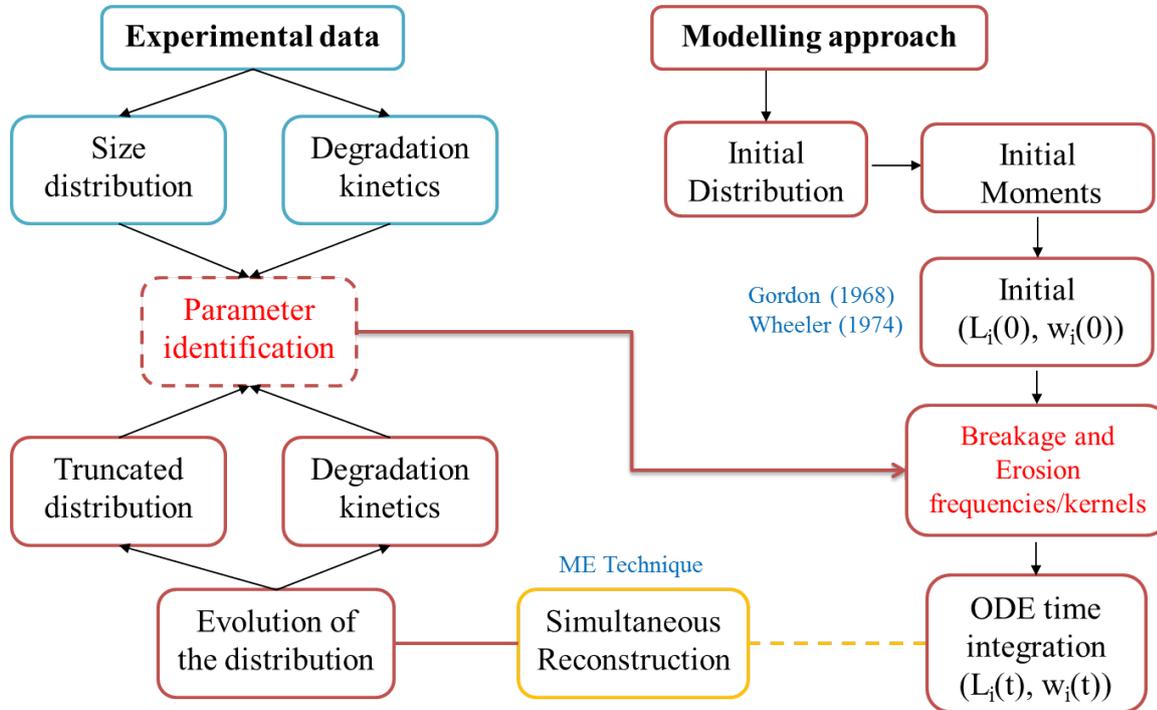


FIGURE V.1 – Schéma global de la résolution du PBE via la méthode des moments avec reconstruction simultanée des distributions et l'éventuel couplage avec la partie expérimentale

Nous avons identifié la meilleure méthode pour procéder à la reconstruction. Nous avons pour cette méthode identifier les conditions permettant d'assurer une reconstruction fiable tout au long de la simulation de la réaction. Il n'est pas inutile de souligner que ce résultat ouvre la voie à une procédure d'identification paramétrique et d'optimisation comme le montre la figure V.1. En effet, par l'approche de modélisation/simulation, nous sommes désormais capable de simuler une hydrolyse enzymatique (sucres simples et distribution de taille) en fixant un nombre réduit de paramètres (fréquences de coupure, constante d'inhibition). Les distributions de tailles reconstruites peuvent donc être comparées aux données expérimentales. L'identification des constantes du modèles (en nombre plus restreints) peut donc désormais s'appuyer sur la chimie (sucres simples) et la physique du système (distribution en taille). Nous n'avons pas mené d'étude extensive pour conduire à l'identification de paramètres dans le cadre de ce travail, mais tous les

outils nécessaires ont été développés.

V.1.2.4 Méthode DQMOM pour l'hydrolyse enzymatique de la cellulose

Dans un premier temps, nous avons utilisé l'approche QMOM et traité un problème identique à celui résolu par la méthode des classes : l'activité endoglucanase (EG) est assimilée à une rupture binaire pure caractérisée par une fréquence $\Gamma(x)$ et l'activité cellobiohydrolase (CBH) à un processus de dissolution des chaînes avec une vitesse $G(x)$.

Les résultats obtenus par la méthode QMOM dans le cas de l'activité EG sont similaires à ceux de la méthode des classes, ce qui constitue une preuve forte de la qualité des outils numériques construits dans ce travail. Concernant l'activité CBH, les résultats ne sont satisfaisants que pour les faibles taux de conversion du substrat. En effet, le phénomène de dissolution qui se traduit dans le cas de la méthode QMOM par le déplacement des nœuds vers les petites tailles à une vitesse $G(x)$ induit inmanquablement le glissement de ces nœuds vers des valeurs négatives, ce qui n'a pas de sens d'un point de vue physique. Cela se traduit par une évaluation numérique des moments inexploitable (perte du sens physique) et à l'impossibilité de mener à bien la reconstruction (une PDF est définie positive). Les méthodes de reconstruction développées précédemment traitent du problème des moments de *Hausdorff*, en d'autres termes, le support de la reconstruction est borné positif. Ce problème technique nous a conduit à repenser la façon de modéliser l'activité CBH tout en conservant la robustesse de la méthode des moments.

L'activité CBH, pour rappel, produit des particules élémentaires (molécules de cellobiose) suite à chaque attaque. De ce fait, ce processus enzymatique peut être vu comme un phénomène d'érosion des extrémités des chaînes cellulosiques. Ce phénomène d'érosion est un cas particulier de la rupture et peut, de ce fait, être modélisé exactement comme l'activité EG (rupture binaire aléatoire) mais avec des paramètres qui lui sont propres. Ainsi, nous caractérisons l'activité EG par les paramètres β_{EG} et Γ_{EG} et l'activité CBH par les paramètres β_{CBH} et Γ_{CBH} . Alors que la fragmentation liée à l'activité EG est caractérisée par une rupture binaire aléatoire, la rupture due aux CBH est certes binaire mais ne se produit qu'en bout de chaîne pour donner une molécule de cellobiose. Cette approche est détaillée dans la partie V.1.2.5 où nous donnerons aussi une méthode pour quantifier l'évolution de la concentration en cellobiose dérivée directement de la quadrature de Gauss.

En plus des deux activités EG/CBH, l'activité β -glucosidase (BGL) transformant le cellobiose en glucose a été incluse dans le modèle sous forme d'une cinétique Michaelienne avec une inhibition compétitive par le glucose. En effet, cette activité de par son mécanisme simple ne nécessite pas une modélisation avancée. L'effet d'inhibition des EG/CBH par le cellobiose a été aussi pris en compte.

Les tests avec la méthode QMOM montrent des instabilités numériques contrairement à DQMOM. Ces instabilités viennent notamment du phénomène d'érosion, de ce fait, nous avons opté pour la méthode DQMOM. Comme précédemment, la technique de reconstruction des PDFs par le maximum d'entropie, validée dans la partie [V.1.2.2](#), a été implémentée dans le code DQMOM pour avoir accès à l'évolution de la distribution de taille des chaînes au fur et à mesure de la résolution.

V.1.2.5 Article 3 : Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose : I. Case of soluble substrate

L'article est structuré comme suit : la partie théorique est consacrée aux développements nécessaires pour l'expression des activités enzymatiques dans le cadre du formalisme de bilan de population puis leur adaptation à la méthode DQMOM. Dans la partie résultats, les activités EG et CBH sont explorées indépendamment l'une de l'autre avant de les combiner dans un seul modèle global (avec l'activité BGL). En dernier lieu, l'effet d'inhibition par les sucres simples est discuté.

Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose: I. Case of soluble substrate

Noureddine Lebaz^{a,b,c,d}, Arnaud Cockx^{b,c,d}, Mathieu Spérandio^{b,c,d}, Jérôme Morchain^{b,c,d,*}

^aToulouse White Biotechnology (UMS INRA/INSA/CNRS), 3 rue Ariane, 31520 Ramonville Saint Agne, France

^bUniversité de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077, Toulouse, France

^cINRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, Toulouse, France

^dCNRS, UMR5504, F-31400, Toulouse, France

Abstract

The modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulosic polymers has been investigated through a population balance approach. Both Endoglucanase (EG) and Exoglucanase (CBH) activities are taken into account. EG achieves random attacks along cellulosic chains and cleaves the β -glycosidic bonds whereas CBH produces cellobiose molecules by chain-end scission mechanism. The EG activity is modelled as a pure breakage while the CBH activity is assimilated to an erosion process with a specific product (cellobiose). In the two cases, the inhibition of the cellulases activity by the end-product is incorporated. The population balance equation (PBE) accounting for breakage processes has been solved using the Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM) coupled to a distribution reconstruction technique based on the Maximum Entropy (ME) principle in order to track the time evolution of the chain length distribution (CLD) during the hydrolysis reaction. The β -glucosidase activity transforming the produced cellobiose into glucose is modelled as a Michaelis-Menten type kinetic with a competitive inhibition effect and solved simultaneously with the PBE. The numerical results show the time-evolution of the CLD during the hydrolysis reaction as well as the rate of conversion of the substrate to simple sugars. The synergistic action of the EG and CBH is highlighted and the inhibition effect is investigated. The approach is promising by its accuracy and fastness.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, population balance, cellulose, Endoglucanase, Exoglucanase

1. Introduction

The growing demand for energy, the depletion of fossil fuels and the global warming have sparked a growth in research for renewable energy sources (Sun & Cheng, 2002). One of the promising alternatives is the bioconversion of biomass materials to bioethanol (Jrgensen et al., 2007).

The biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol involves several processing steps (Gregg & Saddler, 1995). The reduction of cellulose, which is the major component of plant material, into fermentable sugars is carried out by means of enzymatic hydrolysis.

*Corresponding author. Address: INSA, LISBP, 135, avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France. Tel.: +33 56 155 9774; Fax: +33 56 155 9760

Email address: jerome.morchain@insa-toulouse.fr (Jérôme Morchain)

Cellulose is a homopolymer of β -1,4 linked D-glucose units (Mittal et al., 2011). Enzymes cocktail capable of degrading this polymer to sugars are a mixture of at least three different activities. The endoglucanase activity (EG) cleaves randomly the β -1,4-glycosidic linkages, the cellobiohydrolase activity (CBH) attacks the chain-ends and releases cellobiose (dimer of glucose) and β -glucosidase activity hydrolyzes cellobiose into D-glucose (Andersen et al., 2008). A typical kinetic of the enzymatic hydrolysis of cellulose is characterized by a rapid initial rate followed by a gradual slowdown caused by a multitude of factors affecting the effectiveness of the biocatalysts, leading, finally, to a partial conversion of the substrate (Yang et al., 2006). These factors are related to the substrate structure (nature, pretreatments), the operating conditions (pH, temperature and mixing) and the enzymes (nature, deactivation during the reaction, inhibition by the end-products) (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Understanding the complex interactions between the enzymes elementary mechanisms and the dynamic evolution of the substrate features during the hydrolysis reaction is of critical importance for the modelling, the design and the optimization of the transformation process. Michaelis-Menten based models are widely used for the modelling of this dynamic process however, since they have been developed initially for homogeneous reaction conditions, the parameters fitting the experimental data are only apparent and constants sometimes lacking physical or biochemical basis (Bansal et al., 2009). Mechanistic models incorporating one or several rate limiting factors such as the substrate accessibility, the cellulases inhibition/deactivation and the change in the substrate reactivity can be found in literature (Fan & Lee, 1983; South et al., 1995; Xu & Ding, 2007). A convincing critical analysis of the identifiability of these models has been published by Sin et al. (2010).

Recently, models based on population balance approach have been proposed. Hosseini & Shah (2011a,b) assimilated the cellulose hydrolysis to soluble polymer degradation. The endoglucanase activity (EG) has been modelled as a pure random breakage of the cellulose chains and the exoglucanase activity (CBH) as a chain-end scission (Kostoglou, 2000). To be more realistic, Griggs et al. (2012a,b) developed a population balance model based on the depolymerization mechanisms of EG and CBH assuming a population of monodisperse cylindrical cellulose particles since the reaction is heterogeneous. To solve the system of rate equations, Hosseini & Shah (2011a,b) considered all the possible chains in the system when Griggs et al. (2012a,b) reduced the number of equations by mapping the continuous particle size distribution (PSD) to a fixed discrete grid points. Lebaz et al. (2015a) used the discretization method developed by Kumar & Ramkrishna (1996a) for the resolution of the population balance equation (PBE) with a fixed pivot technique for the EG activity and a moving pivot technique (Kumar & Ramkrishna, 1996b) for the CBH activity since it was assimilated to a continuous dissolution of the cellulosic chains. Ho et al. (2014), meanwhile, proposed a modified fixed pivot technique for the modeling of chain-end scission by CBH. All are computationally expensive.

Cellulose particles can be characterized by their Degree of Polymerization (DP) which is the number of monomers (D-glucose) constituting each particle. If we note N the maximum DP in a given particulate

system, one needs to solve N equations for describing the time-evolution of all the possible particles undergoing breakage processes. Since N can be extremely large, the resolution of the set of equations requires high computational cost. The discretization method (Kumar & Ramkrishna, 1996a) reduces considerably the number of equations by distributing the particles into a set of classes $M < N$. Unfortunately, the accuracy of this method depends on the number of classes M . Increasing M implies more equations to solve and, thereby, substantial computational time. In this study, we develop a new approach for solving the PBE in the case of cellulose depolymerization by EG and CBH. For the sake of accuracy and computational efficiency, the Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM) is used as solution method (Marchisio & Fox, 2005). Since DQMOM provides information only on the time evolution of the moments of the particle size distribution (PSD), the recovering of the full distribution is needed. For this, the PSD is reconstructed from its first moments using the Maximum Entropy based method (Tagliani, 1999). This reconstruction method is preferred than other techniques (e.g. Spline based method, Beta Kernel Density Function based technique) for its fastness, accuracy and the small number of the required moments (Lebaz et al., 2015b). This is of critical importance when the PSD reconstruction and the PBE resolution are conducted simultaneously.

The β -glucosidase activity occurring in a homogeneous system is modelled as a Michaelis-Menten type kinetic with competitive inhibition and resolved simultaneously with the PBE. This activity transforms the cellobiose produced by the CBH into the final product: the D-glucose.

For sake of clarity, this contribution is organized in two parts. In this first part, the focus will be put on soluble substrates. The general theoretical framework including the DQMOM approach for solving the homogeneous monovariate PBE and the PSD reconstruction by the Maximum Entropy based method is developed and validated against analytical solutions. We show how the cellulolytic activities are modelled in the case of depolymerization of soluble cellulose chains before testing and discussing the robustness of the model in the results section. The second part deals with the case of particulate systems.

2. Theoretical framework

The PBE describes the evolution of a density function of a given population of chains/particles undergoing different transformation processes. In the case of enzymatic hydrolysis of cellulose chains, the substrate chains are degraded during the reaction by the synergistic action of the enzymes mixture. Thus, considering the chain length L as the internal coordinate, the PBE expressing the depolymerization process in a homogeneous system is written in its continuous form as:

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = \int_L^\infty \beta(L, \lambda) \Gamma(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma(L) n(L, t) \quad (1)$$

where $n(L, t)$ is the length-based number density function, $\Gamma(L)$ the breakage frequency for a chain of length L , $\beta(L, \lambda)$ is the breakage kernel giving the probability of obtaining a chain of length L from the breakup of a chain λ . The first term on the RHS accounts for the formation (birth) of chains with length L

resulting from the breakage of larger chains λ . The last term is the death term due to the loss of chains of length L because of their depolymerization.

Except for some cases where $\Gamma(L)$ and $\beta(L, \lambda)$ have simple mathematical expressions (Ziff & McGrady, 1985), equation 1 has no analytical solution. Numerical methods are used to solve it. We adopt in this contribution the Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM). A brief description of this method is given in Appendix A, for more detail, one can refer to the original paper by Marchisio & Fox (2005).

The k^{th} order moment of the chain length distribution (CLD) is defined as:

$$m_k(t) = \int_0^\infty L^k n(L, t) dL \quad (2)$$

The moments provide the main properties of the CLD. The zeroth order moment, $m_0(t)$, represents the molar concentration of the cellulose chains since $n(L, t)dL$ is the number of cellulose chains per volume having lengths between L and $L + dL$. The first order moment, $m_1(t)$, gives the total concentration of monomers of cellulose chains. Average properties of the CLD can be derived from the moments such as the number-averaged chain length given by the ratio of the two first moments $m_1(t)/m_0(t)$ and the mass-averaged chain length $m_2(t)/m_1(t)$.

By applying the moment transformation of equation (1), the final moment transport equation is given as:

$$(1 - k) \sum_{i=1}^N L_i^k a_i + k \sum_{i=1}^N L_i^{k-1} b_i = \sum_{i=1}^N \bar{b}_i^{(k)} \Gamma_i w_i - \sum_{i=1}^N L_i^k \Gamma_i w_i \quad (3)$$

where

$$\left\{ \begin{array}{l} a_i = \frac{\partial w_i}{\partial t} \\ b_i = \frac{\partial c_i}{\partial t} \\ c_i = w_i L_i \\ \bar{b}_i^{(k)} = \int_0^\infty L^k \beta(L, L_i) dL \end{array} \right. \quad (4)$$

$(L_i(t), w_i(t))$ are the abscissas and weights of the N Gaussian quadrature nodes. $(L_i(0), w_i(0))$ can be computed using the Product-Difference (PD) algorithm (Gordon, 1968). The different steps of the transformation are explicated in Appendix A .

Although the intrinsic activities of EG and CBH are different, they lead to the depolymerization of the substrate chains during the reaction. Thus, the two activities are modelled as breakage processes (equation 1), the distinction between them will appear on the formulation of the breakage kernels. This will be discussed in the next sections.

The validation of the DQMOM implementation in the case of breakage processes is given in Appendix B. This numerical validation is based on analytical solution of equation 1 (Lebaz et al., 2015b).

2.1. Number density distribution reconstruction from the moments

The recovery of a distribution knowing only a finite number of its moments is known as the moment problem in mathematical analysis and arises in many scientific applications (Gavriliadis & Athanassoulis, 2009). Different numerical methods have been developed for the reconstruction of distributions from the moments reviewed by (John et al., 2007). For its simplicity and accuracy, the Maximum Entropy (ME) approach (Tagliani, 1999) is used in this work. We give hereafter a synthetic description of this technique.

We note by $f(x)$ the probability density function (PDF) and by $f_M(x)$ its approximation. The ME method is based on the maximization of the Shannon entropy $H[f]$ given by:

$$H[f] = - \int_0^{\infty} f(x) \ln f(x) dx \quad (5)$$

Under the moments constraints:

$$m_k = \int_0^{\infty} x^k f(x) dx \quad k = 0, 1, \dots \quad (6)$$

The explicit representation of the ME approximate is given by:

$$f_M(x) = \exp \left[- \sum_{j=0}^{2N-1} \xi_j x^j \right] \quad (7)$$

To be supplemented by the $2N$ constraints:

$$m_i = \int_0^{\infty} x^i f_M(x) dx \quad i = 0, 1, \dots, 2N - 1 \quad (8)$$

The $(2N)$ Lagrange's multipliers ξ_0, \dots, ξ_{2N-1} are obtained by solving the following set of $2N$ nonlinear equations:

$$\int_0^{\infty} x^i \exp \left[- \sum_{j=0}^{2N-1} \xi_j x^j \right] dx = m_i \quad i = 0, 1, \dots, 2N - 1 \quad (9)$$

Numerically, iterative methods are used to solve equation 19 (Mead & Papanicolaou, 1984). In our case, we use the standard Newton method starting from an initial choice of the Lagrange's multipliers as $\xi = (-\ln(m_0)/(x_{max} - x_{min}), 0, \dots, 0)$ with an accuracy of 10^{-6} . The set of moments are normalized before such as $m_0 = 1$. For more details as well as for the validation, one can refer to (Lebaz et al., 2015b).

2.2. Breakage kernels formulation

The depolymerization mechanism depends on the nature of the cellulases. In our case, two main activities (EG and CBH) are considered. This leads to the resolution of the global PBE below:

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = S_L^{EG}(L, t) + S_L^{CBH}(L, t) \quad (10)$$

with

$$\begin{cases} S_L^{EG}(L, t) &= \int_0^\infty \beta_{EG}(L, \lambda) \Gamma_{EG}(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{EG}(L) n(L, t) \\ S_L^{CBH}(L, t) &= \int_L^\infty \beta_{CBH}(L, \lambda) \Gamma_{CBH}(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{CBH}(L) n(L, t) \end{cases} \quad (11)$$

where β_{EG} and β_{CBH} are the breakage kernels, Γ_{EG} and Γ_{CBH} the breakage frequencies for EG and CBH respectively.

The expression of the breakage kernels for both EG and CBH depends on the nature of the substrate : soluble polymer chains or particulate system. In the following paragraph, the formulation will be restricted to the case of polymer chains. The case of particulate substrates is treated in the second part.

2.2.1. EG activity: random breakage

The EG activity cleaves randomly the β -1,4-glycosidic bonds along the cellulosic chains. Thus, in the case of soluble substrate, each EG attack leads to the scission of the initial chain λ producing thereby two smaller chains $(\lambda - L)$ and L :



Since the EG has a random attack, longer chains are more likely to be attacked (Hosseini & Shah, 2011a). Thus, the breakage kernel is given as $\beta(\lambda, L) = 2/\lambda$. The factor 2 introduces the fact that all along a given polymer of length λ , there are two positions which may lead, after breakage, to a daughter chain of length L . The time-evolution of the chain length number density function, $n(L, t)$ is given by the PBE :

$$S_L^{EG}(L, t) = \left. \frac{\partial n(L, t)}{\partial t} \right|_{EG} = 2 \int_L^\infty \frac{1}{\lambda} \Gamma_{EG}(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{EG}(L) n(L, t) \quad (13)$$

2.2.2. CBH activity: chain-end scission

The CBH activity has not a random aspect as the EG one, each effective attack produces one soluble cellobiose molecule and reduces, thereby, the DP of the attacked chain by 2. In the case of soluble substrate, the CBH mechanism is described by:



where L_C is the length of the cellobiose molecule.

The polymer length is directly affected by the loss of cellobiose molecules, it decreases until the total solubilization of the chain. Since the CBH activity leads to a specific product, the breakage kernel is given by a Dirac delta function (McCoy & Wang, 1994; Wang et al., 1995) and the corresponding source term can be expressed as :

$$S_L^{CBH}(L, t) = \left. \frac{\partial n(L, t)}{\partial t} \right|_{CBH} = \int_L^\infty \Gamma_{CBH}(\lambda) \delta(L - (\lambda - L_C)) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{CBH}(L) n(L, t) \quad (15)$$

Additionally the cellobiose concentration $C_C(t)$ evolution during the reaction is given by :

$$\frac{\partial C_C(t)}{\partial t} = \int_L^\infty \Gamma_{CBH}(\lambda) \delta(L - L_C) n(\lambda, t) d\lambda + S_{L_C}^{EG}(L, t) \quad (16)$$

Where $S_{L_C}^{EG}(L, t)$ is the contribution of EG activity to cellobiose release which is negligible thus, the right hand side of equation (16) can be reduced to the first term.

The moment transformation of equations (13) and (15) is given by equation (3). We explicit hereafter the moment transformation of the equation (16) accounting for the cellobiose release after each CBH effective attack. Equation (16) can be written in a compact form as:

$$\frac{\partial C_C(t)}{\partial t} = Q_L(L, t) \quad (17)$$

where $Q_L(L, t)$ is the source term due to the erosion process.

One has to precise that $C_C(t)$ is a delta function centered on the cellobiose length L_C with a time increasing weight. Thus, $C_C(t)$ can be expressed as:

$$C_C(t) = w_C(t) \delta(L(t) - L_C) \quad (18)$$

By introducing equation (18) in (17), we obtain:

$$\delta(L - L_C) \frac{\partial w_C}{\partial t} - \delta'(L - L_C) w_i \frac{\partial L_C}{\partial t} = Q_L(L, t) \quad (19)$$

Since L_C is constant within the time, equation (19) is reduced to:

$$\delta(L - L_C) \frac{\partial w_C}{\partial t} = Q_L(L, t) \quad (20)$$

In order to apply the moment transformation, the k^{th} moment of $C_C(t)$ is defined as:

$$m_k(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} L^k C_C(t) dL = w_C L_C^k \quad (21)$$

Thus, equation (20) is transformed to:

$$(1 - k) L_C^k \frac{\partial w_C}{\partial t} = \int_0^\infty L^k Q_L(L, t) dL \quad (22)$$

In the other hand, the term source is transformed as follows:

$$\begin{aligned} \overline{Q}_k^{(N)} &= \int_0^\infty L^k Q_L(L, t) dL \\ &= \int_0^\infty \int_L^\infty L^k \Gamma(\lambda) \delta(L - L_C) n(\lambda, t) dL d\lambda \\ &= \sum_{i=1}^N \overline{b}_i^{(k)} \Gamma_i w_i \end{aligned} \quad (23)$$

In equation (23), w_i refers to the weight of the node i of the density $n(L, t)$.

In the specific case of erosion process :

$$\bar{b}_i^{(k)} = \int_0^\infty L^k \delta(L - L_C) dL = L_C^k \quad (24)$$

The term source is reduced to :

$$\bar{Q}_k^{(N)} = \sum_{i=1}^N L_C^k \Gamma_i w_i \quad (25)$$

Finally, equation 25 is transformed to :

$$(1 - k) L_C^k \frac{\partial w_C}{\partial t} = \sum_{i=1}^N L_C^k \Gamma_i w_i \quad (26)$$

Since $C_C(t)$ is fully defined by the concentration of cellobiose molecules produced at the time t , one needs only the zeroth order moment ($k = 0$), thus:

$$\frac{\partial w_C}{\partial t} = \sum_{i=1}^N \Gamma_i w_i \quad (27)$$

Thus, equation (27) gives the time evolution of the cellobiose concentration.

2.3. Breakage frequencies formulation

The breakage frequencies for the two enzymatic activities give the rate of the depolymerization process, in other words, the number of effective attacks per time unit. They are directly related to the cellulases concentration, more specifically to the active adsorbed enzymes concentration.

Different mathematical expressions can be used for the breakage frequencies. One can, for example, assume that Γ_{EG} is proportional to the chain length L since the longer chains are more likely to be attacked which is not necessarily the case for Γ_{CBH} because of the nature of the exoglucanase attacks. Different expressions for these frequencies are to be tested and confronted to the trends observed in experimental data sets (expressed as CLD at various times during hydrolysis). The general form $\Gamma = \alpha L^p$ is often used (Nopens et al., 2002; Ding et al., 2006).

2.4. The EG and CBH inhibition effect

The end-products inhibition effect is known as one of the most important factors affecting the hydrolysis rate (Xiao et al., 2004; Gruno et al., 2004) causing a progressive decrease of the cellulases activity as the end-product concentration increases with substrate conversion. To incorporate this critical effect in the model, we express the breakage frequencies of EG and CBH as functions of the end-product concentration which is time-dependent as follows (equations 28 and 29):

$$\Gamma_{EG} = \Gamma_{EG_0} \times \frac{K_{EG}}{C_C(t) + K_{EG}} \quad (28)$$

$$\Gamma_{CBH} = \Gamma_{CBH_0} \times \frac{K_{CBH}}{C_C(t) + K_{CBH}} \quad (29)$$

where $C_C(t)$ is the cellobiose molar concentration, K_{EG} and K_{CBH} are the inhibition constants for EG and CBH respectively, Γ_{EG_0} and Γ_{CBH_0} are the intrinsic EG and CBH activities respectively.

2.5. The β -glucosidase activity

Since the β -glucosidase activity takes place in the liquid phase and turns cellobiose into D-glucose, Michaelis-Menten type kinetic is used for the modelling of this activity. A competitive inhibition by the accumulation of glucose is incorporated as shown in equation (30).

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{2V_m C_C}{K_m \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right) + C_C} \quad (30)$$

where C_G is the glucose molar concentration, K_m and V_m the Michaelis-Menten parameters, K_P the inhibition constant for the β -glucosidase activity. The factor 2 is due to the fact that one mole of cellobiose gives two moles of glucose.

To summarize, starting from a given chain length distribution (CLD), we solve simultaneously a set of equations (equation (31)) including a PBE accounting for a random breakage process for the EG activity, a PBE for an erosion process referring to the CBH activity and a Michaelis-Menten equation for the β -glucosidase activity.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = 2 \int_L^\infty \frac{1}{\lambda} \Gamma_{EG}(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{EG}(L) n(L, t) \\ \quad + \int_L^\infty \Gamma_{CBH}(\lambda) \delta(L - (\lambda - L_C)) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{CBH}(L) n(L, t) \\ \frac{\partial C_C(t)}{\partial t} = \int_L^\infty \Gamma_{CBH}(\lambda) \delta(L - L_C) n(\lambda, t) d\lambda - \frac{1}{2} \frac{dC_G(t)}{dt} \\ \frac{dC_G(t)}{dt} = \frac{2V_m C_C}{K_m \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right) + C_C} \end{array} \right. \quad (31)$$

The integration of this set of equations using DQMOM approach coupled with the reconstruction technique gives the time evolution of the CLD and the kinetic of the substrate conversion into simple sugars (cellobiose and glucose). Numerically, the *ode45* integrator of MATLAB is used under a work-station comprising of an Intel®Core™i7-3740QM CPU with a clock speed of 2.7 GHz and 16 GB of installed memory (RAM).

3. Results and discussion

For all the results presented in this article, the initial CLD is assimilated to a Gamma distribution given by the equation below:

$$n(L, 0) = \frac{L^{\kappa-1} e^{-L/\theta}}{\Gamma^*(\kappa) \theta^\kappa} \quad (32)$$

where κ and θ are the Gamma distribution parameters and Γ^* the Gamma function. The mode of the Gamma distribution is given by $(\kappa - 1)\theta$ and its variance by $\kappa\theta^2$. In our case, the Gamma distribution parameters are $\kappa = 60$ and $\theta = 10$.

The two main activities EG and CBH are treated separately before showing the combination and the inhibition effect. The breakage frequencies are set proportional to the polymer chain length which means that the longer chains are more likely to be attacked ($\Gamma = \alpha L^p$). This is the case especially for the EG random activity. Other breakage frequency expressions (e.g. constant) can be tested easily (see supplementary data). The breakage kernels for both EG and CBH are summarized in Table 1. The system of ordinary differential equations (equation 31) is integrated using a Matlab subroutine *ode45* over the time interval $[0,10]$. The reconstruction of the CLDs from the moments using the Maximum Entropy based method is performed simultaneously with the PBE resolution.

<i>Mechanism</i>	$\beta(L, \lambda)$	$\bar{b}_i^{(k)}$	Frequency (Γ)
EG: Uniform breakage	$2/\lambda$	$L_i^k \frac{2}{k+1}$	αL^p
CBH: Erosion process	$\begin{cases} 1 & \text{if } L = L_C \\ 1 & \text{if } L = \lambda - L_C \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$	$L_C^k + (L_i - L_C)^k$	αL^p

Table 1: The breakage kernels for EG and CBH activities in the case of depolymerization of soluble chains

3.1. CBH + β -glucosidase activities

CBH attacks the chain-ends and releases cellobiose molecules as product. The loss of two monomers by the attacked polymers is modelled as an erosion process leading to a progressive shortening of the chains length until their total transformation. The breakage frequency is set to $\Gamma_{CBH} = 0.04L$ ($\alpha = 0.04$ and $p = 1$). The Figure 1 gives the time evolution of the first four normalized moments of the CLD undergoing CBH attacks.

The total molar concentration (zeroth order moment) remains constant within the process since the initial number-averaged chain length is far from the origin, the hydrolysis time and/or erosion frequency has to be subsequently increased to lead to the total transformation of the substrate. In other words, the initial number of chains is kept unchanged but the chains length is decreasing. All along the process, the total mass of the soluble chains (the first order moment) decreases due to the loss of cellobiose molecules. The set of equations (31) is conservative which means that the loss of mass due to the enzymatic action on the polymer chains (Figure 1) is identical to the accumulation of cellobiose and glucose.

Figure 2 gives the evolution of the initial CLD reconstructed by the ME based method. The initial distribution is tightening more and more and moves toward the smaller lengths during the depolymerization

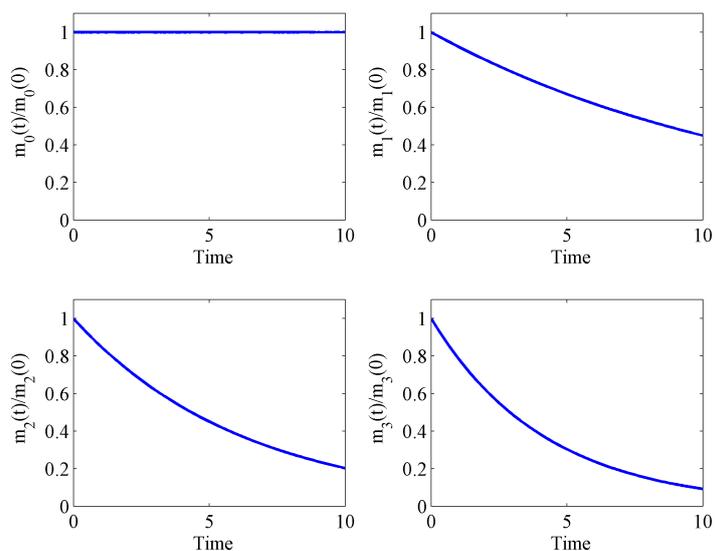


Figure 1: The time evolution of the four first normalized moments of the chain length distribution undergoing CBH attacks with a frequency proportional to the polymer length

process since the erosion frequency is not equally distributed all along the CLD, the longer chains are more frequently attacked than the smaller ones.

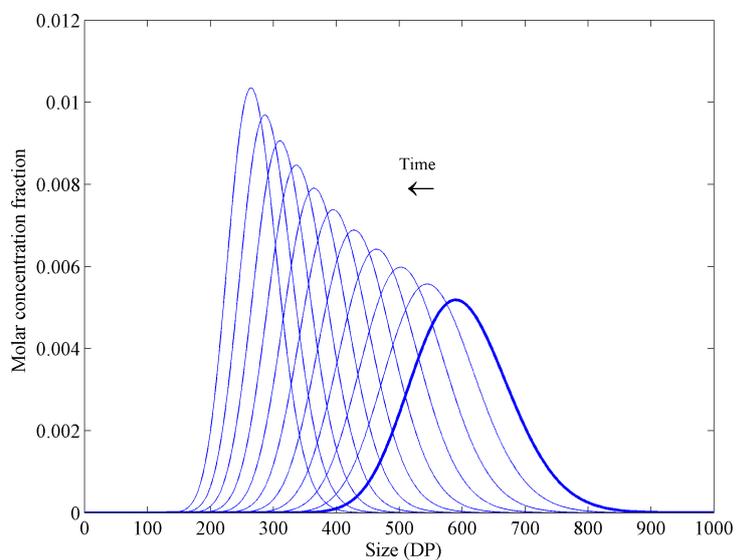


Figure 2: The time evolution of the CLD undergoing CBH attacks with a frequency proportional to the polymer length

3.2. EG activity

EG attacks randomly the cellulose chains and breaks up the glucosidic bonds leading to two daughter smaller chains after each attack. This fragmentation process has as direct consequence the increase of the total molar concentration of the cellulose chains in the system as shown by the normalized zeroth order moment in Figure 3. The total mass represented by the first order moment remains constant all along the process time. The number-averaged chain length given by the ratio of the two first moments decreases from a DP of 600 to 375 at the end of the process.

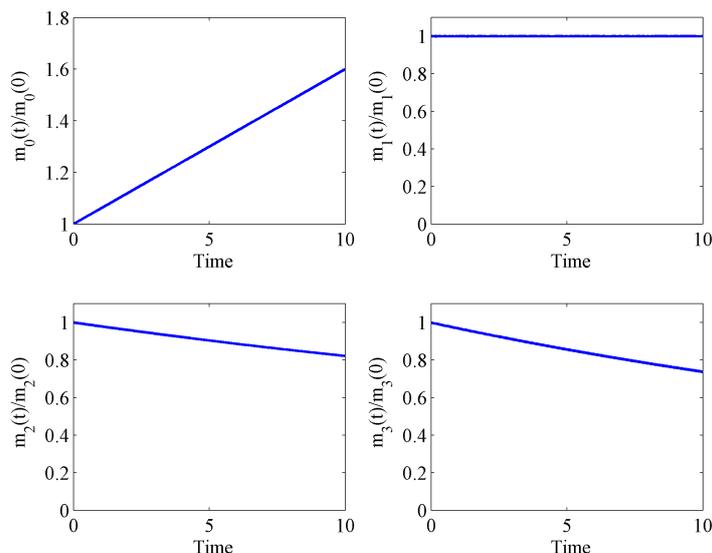


Figure 3: The time evolution of the four first normalized moments of the chain length distribution undergoing EG attacks with a frequency proportional to the polymer length

Figure 4 gives the time-evolution of the CLD undergoing fragmentation process. The molar concentration of the longer chains decreases when small chains appear in the system with an increasing molar concentration. The initial CLD shifts toward the smaller lengths with a consequent shape transformation (bimodal distributions appear). The CLDs are reconstructed over the interval $[0, +\infty[$. The action of EG on small chains with $L \in [0, 2]$ is therefore considered in the model in order to formulate a continuous breakage kernel expression and thus ensure low computational cost for the PBE resolution. This is conceptually erroneous but there is no consequence from a quantitative point of view as mentioned before (equation (16)). Firstly, the probability to produce cellobiose when cutting a chain of length L is very small, the breakage frequency goes to zero when $L \rightarrow 2$. As a result, the amount of cellobiose produced by EG is several order of magnitude smaller than that resulting from CBH activity. This support the negligence of the term S_{LC}^{EG} in equation (16).

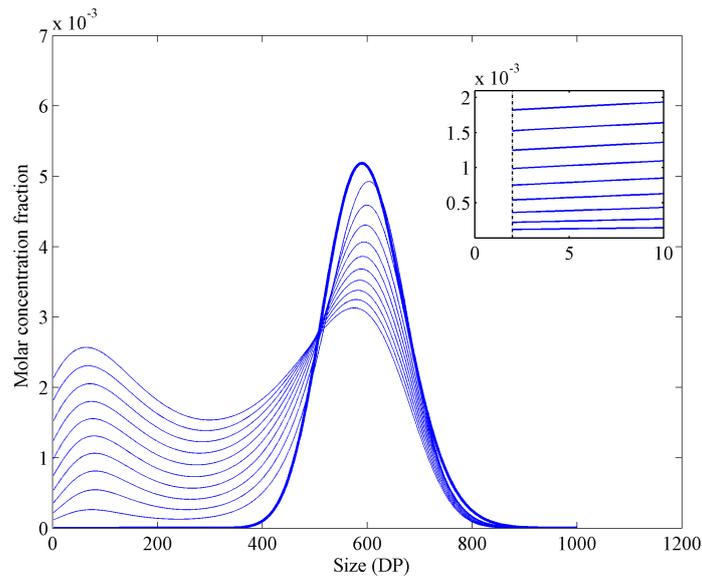


Figure 4: The time evolution of the CLD undergoing EG attacks with a frequency proportional to the polymer length

3.3. EG-CBH combined activity

The combination of the three different enzymatic activities results in a simultaneous fragmentation of the cellulose chains and their erosion from the ends as shown by the Figure 5. In this example, the breakage frequencies of both EG and CBH are kept equal to those used for the two cases separately ($\Gamma = \alpha L^p$).

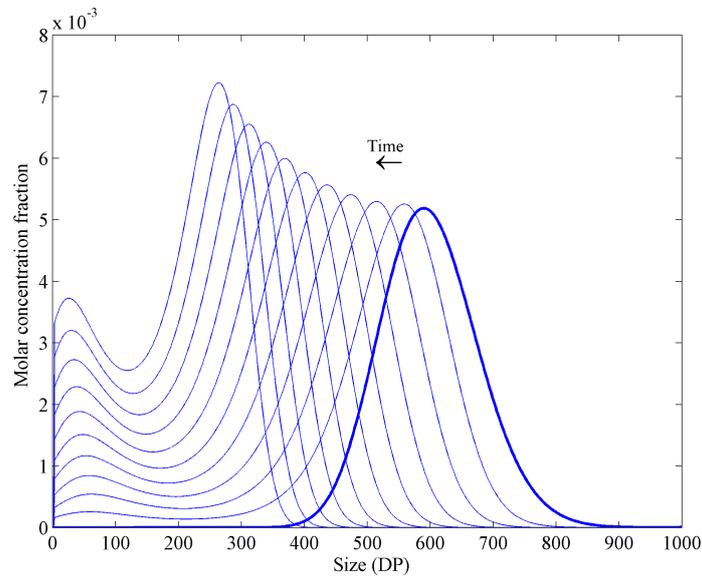


Figure 5: The time evolution of the CLD undergoing EG and CBH attacks with a frequency proportional to the polymer length for the two activities

The synergistic action of the different activities increases the rate of degradation of the substrate. This can be quantified by comparing the time-evolution of the number-averaged chain length when using the enzymes separately and in cocktail as given by Figure 6. This criterion is given by the ratio of the two first moments ($\frac{m_1(t)}{m_0(t)}$).

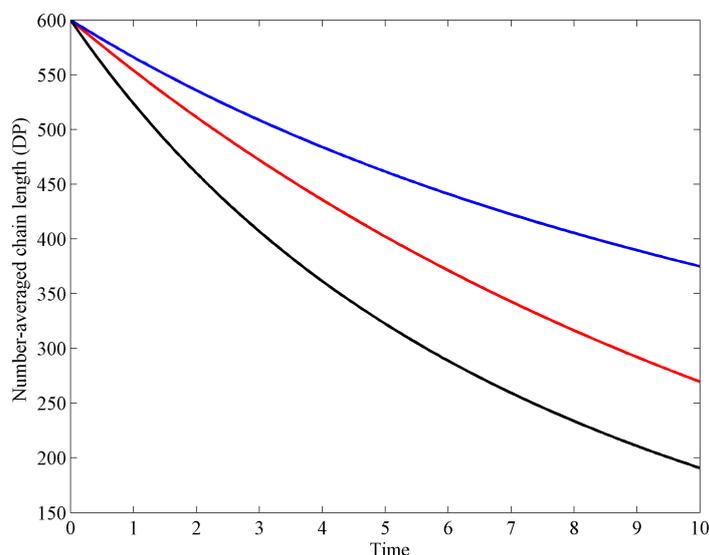


Figure 6: The number-averaged chain length for the three different cases: EG (blue line), CBH (red line) and EG-CBH (black line)

The number-averaged chain length decreases from an initial DP of 600 to 375 through the sole action of EG. The decrease reaches a DP of 275 when one considers the CBH activity only. The combination of the two activities affects considerably the number-averaged chain length. At the end of the time-process, the mean DP is only of 190. The repercussion of the combination of the different activities on the production of simple sugars is described in the next section.

3.4. Influence of the frequency formulation on the prediction of simple sugars

Figure 7 shows the evolution of cellobiose and glucose fractions during the hydrolysis by EG and CBH separately and in combination. The released cellobiose is transformed to glucose by the β -glucosidases. This last activity is modelled as a Michaelis-Menten type kinetic (equation 30).

In the case presented in Figure 7, the synergistic action has no incidence on the substrate converted curves. The fractions of glucose and cellobiose produced by EG and CBH independently and in cocktail are compared and there is no noticeable difference in the two cases. This is due mainly to the fact that, in one hand, the breakage frequency of EG is not high enough, as consequence, the total molar concentration at the end of the process is only 1.5 times greater than the initial molar concentration. In the other hand, the CBHs' breakage frequency depends on the chain length thus, the small chains produced by EG ($DP < 150$ in Figure

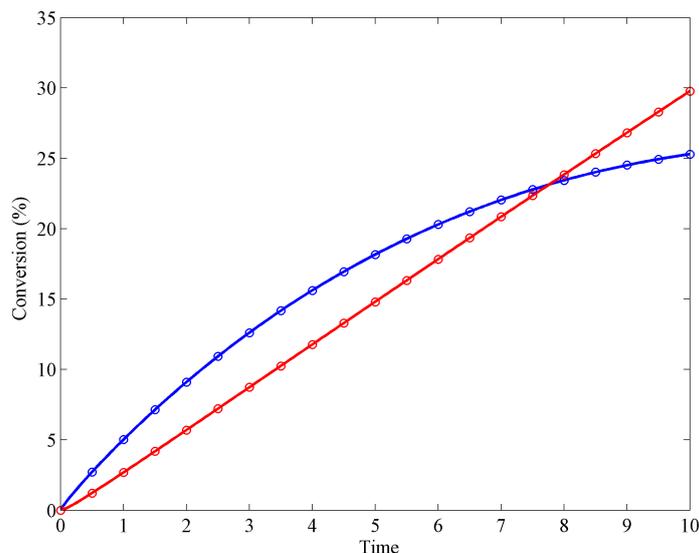


Figure 7: The time evolution of the converted fraction of the substrate into cellobiose (blue line) and glucose (red line). Continuous lines refer to the simple sugars produced by EG and CBH in cocktail while the circles represent the products of EG and CBH independently.

5) are less likely to be attacked than the larger ones. To prove this, we change Γ_{CBH} and set it constant which means that all the chains have the same probability to be attacked. Figure 8 gives the comparison between the independent action of EG and CBH and their combination in terms of total substrate converted fraction. Recall that Γ_{EG} is kept unchanged.

Figure 8 shows that the combination of EG and CBH enhances the cellulose hydrolysis rate in terms of simple sugar (cellobiose and glucose) concentrations. This Endo-Exo synergistic effect is explained by the appearance of new chains in the system due to the EG activity and, since they are equiprobably attacked by CBH, the cellobiose concentration is affected.

These two examples ($\Gamma_{CBH} = \alpha L$ and $\Gamma_{CBH} = constant$) reveal that for the best comprehension/interpretation of the enzymatic depolymerization process, information on the CLD evolution and the end-products kinetic rate are complementary and allow to distinguish the action of each enzyme family. On the opposite, the classical information on the kinetic rate of cellobiose/glucose release, easily reachable experimentally, is insufficient and leads to a misinterpretation of the substrate transformation process.

3.5. EG-CBH inhibition effect

In a batch reactor, the disintegration of the polymer chains by the cooperative action of the different cellulolytic activities leads to the accumulation of the end-products in the system (batch reactor). This causes the so-called inhibition effect since the enzymes are sensitive to their own product, inactive enzyme-product complexes are formed. As consequence, the enzymes activity slows down as reported in Figure 9

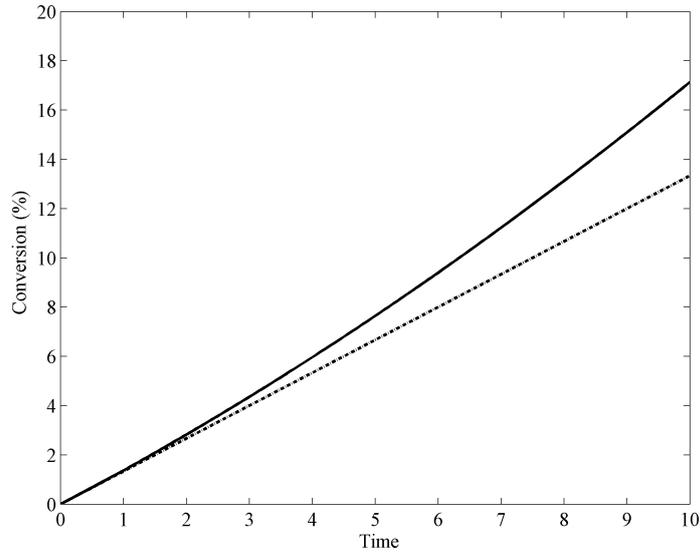


Figure 8: Time evolution of the converted fraction of the substrate into simple sugars (cellobiose + glucose). Comparison between the EG and CBH independent activities (dashed line) and their synergistic action (continuous line).

where the four first normalized moments of the CLD are compared in the two cases where the inhibition effect is incorporated in the model (equations 28 and 29) against the results of the model without inhibition effect.

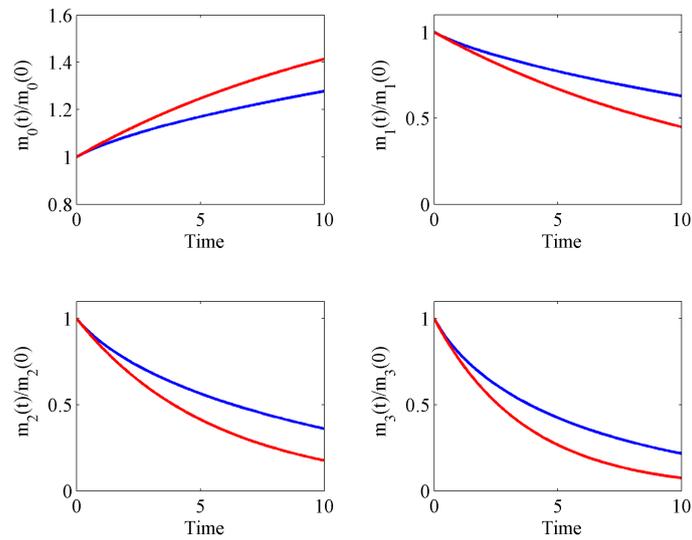


Figure 9: Comprison between the evolution of the four first normalized moments of the CLD undergoing combined action of EG and CBH without inhibition effect (red line) and with the inhibition effect (blue line)

The total molar concentration as well as the overall conversion rate (Figures 9 and 10) are affected. The parameters K_{EG} , K_{CBH} and K_P corresponding to the three main activities control the significance of the inhibition effect. Figure 10 is very similar to experimental results reported in literature and those shown in the experimental section of the second part of this study.

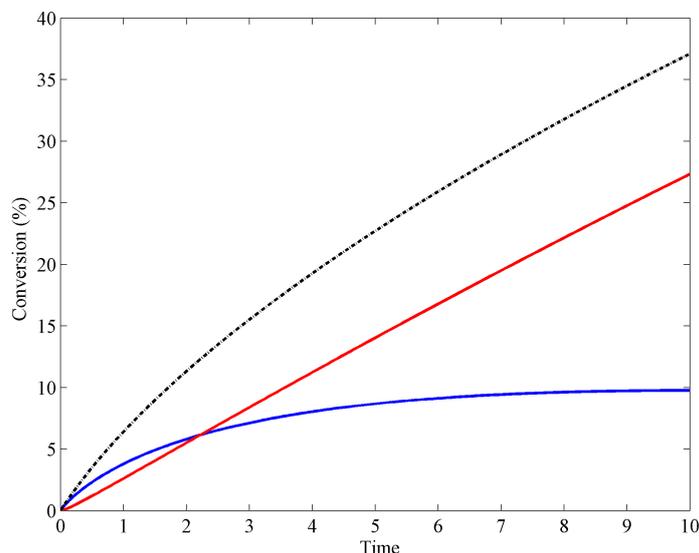


Figure 10: The time evolution of the converted fraction of the substrate into cellobiose (blue line), glucose (red line) and total simple sugars (dashed line) considering the inhibition effect for the three different activities

By introducing the inhibition effect, the formulation of the model is complete. The model parameters can be reached experimentally by fitting typical saccharification data in the specific case of depolymerization process. The model is built considering the elementary mechanisms of the three main cellulase activities on soluble polymers.

4. Conclusion

In this first part, a population balance model has been developed in the case of cellulose polymers degradation by the synergistic action of the cellulases. The three main cellulolytic actions are taken into account since they act differently with specific mechanisms. First, the general theoretical framework is developed in the case of enzymatic hydrolysis process. The random action of EG is assimilated to a pure breakage process when the CBH activity is modelled as an erosion phenomenon since it proceeds with a chain-end scission and produces cellobiose molecules.

Since the resolution of the PBE is computationally intensive, the Direct Quadrature Method of Moments is adopted. This resolution method based on the time tracking of a finite number of moments of the CLD has been validated against an analytical solution in the case of a specific breakage process. In a view to

future comparison with experimental data, the Maximum Entropy based method is coupled to DQMOM for a simultaneous reconstruction of the full CLDs during the PBE resolution. The β -glucosidase activity is modelled as a Michaelis-Menten type kinetic and incorporated to the PBE model.

First, the actions of EG and CBH activities are tested independently before their combination. The numerical results show that it is judicious to combine information on the CLD evolution and the end-products kinetic rate to interpret the synergistic action of the enzymes and distinguish the contribution of each activity and their mode of action. The incorporation of the inhibition effect is investigated in the last section since the accumulation of cellobiose and glucose affects substantially the enzymes activity.

The use of DQMOM resolution method coupled with the ME-based reconstruction technique reduces the computational time which didn't exceed few seconds in all the considered cases offering by the fact the possibility of incorporating the model in a global optimization loop for the determination of the model parameters based on experimental data.

Aknowledgments

The authors would like to thank *Toulouse White Biotechnology* and *Région Midi-Pyrénées* for their financial support.

Nomenclature

A	Square matrix of the linear system in DQMOM approach
a_i	First time derivative of the weights of the quadrature nodes
b_i	First time derivative of the product of the weighted abscissas
C_C	Cellobiose molar concentration
C_G	Glucose molar concentration
c_i	Weighted abscissas
d	Term source vector of the linear system in DQMOM approach
$f(x)$	Target probability density function
$f_M(x)$	Reconstructed probability density function
$H[f]$	Shannon entropy
k	Moments order
K_{CBH}	Inhibition constant of the CBH
K_{EG}	Inhibition constant of the EG
K_m	Parameter of the Michaelis-Menten type kinetic
K_P	Inhibition constant of the β -glucosidase
L	Polymer chain length
L_C	Cellobiose length
L_i	Abscissas of the quadrature nodes
$m_k(t)$	k^{th} order moment
$n(L, t)$	Number based chain length distribution
N	Number of quadrature nodes
$P(L)$	Polymer chain
$S_L(L, t)$	Source term of the PBE accounting for the breakage/erosion process
t	Time
V_m	Parameter of the Michaelis-Menten type kinetic
w_i	Weights of the quadrature nodes
x	Generic variable
x_{min}, x_{max}	Lower and upper boundaries of the reconstruction interval

Greek Symbols

$\beta(L, \lambda)$	Breakage kernel
$\beta_{EG}(L, \lambda), \beta_{CBH}(L, \lambda)$	Breakage kernel of EG an CBH respectively
$\Gamma(L)$	Breakage frequency
$\Gamma_{EG}(L), \Gamma_{CBH}(L)$	Breakage frequency of EG an CBH respectively
Γ^*	Gamma function
$\delta(L - L_i)$	Dirac delta function centered on L_i
θ	Second parameter of the Gamma distribution
κ	First parameter of the Gamma distribution
λ	Chain length longer than L
ξ_j	Lagrange's multipliers

Abbreviations

CBH	Cellobiohydrolase
CLD	Chain Length Distribution
DP	Degree of Polymerization
DQMOM	Direct Quadrature Method of Moments
EG	Endoglucanase
ME	Maximum Entropy
PBE	Population Balance Equation
PD	Product-Difference algorithm
PSD	Particle Size Distribution
RHS	Right Hand Side

Appendix A: The Monivariate Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM)

We give hereafter a succinct description of the Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM) applied for the population balance equation accounting for breakage processes, for more detail one can refer to the original work by Marchisio & Fox (2005).

The homogeneous monivariate PBE for breakage processes can be written in a compact form as:

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = S_L(L, t) \quad (\text{A.1})$$

where $S_L(L, t)$ is the source term due to the breakage, given in its explicit form in equation (1).

In the monivariate DQMOM approach, the continuous distribution function $n(L, t)$ is expressed as a discrete summation of Dirac delta functions (Marchisio & Fox, 2005):

$$n(L, t) = \sum_{i=1}^N w_i(t) \delta [L(t) - L_i(t)] \quad (\text{A.2})$$

where N is the number of delta functions (nodes i), L_i is the property of the node and w_i its weight. By substituting $n(L, t)$ by its discrete decomposition (equation A.2 in equation A.1), one obtains:

$$\sum_{i=1}^N \delta(L - L_i) \frac{\partial w_i}{\partial t} - \sum_{i=1}^N \delta'(L - L_i) w_i \frac{\partial L_i}{\partial t} = S_L(L, t) \quad (\text{A.3})$$

where $\delta'(L - L_i)$ is the first derivative of the delta function $\delta(L - L_i)$. By introducing the weighted abscissa c_i instead of the abscissa L_i (equation A.4),

$$c_i = w_i L_i \quad (\text{A.4})$$

and by setting :

$$\frac{\partial w_i}{\partial t} = a_i \quad \frac{\partial c_i}{\partial t} = b_i \quad (\text{A.5})$$

Marchisio & Fox (2005) reformulate the equation A.3 as :

$$\sum_{i=1}^N [\delta(L - L_i) + \delta'(L - L_i) L_i] a_i - \sum_{i=1}^N \delta'(L - L_i) b_i = S_L(L, t) \quad (\text{A.6})$$

The unknowns a_i and b_i are only time-dependent and are reachable by applying moment transformation. Hulburt & Katz (1964) defined the k^{th} integer moment of the distribution function $n(L, t)$ as:

$$m_k(t) = \int_0^\infty L^k n(L, t) dL = \sum_{i=1}^N w_i L_i^k \quad (\text{A.7})$$

The moment transformation (multiplying by L^k and integrating over L) is applied to equation A.6. The final equation is given as:

$$(1 - k) \sum_{i=1}^N L_i^k a_i + k \sum_{i=1}^N L_i^{k-1} b_i = \int_0^\infty L^k S_L(L, t) dL \quad (\text{A.8})$$

Considering the definition of S_L given in equation (1), the right hand side term of equation (A.8) now writes:

$$\int L^k S_L(L, t) dL = \int_0^\infty \int_0^\infty L^k \beta(L, \lambda) \Gamma(\lambda) n(\lambda, t) dL d\lambda - \int_0^\infty L^k \Gamma(L) n(L, t) dL \quad (\text{A.9})$$

Thus, equation (A.8) becomes :

$$(1 - k) \sum_{i=1}^N L_i^k a_i + k \sum_{i=1}^N L_i^{k-1} b_i = \sum_{i=1}^N \bar{b}_i^{(k)} \Gamma_i w_i - \sum_{i=1}^N L_i^k \Gamma_i w_i \quad (\text{A.10})$$

where

$$\bar{b}_i^{(k)} = \int_0^\infty L^k \beta(L, L_i) dL \quad (\text{A.11})$$

The system in equation A.10 can be written in a matrix form as :

$$Ax = d \quad (\text{A.12})$$

where A is a square matrix $(2N, 2N)$, x is the unknowns vector $(2N: a_1, \dots, a_N, b_1, \dots, b_N)$ and d is the term source vector $(2N)$. Thus, $2N$ moments ($k = 0, \dots, 2N - 1$) are needed to solve the system. Generally, DQMOM requires at least a three nodes quadrature ($N=3$) for an accurate tracking of the time evolution of the moments (Marchisio & Fox, 2005). The initial abscissas $L_i(0)$ and weights $w_i(0)$ are obtained using the Product-Difference algorithm (Gordon, 1968).

Appendix B: DQMOM validation in the case of breakage process

The DQMOM implementation was validated considering a normal law as initial CLD in the case where the PBE has analytical solution (Ziff & McGrady, 1985). In one hand, the time evolution of the CLD is known (see the analytical solution of the PBE for pure breakage process given in Lebaz et al. (2015b)), thus the moments $m_k(t)$ of the distribution can be easily derived (equation 2). In the other hand, DQMOM gives directly the time evolution of the CLD moments. The comparison between the two methods is given in the figure below:

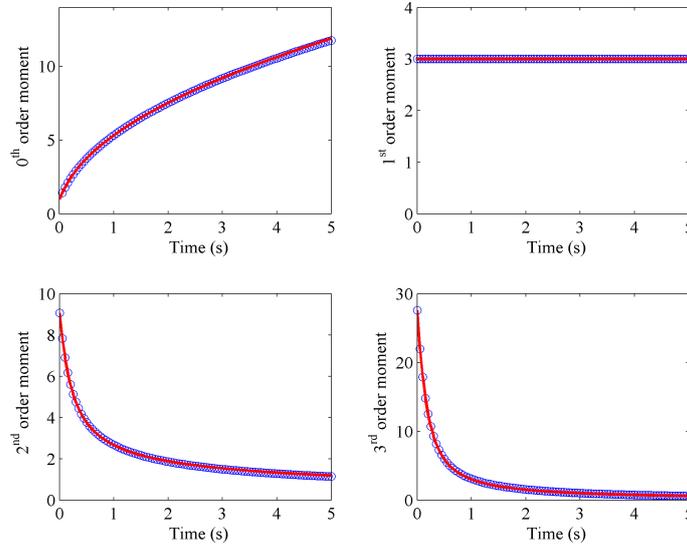


Figure B.11: The four first moments time-evolution of a normal size distribution calculated by DQMOM (circles) and analytical solution (continuous line). The parameters of the normal distribution are $\sigma = 0.25$ and $\mu = 3$.

In order to assess the error induced by DQMOM, we define the global error function as:

$$E(k) = \frac{|m_k - m_k^*|}{m_k^*} \quad (\text{B.1})$$

where m_k is the k^{th} order moment estimated via DQMOM and m_k^* the k^{th} order moment calculated via the analytical solution.

As we can see in figure B.11 , there is a good agreement between the moments calculated from the analytical solution and those estimated via DQMOM. The first order moment refers to the total chains length and remains constant within the time since the polymers are broken up but their total mass correlated with the total length is constant.

The figure B.12 represents the time evolution of the global error function $E(k)$ for the four first moments when using a quadrature with four nodes.

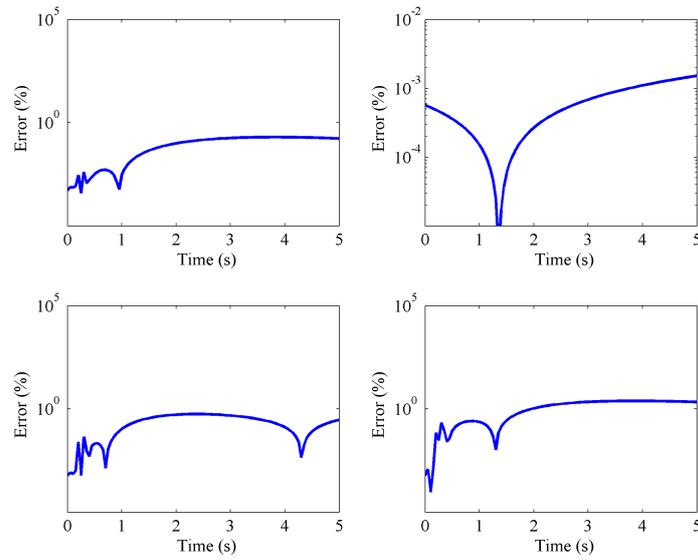


Figure B.12: The time evolution of the global error function $E(k)$ using a four nodes quadrature (eight first moments)

Appendix C: Supplementary data

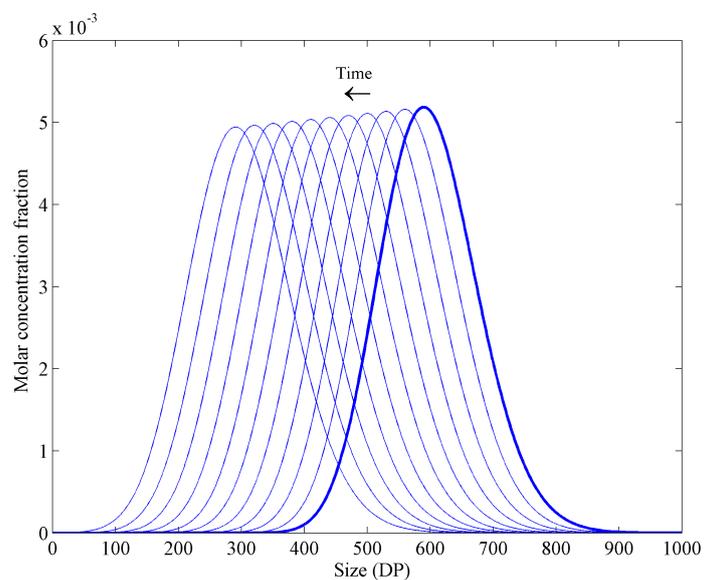


Figure C.13: The time evolution of the CLD undergoing CBH attacks with a constant erosion frequency

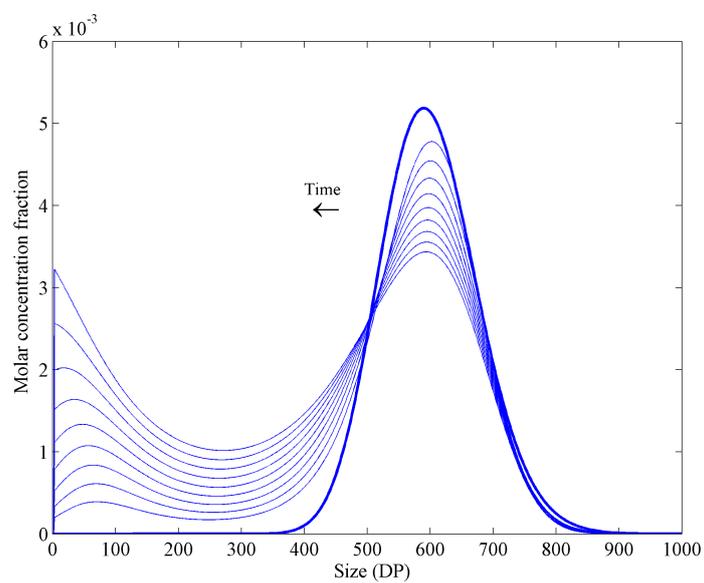


Figure C.14: The time evolution of the CLD undergoing EG attacks with a constant breakage frequency

References

- Andersen, N., Johansen, K. S., Michelsen, M., Stenby, E. H., Krogh, K. B. R. M., & Olsson, L. (2008). Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme and Microbial Technology*, *42*, 362–370. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022907003456>. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.11.018.
- Bansal, P., Hall, M., Realf, M. J., Lee, J. H., & Bommarius, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*, *27*, 833–848. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009001402>. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.06.005.
- Ding, A., Hounslow, M. J., & Biggs, C. A. (2006). Population balance modelling of activated sludge flocculation: Investigating the size dependence of aggregation, breakage and collision efficiency. *Chemical engineering science*, *61*, 63–74. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250905004410>.
- Fan, L. T., & Lee, Y.-h. (1983). Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnology and Bioengineering*, *25*, 2707–2733. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260251115/abstract>. doi:10.1002/bit.260251115.
- Gavriliadis, P. N., & Athanassoulis, G. A. (2009). Moment information for probability distributions, without solving the moment problem, II: Main-mass, tails and shape approximation. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, *229*, 7–15. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037704270800513X>. doi:10.1016/j.cam.2008.10.011.
- Gordon, R. G. (1968). Error Bounds in Equilibrium Statistical Mechanics. *Journal of Mathematical Physics*, *9*, 655–663. URL: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jmp/9/5/10.1063/1.1664624>. doi:10.1063/1.1664624.
- Gregg, D., & Saddler, J. (1995). Bioconversion of lignocellulosic residue to ethanol: Process flowsheet development. *Biomass and Bioenergy*, *9*, 287–302. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0961953495000976>. doi:10.1016/0961-9534(95)00097-6.
- Griggs, A. J., Stickel, J. J., & Lischeske, J. J. (2012a). A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics I: Depolymerization by EGI and CBHI. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*, 665–675. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.23355/abstract>. doi:10.1002/bit.23355.
- Griggs, A. J., Stickel, J. J., & Lischeske, J. J. (2012b). A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics II: Cooperative enzyme action, solution kinetics, and prod-

- uct inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 676–685. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.23354/abstract>. doi:10.1002/bit.23354.
- Gruno, M., Vljame, P., Pettersson, G., & Johansson, G. (2004). Inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulases by cellobiose is strongly dependent on the nature of the substrate. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 503–511. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.10838/abstract>. doi:10.1002/bit.10838.
- Ho, Y. K., Doshi, P., Yeoh, H. K., & Ngoh, G. C. (2014). Modeling chain-end scission using the Fixed Pivot technique. *Chemical Engineering Science*, 116, 601–610. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250914002528>. doi:10.1016/j.ces.2014.05.035.
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2011a). Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model. *biomass and bioenergy*, 35, 3830–3840. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411002315>.
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2011b). Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I: Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase. *Biomass and Bioenergy*, 35, 3841–3848. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953411002285>. doi:10.1016/j.biombioe.2011.04.026.
- Hulburt, H. M., & Katz, S. (1964). Some problems in particle technology: A statistical mechanical formulation. *Chemical Engineering Science*, 19, 555–574. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009250964850478>. doi:10.1016/0009-2509(64)85047-8.
- John, V., Angelov, I., ncl, A. A., & Thvenin, D. (2007). Techniques for the reconstruction of a distribution from a finite number of its moments. *Chemical Engineering Science*, 62, 2890–2904. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250907002072>. doi:10.1016/j.ces.2007.02.041.
- Jrgensen, H., Kristensen, J. B., & Felby, C. (2007). Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1, 119–134. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bbb.4/abstract>. doi:10.1002/bbb.4.
- Kostoglou, M. (2000). Mathematical analysis of polymer degradation with chain-end scission. *Chemical Engineering Science*, 55, 2507–2513. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250999004716>. doi:10.1016/S0009-2509(99)00471-6.
- Kumar, S., & Ramkrishna, D. (1996a). On the solution of population balance equations by discretization I. A fixed pivot technique. *Chemical Engineering Science*, 51, 1311–1332. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009250996884892>. doi:10.1016/0009-2509(96)88489-2.

- Kumar, S., & Ramkrishna, D. (1996b). On the solution of population balance equations by discretizationII. A moving pivot technique. *Chemical Engineering Science*, *51*, 1333–1342. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000925099500355X>. doi:10.1016/0009-2509(95)00355-X.
- Lebaz, N., Cockx, A., Sprandio, M., & Morchain, J. (2015a). Population balance approach for the modelling of enzymatic hydrolysis of cellulose. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *93*, 276–284. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cjce.22088/abstract>. doi:10.1002/cjce.22088.
- Lebaz, N., Cockx, A., Sprandio, M., & Morchain, J. (2015b). Reconstruction of a distribution from a finite number of its moments: a comparative study in the case of depolymerization process. *Computers & Chemical Engineering*, *Under revision*.
- Marchisio, D. L., & Fox, R. O. (2005). Solution of population balance equations using the direct quadrature method of moments. *Journal of Aerosol Science*, *36*, 43–73. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850204003052>. doi:10.1016/j.jaerosci.2004.07.009.
- McCoy, B. J., & Wang, M. (1994). Continuous-mixture fragmentation kinetics: particle size reduction and molecular cracking. *Chemical Engineering Science*, *49*, 3773–3785. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009250994001723>. doi:10.1016/0009-2509(94)00172-3.
- Mead, L. R., & Papanicolaou, N. (1984). Maximum entropy in the problem of moments. *Journal of Mathematical Physics*, *25*, 2404–2417. URL: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jmp/25/8/10.1063/1.526446>. doi:10.1063/1.526446.
- Mittal, A., Katahira, R., Himmel, M. E., Johnson, D. K., & others (2011). Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels*, *4*, 41. URL: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1754-6834-4-41.pdf>.
- Nopens, I., Biggs, C. A., De Clercq, B., Govoreanu, R., Wilen, B. M., Lant, P., & Vanrolleghem, P. A. (2002). Modelling the activated sludge flocculation process combining laser light diffraction particle sizing and population balance modelling(PBM). *Water Science & Technology*, *45*, 41–49. URL: <http://modeleau.fsg.ulaval.ca/fileadmin/modeleau/documents/Publications/pvr317.pdf>.
- Sin, G., Meyer, A. S., & Gernaey, K. V. (2010). Assessing reliability of cellulose hydrolysis models to support biofuel process designIdentifiability and uncertainty analysis. *Computers & chemical engineering*, *34*, 1385–1392. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135410000554>.
- South, C. R., Hogsett, D. A. L., & Lynd, L. R. (1995). Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, *17*, 797–803. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102299400016K>. doi:10.1016/0141-0229(94)00016-K.

- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, *83*, 1–11. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401002127>. doi:10.1016/S0960-8524(01)00212-7.
- Tagliani, A. (1999). Hausdorff moment problem and maximum entropy: A unified approach. *Applied Mathematics and Computation*, *105*, 291–305. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009630039810084X>. doi:10.1016/S0096-3003(98)10084-X.
- Van Dyk, J. S., & Pletschke, B. I. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes. Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, *30*, 1458–1480. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000687>. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.002.
- Wang, M., Smith, J. M., & McCoy, B. J. (1995). Continuous kinetics for thermal degradation of polymer in solution. *AIChE Journal*, *41*, 1521–1533. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.690410616/abstract>. doi:10.1002/aic.690410616.
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., & Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *115*, 1115–1126. URL: <http://link.springer.com/article/10.1385/ABAB%3A115%3A1-3%3A1115>. doi:10.1385/ABAB:115:1-3:1115.
- Xu, F., & Ding, H. (2007). A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: Contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects. *Applied Catalysis A: General*, *317*, 70–81. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926860X06007150>. doi:10.1016/j.apcata.2006.10.014.
- Yang, B., Willies, D. M., & Wyman, C. E. (2006). Changes in the enzymatic hydrolysis rate of Avicel cellulose with conversion. *Biotechnology and Bioengineering*, *94*, 1122–1128. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.20942/abstract>. doi:10.1002/bit.20942.
- Ziff, R. M., & McGrady, E. D. (1985). The kinetics of cluster fragmentation and depolymerisation. *Journal of Physics A: Mathematical and General*, *18*, 3027. URL: <http://iopscience.iop.org/0305-4470/18/15/026>. doi:10.1088/0305-4470/18/15/026.

V.1.2.6 Conclusion

Un modèle global comprenant les trois activités cellulolytiques principales est proposé. L'activité EG est traduite par une rupture binaire aléatoire des chaînes tandis que l'activité CBH est assimilée à un processus d'érosion aboutissant à la production du cellobiose. Le système d'équations final comprend une équation de bilan de population avec deux parties relatives à chacune des deux activités EG/CBH supplémenté d'une équation de conservation de la masse quantifiant le cellobiose produit. Au final, une équation de type Michaelis-Menten traduit l'activité BGL. Ce système d'équation est résolu avec la méthode DQMOM avec une reconstruction des distributions de taille en continu.

Les exemples donnés dans la partie [V.1.2.5](#) se basent sur une distribution de taille initiale suivant une fonction Gamma usuelle centrée sur un degré de polymérisation de 600 monomères (mode) et un écart type d'environ 77. La particule élémentaire caractéristique du phénomène d'érosion est le cellobiose qui a une taille de 2 monomères. Le noyau de rupture dans le cas de l'activité EG est formulée d'une façon continue ($\beta(x, x') = 2/x'$) malgré le fait qu'une particule élémentaire (taille < 2 monomères) ne peut pas physiquement être produite. Ce phénomène est négligeable dans notre cas (les tests l'ont confirmé) et la distribution reconstruite est tronquée pour des chaînes de taille inférieure à 2 monomères.

Dans le cas de l'activité CBH, les résultats (figure 2 de la partie [V.1.2.5](#)) montrent que la distribution de taille initiale glisse vers les petites taille en se resserrant avec une intensité qui augmente tout en conservant le nombre total des chaînes présentes dans le système. Cela est dû à la fréquence de rupture utilisée qui est proportionnelle à la taille des chaînes, ce qui signifie que les chaînes de taille élevée sont attaquées à une fréquence plus importante et voient leur taille diminuer plus rapidement que les chaînes de taille inférieure et finissent, de ce fait, par les rattraper, ce qui induit le comportement observé. La perte en masse des chaînes se retrouve sous forme de cellobiose et de glucose. Dans le cas de l'activité EG, la masse totale est conservée. La rupture aléatoire induit une augmentation du nombre total de chaînes dans le système avec de plus en plus de petites tailles (figure 4). La combinaison des deux activités (figure 5) couple les deux phénomènes et induit une accélération du processus de désintégration du substrat qui ne se traduit pas forcément par une production conséquente de sucres simples. En effet, la synergie (en terme de sucres simples) dépend des fréquences de rupture. Il s'agit là d'un résultat

majeur et pour tout dire assez inattendu de notre étude. Il montre clairement l'intérêt de la modélisation utilisée à des fins d'identification des modes d'action des enzymes. En dernier lieu, l'introduction de l'effet d'inhibition se traduit par le ralentissement de la transformation du substrat (figure 9).

Notons au final que l'utilisation de la méthode DQMOM avec reconstruction présente un gain conséquent en terme de temps de calcul comparée à la méthode des classes. En effet, les résultats montrés dans la partie [V.1.2.5](#) ont nécessité quelques secondes sur un ordinateur de bureau classique.

V.2 Résultats numériques dans le cas d'un substrat particulière

V.2.1 Introduction

Nous avons traité jusque-là le cas relativement simple de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat soluble où la fragmentation des chaînes celluloses quelque soit la nature de l'activité enzymatique considérée est indissociable de l'activité elle-même. Cette relation directe entre les deux processus induit une simplification considérable au niveau modélisation. En effet, le suivi de l'évolution de la distribution de taille des chaînes donne une indication directe sur le type et la fréquence des activités enzymatiques impliquées dans le processus de transformation du substrat.

Dans le cas d'un substrat particulière, la relation entre l'activité des enzymes et l'évolution de la distribution de taille des particules du substrat est plus subtile notamment en ce qui concerne l'activité EG. En effet, la différence considérable au niveau des échelles spatiales entre l'enzyme et la particule attaquée fait que l'attaque enzymatique n'induit pas une rupture de la particule mais celle d'une liaison glycosidique d'une chaîne accessible. L'égalité entre fréquence de coupure et activité enzymatique n'est plus valide. Sans avoir l'air, cette proposition nous oblige à repenser l'approche de modélisation de telle sorte à proposer un cadre global permettant de réconcilier les deux échelles spatiales.

L'approche proposée étant l'introduction de la notion de cohésion des particules celluloses. La rupture d'une particule survient lorsque la force exercée par les contraintes hydrodynamiques sur la particule est plus importante que la force de cohésion de cette

même particule. La force hydrodynamique peut être estimée via la puissance dissipée par le mélange et la force de cohésion est liée à la structure du substrat et à ses propriétés mécaniques. Nous avons choisi de modéliser l'évolution de la force de cohésion sous l'effet de l'activité EG en considérant que la rupture des chaînes conduisait à la fragilisation des particules. Ainsi, l'état d'une particule à un instant donné peut être caractérisé par le ratio de ces deux forces. La fragmentation des particules est modélisée comme étant un processus de rupture binaire aléatoire dont la fréquence est directement liée au ratio entre la force hydrodynamique et la force de cohésion qui décroît au cours du temps du fait de l'hydrolyse.

L'activité CBH libère des molécules de cellobiose quelque soit l'état du substrat. Elle est assimilée à un processus d'érosion des particules. Dans le cadre du formalisme du bilan de population, l'érosion est un cas particulier de la rupture caractérisée par la production d'une particule élémentaire de volume connu et constant. Dans le cas d'un substrat particulière, la subtilité réside dans le choix du volume élémentaire puisque la différence entre les tailles de la molécule de cellobiose et celle d'une particule du substrat est considérable ce qui, d'un point de vue numérique, est ingérable. De ce fait, le volume élémentaire dans ce cas n'est pas le volume d'une seule molécule de cellobiose mais d'un ensemble de molécules constituant un volume significatif d'un point de vue numérique et suffisamment petit comparé aux particules du substrat. L'activité β -glucosidase transformant le cellobiose en glucose est modélisée comme une cinétique michaelienne. Elle a lieu en milieu homogène.

V.2.2 Article 4 : Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose : II. Case of insoluble substrate

L'article est divisé en trois grandes parties : la première partie est dédiée aux développements théoriques nécessaires pour l'expression des différents phénomènes mis en place lors de l'hydrolyse enzymatiques d'un substrat particulière. Dans la deuxième partie, les résultats numériques sont discutés dans différents cas de figure. En dernier lieu, des résultats expérimentaux appuyant l'approche de modélisation sont exposés. Ces résultats sont obtenus en utilisant deux substrats cellulosiques ayant des granulométries initiales différentes. Ils visent à explorer la force de cohésion des particules de ces deux substrats d'une

part et leur comportement lors d'une hydrolyse enzymatique (évolution de la distribution de taille, cinétique de conversion en sucres simples) d'autre part.

Application of the Direct Quadrature Method of Moments for the modelling of the enzymatic hydrolysis of cellulose : II. Case of insoluble substrate

Noureddine Lebaz^{a,b,c,d}, Arnaud Cockx^{b,c,d}, Mathieu Spérandio^{b,c,d}, Jérôme Morchain^{b,c,d,*}

^aToulouse White Biotechnology (UMS INRA/INSA/CNRS), 3 rue Ariane, 31520 Ramonville Saint Agne, France

^bUniversité de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Rangueil, F-31077, Toulouse, France

^cINRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400, Toulouse, France

^dCNRS, UMR5504, F-31400, Toulouse, France

Abstract

In the second part of this study, the population balance model developed for the enzymatic hydrolysis of cellulose polymer chains has been extended to particulate cellulose substrates. In this case, the particle fragmentation process is complex. This phenomenon is induced by the hydrodynamic shear stress when the particle cohesion is lower than the hydrodynamic force. The particle cohesion depends on the mechanical properties of the substrate particles which are affected by the Endoglucanase (EG) activity that hydrolyses accessible glycosidic bonds all along the reaction. These two effects have been taken into account in the model. The Exoglucanase (CBH) activity is assimilated to an erosion process as in soluble substrates. The β -glucosidase activity as well as the inhibition effect are incorporated to the global population balance-based model. The numerical resolution of the population balance equation (PBE) is based on the Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM) coupled with the Maximum Entropy (ME) reconstruction technique. Numerical results in different cases show coherent prediction of the particle size distribution (PSD) evolution during hydrolysis reaction as well as the kinetics of simple sugar release. The modelling procedure is supported by experimental data which reveal the importance of the particles cohesion and its evolution during hydrolysis reaction.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, population balance, particulate substrate, cohesion force, hydrodynamic force

1. Introduction

The production of bio-ethanol and chemicals from lignocellulose-based materials has attracted extensive research over the last few decades. This growing interest on renewable energy sources and green chemistry is motivated by the environmental and socio-economic issues as well as the depletion of fossil fuels (Huang et al., 2011).

The fractionation of the biomass into its elementary constituents by means of hydrolytic enzymes is

*. Corresponding author. Address : INSA, LISBP, 135, avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France. Tel. : +33 56 155 9774; Fax : +33 56 155 9760

Email address: jerome.morchain@insa-toulouse.fr (Jérôme Morchain)

known as the most challenging step of the substrate transformation process, it directly controls the conversion rate/yield thus, significant efforts have been devoted to (i) the improvement of the substrate pretreatments through a better understanding of the physico-chemical properties of the biomass in order to enhance its digestibility (ii) the understanding of the enzymes hydrolysis elementary mechanisms for improving the hydrolytic potential of the cocktails and (iii) the elucidation and quantification of the factors affecting the enzymes performance and the substrate reactivity during the hydrolysis reaction. These three contributions are necessary before one can develop reliable models for the process design at industrial scale.

A typical enzymatic hydrolysis reaction kinetic shows an initial rapid rate followed by a progressive slow-down leading to a partial substrate conversion even at long-time reaction and/or high enzymes loading (Levine et al., 2010). This makes the process cost uncompetitive. The decreasing rate of the biomass transformation is attributed to a multitude of factors acting synergistically at different levels (Mansfield et al., 1999). Thus, the modelling of this process-step is particularly challenging especially when dealing with insoluble substrates which is mostly the case.

The enzymatic hydrolysis of particulate substrates is a heterogeneous multi-step reaction. The enzymes are first adsorbed onto the substrate surface by their Carbohydrate-Binding Module (CBM) before acting with their Catalytic Domain (CD) and hydrolyze the glycosidic bonds (Hilden & Johansson, 2004). As described in the first part, Michaelis-Menten type kinetic models are widely used for the modelling of this reaction (Bansal et al., 2009). In this approach, the complex substrates architecture is not taken into account and the only variable of interest is the substrate bulk concentration. In adsorption-based kinetic models, Langmuir isotherms are used to quantify the fraction of adsorbed cellulases onto the initial substrate (Kadam et al., 2004). As the substrate surface changes all along the reaction as well as other substrate structural features (e.g. crystallinity, accessibility), the cellulases adsorption kinetics are affected (Chauve, 2011). All these effects are often lumped into a single time-decreasing function (e.g. ratio, negative exponential function) (Kadam et al., 2004; Neto et al., 2013) referred as the *substrate reactivity* (R_s) which is introduced in the modelling to reflect the dynamic character of the process (Zheng et al., 2009). Such simplifications, in both Michaelis-Menten and adsorption type-kinetic models, affect the reliability of these models and thus their ability to predict the time-evolution of the substrate properties and its hydrolysability as reported by Sin et al. (2010). To overcome these issues, the structure of the model has to be rethought. It is certainly interesting to build a model in which the specific area of the substrate particles is accessible. This motivated, among other arguments, the choice of the population balance formalism.

In the first part of this study, a population balance approach has been developed for the modelling of the enzymatic degradation of cellulose polymer chains. The three main cellulolytic activities have been taken into account. The EG activity is assimilated to a random scission of the polymer chains while the CBH activity is modelled as an erosion process leading to the release of a specific product : cellobiose. The β -glucosidase activity is incorporated into the population balance model by the means of a Michaelis-Menten type kinetic. The Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM) (Marchisio & Fox, 2005) is preferred as solution

method of the PBE for its low computational cost and its ability to treat the case of multidimensional problems (i.e. when a particle has to be defined by more than one property). This method is coupled with the Maximum Entropy based technique for the reconstruction of the chain length distributions (CLDs) from the moments (Lebaz et al., 2015). The numerical implementation of the model has been validated first against an analytical solution of the PBE before testing the different activities independently and in combination. In addition of the very low computational cost (few seconds using a basic computer station), the model showed its potential to predict EG-CBH synergistic effect as well as the inhibition of the enzyme activities due to the accumulation of the end-products (simple sugars).

This second part is devoted to particulate substrates transformation. The general theoretical framework is unchanged. The PBM is extended to complex systems by rethinking how the different enzymatic activities are acting and degrading the substrate at the particulate scale. In particular, one has to consider now that an enzymatic attack does not imply the particle breakage but affects only its cohesion. The particle fragmentation is due to the hydrodynamic shear stress. After introducing the theoretical framework, numerical results are discussed in different cases and experimental data are given in order to support the model assumptions.

2. Theoretical framework

The population balance modelling is a common approach when dealing with particulate/dispersed systems undergoing space and/or phase transformation. In our case, cellulose particles are progressively transformed into simple sugars (cellobiose and glucose) by the cooperative action of the cellulases.

In the first part of this study, a population balance model is formulated and solved numerically in the case of pure soluble cellulose substrates. This second part focuses on insoluble/particulate substrates. Considering the particle volume v as the internal coordinate since it is the conservative variable, the following PBE (equation (1)) governs the evolution of the particle size distribution (PSD) in the specific case of a pure homogeneous fragmentation process :

$$\frac{\partial n'(v, t)}{\partial t} = \int_v^\infty \beta'(v, v') \Gamma'(v') n'(v', t) dv' - \Gamma'(v) n'(v, t) \quad (1)$$

where $n'(v, t)$ is the volume-based number density function, $\Gamma'(v)$ the breakage frequency for a particle of volume v , $\beta'(v, v')$ is the breakage kernel giving the probability of obtaining a particle of volume v from the breakup of a particle of volume v' with $v' > v$. The first term on the RHS accounts for the formation (birth) of particles with volume v resulting from the breakage of larger particles v' . The last term is the death term due to the loss of particles of volume v because of their disintegration.

Assuming that particle volum is proportional to its size, $v \propto L^3$ (whith L the particle size), equation (1) can be expressed in terms of particle length-based number density function $n(L, t)$ as (Marchisio et al., 2003) :

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = \int_L^\infty \beta(L, \lambda) \Gamma(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma(L) n(L, t) \quad (2)$$

To solve equation (2), numerical methods can be used. As described in the first part of this study, the DQMOM approach based on the time-tracking of a finite number of the PSD moments is adopted for its low computational cost and its robustness. This is of critical importance for the extension of the model to multivariate systems and/or the coupling with CFD codes. We recall below the physical meaning of the moments notion.

The k^{th} order moment of the PSD is defined as :

$$m_k(t) = \int_0^\infty L^k n(L, t) dL \quad (3)$$

The moments provide the main properties of the PSD. The zeroth order moment, $m_0(t)$, represents the molar concentration of the cellulose particles since $n(L, t)dL$ is the number of particles per volume having sizes between L and $L + dL$. The first order moment, $m_1(t)$, gives the total length of cellulose particles per volume unit. Average properties of the CLD can be derived from the moments such as the number-averaged particle size given by the ratio of the two first moments $m_1(t)/m_0(t)$ and the Sauter mean diameter $D_{32} = m_2(t)/m_1(t)$.

By applying the moment transformation of equation (2), we obtain the final moment transport equation below (for more detail, one can refer to the first part) :

$$(1 - k) \sum_{i=1}^N L_i^k a_i + k \sum_{i=1}^N L_i^{k-1} b_i = \sum_{i=1}^N \bar{b}_i^{(k)} \Gamma_i w_i - \sum_{i=1}^N L_i^k \Gamma_i w_i \quad (4)$$

where

$$\left\{ \begin{array}{l} a_i = \frac{\partial w_i}{\partial t} \\ b_i = \frac{\partial c_i}{\partial t} \\ c_i = w_i L_i \\ \bar{b}_i^{(k)} = \int_0^\infty L^k \beta(L, L_i) dL \end{array} \right. \quad (5)$$

$(L_i(t), w_i(t))$ are the abscissas and weights of the N Gaussian quadrature nodes. $(L_i(0), w_i(0))$ can be computed using the Product-Difference (PD) algorithm (Gordon, 1968) or any other algorithm (John & Thein, 2012). Equation (4) is similar to that developed in the first part, the only difference is on the formulation of the breakage parameters (breakage kernel and frequency). This will be fully discussed in the next section.

2.1. Breakage kernels formulation

Considering particulate substrate, the evolution of the PSD during the enzymatic hydrolysis reaction is due to the cooperative action of EG-CBH activities and the mixing effect.

The EG activity breaks up the glycosidic bonds of the surface accessible chains affecting by the way the cohesion of the particles and their mechanical properties. The combination of this activity and the hydrodynamic shear stress leads ultimately to the particles fragmentation. Thus, unlike the case of soluble substrate where the EG attacks produce new chains systematically, in the case of particulate substrate, the

fragmentation process is complex and both the EG activity and the mixing effect have to be taken into account. The CBH activity attacks the free chain-ends and produces cellobiose molecules. This activity can be seen as a surface erosion process similar as in soluble substrates. Starting from these considerations, the PSD evolution during the enzymatic hydrolysis process is modelled using the following PBE :

$$\frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = S_L^B(L, t) + S_L^{CBH}(L, t) \quad (6)$$

with

$$\begin{cases} S_L^B(L, t) &= \int_L^\infty \beta_B(L, \lambda) \Gamma_B(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_B(L) n(L, t) \\ S_L^{CBH}(L, t) &= \int_L^\infty \beta_{CBH}(L, \lambda) \Gamma_{CBH}(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{CBH}(L) n(L, t) \end{cases} \quad (7)$$

where β_B and β_{CBH} are the breakage kernels, Γ_B and Γ_{CBH} the breakage frequencies for EG/mixing and CBH respectively.

We discuss below the choice of the breakage kernels and frequencies in this specific case of particulate substrate.

2.1.1. EG activity and particle breakage

In the case of heterogeneous reactions, as discussed before, the fragmentation mechanism of the substrate particles is complex. The EG activity acts at a microscopic scale by cutting glycosidic linkages without leading necessarily to the breakage of the attacked particles. The structural features of the substrate particles and the hydrodynamic shear stress are to be taken into account when dealing with the PSD evolution during the hydrolysis reaction. With a mono-component substrate such as cellulose, one can consider that all the particles have the same structural characteristics (e.g. degree of crystallinity, porosity). Thus, the intrinsic breakage mechanism for a given particle may occur at any position of the particle surface. In other words, for an initial particle of size λ , all the possible sizes of the daughter particles (L and $\lambda - L$) have the same probability to be formed after the binary breakup of λ . This can be formulated by a uniform breakage kernel as in equation (8) (Marchisio et al., 2003).

$$\beta_B(\lambda^3, L^3) = 2(3L^2/\lambda^3) = 6L^2/\lambda^3 \quad (8)$$

The source term $S_L^B(L, t)$ in equation (7) can be explicitated as :

$$S_L^B(L, t) = 6L^2 \int_L^\infty \frac{1}{\lambda^3} \Gamma_B(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_B(L) n(L, t) \quad (9)$$

2.1.2. CBH activity : chain-end scission

The CBH activity, even for insoluble substrates, can be considered as an erosion process leading to a specific product which is the cellobiose molecules. In this case, an initial particle of volume v losses elementary

particles of volume v_c after CBH attacks (equation (10)).

$$P(v) \longrightarrow P(v - v_c) + P(v_c) \quad (10)$$

Thus, β_{CBH} in this specific case is set as an erosion kernel. Equations (11) and (12) give the time evolution of the particulate system under CBH attacks : equation (11) refers to the time evolution of the PSD when equation (11) accounts for the fraction transformed into simple sugar (kinetic of cellobiose concentration release).

$$\frac{\partial n'(v, t)}{\partial t} = \int_v^\infty \Gamma_{CBH}(v') \delta(v - (v' - v_c)) n(v', t) dv' - \Gamma_{CBH}(v) n(v, t) \quad (11)$$

$$\frac{\partial n'_c(t)}{\partial t} = \int_v^\infty \Gamma_{CBH}(v') \delta(v - v_c) n(v', t) dv' \quad (12)$$

The moment transformation of equations (9) and (11) is given in equation (4) in its general form. Equation (12) is to be included to the PBE solved by DQMOM after an appropriate moment transformation (see Appendix C of the first part of the study for more details).

2.2. Breakage frequencies formulation

Once the breakage kernels are properly defined for the two processes considering particulate substrates, the most challenging part is the formulation of the breakage frequencies Γ_B and Γ_{CBH} especially the first one.

For the CBH activity, whatever the nature of the substrate, a specific product is released after an effective attack. Thus, Γ_{CBH} returns exactly the CBH hydrolysis rate. Unlike Γ_{CBH} , Γ_B is function of the substrate nature/properties and the operating conditions. In the case of soluble substrate, the rate of breakage of the polymer chains defines the intrinsic activity of the EG. But with insoluble substrate, there is a strong dissociation between the EG hydrolysis rate and the particle volume/size evolution since the length-scales are different.

Substrate particle breakup phenomenon occurs when the hydrodynamic force F_H acting on the particle surface becomes higher than the cohesion force F_p of the particle itself. Thus, the ratio of the two forces $\frac{F_H}{F_p}$ is deterministic (Coufort & Line, 2003). The hydrodynamic force F_H is proportional to the particle surface and can be explicited in the case of spherical particles as (Douaire et al., 2011) :

$$F_H = \frac{5}{2} \eta \cdot G \cdot L^2 \quad (13)$$

where G is the shear rate (s^{-1}) and η the dynamic viscosity ($kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$).

The shear rate can be expressed as (Camp & Stein, 1943) :

$$G = \sqrt{\frac{\epsilon}{\nu}} \quad (14)$$

where ν is the kinematic viscosity ($m^2 \cdot s^{-1}$) and ϵ is the average turbulent energy dissipation rate ($W \cdot kg^{-1}$) which can be approximated via equation (15) below (Biggs & Lant, 2002) :

$$\epsilon = \frac{P}{\rho_f V} = \frac{N_p N_s^3 D^5}{V} \quad (15)$$

where P is the dissipated power by the mixing effect (W), ρ_f is the volumic mass of the fluid ($kg \cdot m^3$), N_p is the impeller power number, N_s the impeller speed ($r \cdot s^{-1}$), D is the impeller diameter (m) and V is the tank volume (m^3).

Thus, the hydrodynamic force F_H exerted on a particle of size L is explicited as :

$$F_H = \frac{5}{2} \rho_f \left(\frac{\nu N_p N_s^3 D^5}{V} \right)^{\frac{1}{2}} L^2 \quad (16)$$

The particle cohesion force F_p is related to its density and its size and quantifies the minimum force required to break up the particle. We propose to model this force as :

$$F_P = A \cdot \rho_p \cdot e^{-\theta \Gamma_{EG} \cdot t} \cdot L^\alpha, \quad \alpha \in [1, 3] \quad (17)$$

with A a constant, ρ_p is the density of the substrate particles ($kg \cdot m^3$), θ is a coefficient of fatigue related to the evolution of the substrate cohesion during the hydrolysis reaction, Γ_{EG} is the chains breakage frequency related to the EG activity and α is the fractal dimension giving an information on the shape of the substrate particles.

The expression (17) gives the time evolution of the cohesion force of a particle of size L which decreases at the rate ($e^{-\theta \Gamma_{EG} \cdot t}$) since the substrate is submitted to the EG activity which modifies progressively its structure and mechanical properties. Finally, the breakage frequency of the substrate particles is expressed as :

$$\Gamma_B = \varphi \cdot \frac{F_H}{F_p} \quad (18)$$

whith φ a constant.

The particles breakage frequency Γ_B is proportional to the ratio of the hydrodynamic and the cohesion forces. If $F_H > F_p$, the ratio is larger than 1 and the breakage phenomenon is accelerated. If one substitutes in equation (18) the two forces by their expressions (equations (16) and (17)), this leads to the equation :

$$\Gamma_B = \varphi \cdot \frac{\rho_f \left(\frac{\nu N_p N_s^3 D^5}{V} \right)^{\frac{1}{2}} L^2}{A \cdot \rho_p \cdot e^{-\theta \Gamma_{EG} \cdot t} \cdot L^\alpha} = B(t) \cdot L^{2-\alpha} \quad (19)$$

The expression of the breakage frequency in equation (19) is coherent with the previous works on the breakage processes induced by both the hydrodynamic shear stress and the cohesion of the particles especially in the case of flocculation process which has been fully studied using experimental and numerical approaches based mainly on the population balance formalism (Spicer & Pratsinis, 1996; Nopens et al., 2002; Ding et al.,

2006). In all these works, the breakage frequency is set equal to $(B \cdot v_i^a)$. The specificity of our case is the time-dependant of the factor of proportionality $B(t)$ since the state of the substrate at the particle scale changes all along the hydrolysis reaction. This coefficient conveys an information on the *age* of the substrate. This is not the case when dealing with flocs for example since their cohesion is constant within the time and depends only on their size.

2.3. The EG and CBH inhibition effect

As in the case of soluble substrates, one has to take into account the inhibition effect since the cellulases are highly sensitive to the accumulation of the simple sugars in the system (Xiao et al., 2004). The procedure adopted here is to introduce inhibition constants for both EG and CBH activities and to express the breakage frequencies of these two activities as functions of the cellobiose concentration (equations (20) and (21)). Thus, the breakage frequencies decrease by the accumulation of cellobiose.

$$\Gamma_{EG} = \Gamma_{EG_0} \times \frac{K_{EG}}{C_c(t) + K_{EG}} \quad (20)$$

$$\Gamma_{CBH} = \Gamma_{CBH_0} \times \frac{K_{CBH}}{C_c(t) + K_{CBH}} \quad (21)$$

where $C_c(t)$ is the cellobiose concentration, K_{EG} and K_{CBH} are the inhibition constants for EG and CBH respectively, Γ_{EG_0} and Γ_{CBH_0} are the intrinsic EG and CBH activities respectively.

2.4. The β -glucosidase activity

Michaelis-Menten type kinetic model is adopted for the modelling of the β -glucosidase activity which transforms cellobiose into glucose. A competitive inhibition by the accumulation of glucose is incorporated as shown in equation (22).

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{V_m C_c}{K_m \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right) + C_c} \quad (22)$$

where C_G is the glucose concentration, K_m and V_m the Michaelis-Menten parameters, K_P the inhibition constant for the β -glucosidase activity.

Equation (23) summarizes the system of equations solved simultaneously to track the PSD evolution under cellulase activities and hydrodynamic shear stress effect as well as the converted fraction into cellobiose and glucose. This system includes the fragmentation and the erosion processes in the first PBE, the accumulation of cellobiose in the second PBE and finally the accumulation of glucose in the third Michaelis-Menten kinetic

equation.

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial n(L, t)}{\partial t} = 6L^2 \int_L^\infty \frac{1}{\lambda^3} \Gamma_B(\lambda) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_B(L) n(L, t) \\ \quad + \int_L^\infty \Gamma_{CBH}(\lambda) \delta(L - (\lambda - L_C)) n(\lambda, t) d\lambda - \Gamma_{CBH}(L) n(L, t) \\ \frac{\partial C_C(t)}{\partial t} = \int_L^\infty \Gamma_{CBH}(\lambda) \delta(L - L_C) n(\lambda, t) d\lambda - \frac{1}{2} \frac{dC_G(t)}{dt} \\ \frac{dC_G(t)}{dt} = \frac{2V_m C_C}{K_m \left(1 + \frac{C_G}{K_P}\right) + C_C} \end{array} \right. \quad (23)$$

The numerical resolution of the system (23) is carried out using a DQMOM approach coupled with a reconstruction technique based on the maximum entropy (ME) theory. The *ode45* integrator of MATLAB is used under a work-station comprising of an Intel[®] Core[™]i7-3740QM CPU with a clock speed of 2.7 GHz and 16 GB of installed memory (RAM).

3. Experimental procedure

3.1. Materials

Microcrystalline celluloses (Avicel PH-102 and Avicel PH-105) were provided by FMC BioPolymer (USA). These are pure insoluble cellulose substrates with mean sizes of 90 and 20 μm respectively (data from the supplier). They have been chosen for their notable different initial sizes and their comparable physico-chemical properties mainly the cristallinity, as reported in literature (Kleinebudde, 1997; Jumaa et al., 2000). The cellulase enzyme used in this study was a commercial *Trichoderma reesei* cellulase preparation (Celluclast 1.5L) from Sigma-Aldrich (Germany). The cocktail contains the main cellulase activities : EG, CBH and β -glucosidases.

3.2. Enzymatic hydrolysis

The hydrolysis of the substrates was carried out in 50 mM sodium acetate buffer (pH=4.8) at 40 ° C. Sodium azide NaN_3 (0.1%) was supplemented to inhibit microbial growth during the reactions. For all the experiments, a 500 mL glass tank with a water jacket was used. The rotational speed was fixed to 200 rpm using a blade mixer (4 inclined blades, 5 cm diameter, 45 ° angle). The substrate loadings were fixed to 1% (w/v) and those of cellulases to 30 FPU/g substrate. Samples were withdrawn and boiled for 10 mn to stop the enzymatic hydrolysis. The samples are, then, centrifuged at 2000 g for 10 mn. The supernatants were analyzed to reach the simple sugar concentrations while the solid fraction was diluted for size distribution analysis as described hereafter.

The yield of the enzymatic conversion of Avicel PH-102 and Avicel PH-105 to simple sugars (cellobiose and glucose) was calculated as (Khodaverdi et al., 2012) :

$$\text{Yield (\%)} = \frac{[\text{Glucose (g/L)} + \text{Cellobiose (g/L)} \times 1.053] \times 0.9}{\text{Cellulose (g/L)}} \times 100 \quad (24)$$

3.3. Particle size distribution determination

The PSDs evolution during the enzymatic hydrolysis reactions were determined through laser diffraction analyses using a Mastersizer 2000 Hydro, Malvern Instruments Ltd. This *ex-situ* technique is based on the conversion of the detected scattered light into a particle size distribution thanks to the Mie's theory thus, the refractive index of the substrate particles is needed. Analysis are conducted using diluted samples with respect to the recommended obscuration rate. The results are given in terms of volume fraction histograms distributed following a geometric sequence with a first term $u_0 = 0.01\mu m$ and a common ratio $r = 1.1482$. The repeatability of the results has been taken into account.

3.4. Mechanical resistance of the substrate particles

The mechanical resistance of the initial substrate particles was explored using an ultrasonic bath (Ultrasonic Cleaning Unit Elmasonic S 60 (H), Elma Schmidbauer GmbH, Germany) having an operating frequency of 37 kHz. Diluted solutions are prepared in bechers which are placed in the bath for 5 minutes. The ultrasound effect on the substrate particles is revealed by the PSD analysis.

3.5. Sugar analysis

Quantitative detection of simple sugars was achieved using high performance liquid chromatography (HPLC) on an Ultimate 3000 Dionex separation system equipped with a BioRad Aminex HPX 87H affinity column and a refractive index detector (Thermo Scientific). The separation of product species was performed in H_2SO_4 (5 mM) solution at $40^\circ C$ and a flow rate of 0.3 mL/min.

4. Results and discussion

4.1. Numerical results

For numerical illustration of the potential of the PB-based model, we assume that the initial PSD follows a normal law (equation (25)) with (μ, σ) its mean and standard deviation respectively.

$$n(L, 0) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(L-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (25)$$

Numerically, the parameters of the initial distribution are fixed as $\mu = 70\mu m$ and $\sigma = 5\mu m$. We discuss hereafter the numerical results given by the PBM resolution considering the different cellulolytic activities and the particle fragmentation processes. For the sake of clarity and brevity, we report only the main results in each case.

4.1.1. CBH activity

The CBH activity is assimilated to a surfacic erosion process leading to the detachment of elementary particles. The complexity in the case of insoluble substrates is the large difference between the substrate particle size (micron scale) and the elementary particle size (cellobiose with a sub-nanometer scale). Thus, numerically this considerable gap in terms of size scales is unmanageable since it generates digital noise. The idea here is to consider sufficiently small elementary particles released via the erosion process compared to the substrate particles. Thus, an elementary particle is not produced with one CBH attack but it is a result of a multitude of attacks which are gathered to produce a significant fragment volume in order to make sense numerically to this process. In our case, the size of the elementary particle produced by the erosion process is fixed to $0.2 \mu\text{m}$. This size is sufficiently small compared to the mean size of the substrate particles and at this scale, a large panel of analytical devices are ineffective since they cannot track simultaneously the size of the large particles and the sub-micron ones.

Since the larger particles have more chance to be attacked because of their important external surface area, the frequency of the erosion process is set proportional to L^2 .

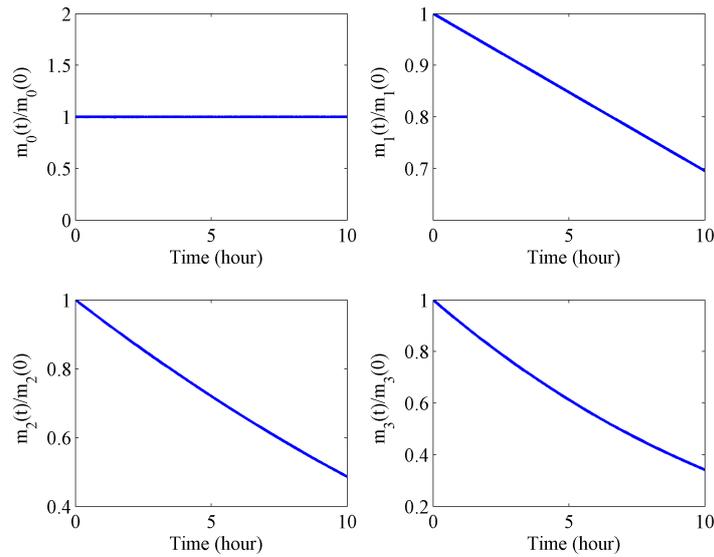


FIGURE 1: The time-evolution of the four first reduced moments of the initial distribution in which the particles are undergoing CBH attacks.

We give in the two first figures the results obtained considering the erosion process only. Figure 1 gives the time-evolution of the four first reduced moments of the initial PSD. The zeroth order moment giving the concentration of the substrate particles is constant since no new particles are appearing in the system, the existing ones are becoming smaller thus, the first/second/third moments related respectively to the total length/surface/volume of the particles decrease continuously. Figure 2 shows the time-evolution of the initial PSD undergoing erosion process. The initial PSD expressed here as a number density function shifts toward

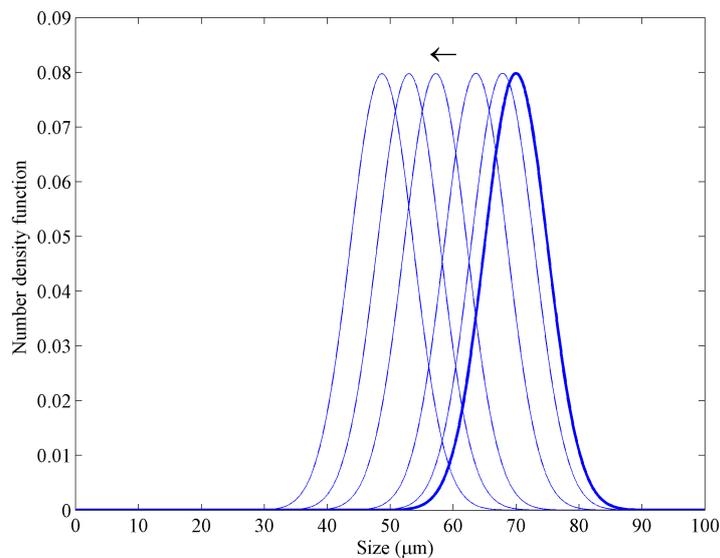


FIGURE 2: The time-evolution of the initial PSD undergoing CBH attacks. The PSDs from right to left correspond respectively to the times $t = 0, 1, 3, 6, 8$ and 10 hours of hydrolysis.

the small sizes without any deformation since the concentration of the particles is kept unchanged, the decrease of the volume of the substrate particles is counterbalanced by the increase of the concentration of the simple sugars thus, the mass balance is conserved.

4.1.2. EG activity and fragmentation process

For the particle fragmentation process, the breakage frequency is set proportional to the particle size L which means that the factor α is set equal to one. Furthermore, to initialize the resolution procedure, the hydrodynamic force F_H is estimated using the operating conditions explicated in the experimental procedure section. The cohesion force $F_p(t = 0)$ satisfies the relation $\frac{F_H}{F_p(t=0)} < 1$ which means that initially, the cohesion of the particles is greater than the hydrodynamic shear stress. In this case, the initial breakage frequency is minimal.

The aim of this study is not the accurate estimation of the cohesion force and its evolution within the process time. For this, specific protocols as those used in comminution processes to determine the density distribution of fracture energies (Crespo, 2011; Frances & Lin, 2014) have to be explored. Our purpose is to develop a modelling framework in which all these considerations can be easily taken into account and incorporated to a global optimization procedure.

Unlike the hydrodynamic force which is constant within the process time, the cohesion force decreases progressively since the substrate particles are attacked by the enzymes. We give an illustration of the fragmentation process in figures 3 and 4.

The evolution of the four first reduced moments given in the Figure 3 shows an initial slow rate as

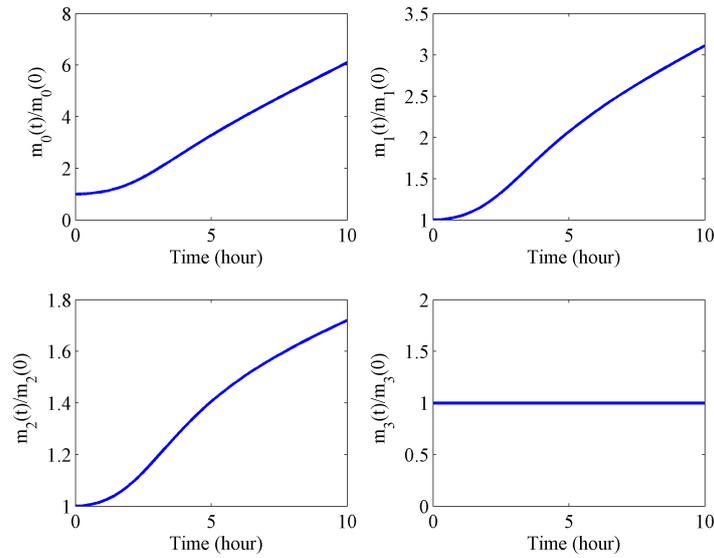


FIGURE 3: The time-evolution of the four first reduced moments of the initial distribution in which the particles are undergoing a pure fragmentation process.

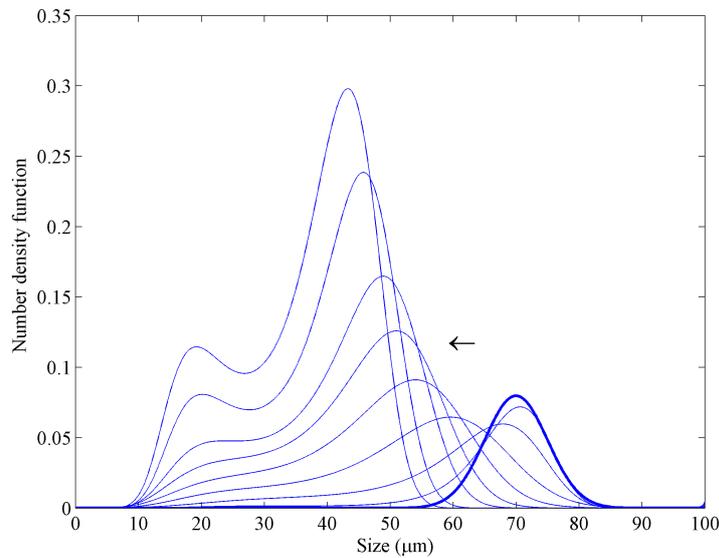


FIGURE 4: The time-evolution of the initial PSD undergoing a pure fragmentation process. The PSDs from right to left correspond respectively to the times $t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8$ and 10 hours of hydrolysis.

the cohesion force is important before an accelerating phase. The concentration of the particles increases considerably (zeroth order moment) as well as the total surface of the particles (second order moment). The total volume is kept unchanged (third order moment) since the fragmentation process is conservative.

The reconstruction of the PSDs from the moments using the ME technique in this case is illustrated in

Figure 4. Within the time, new particles more and more numerous and smaller are formed by the fragmentation of the larger ones. The initial PSD shifts toward the small sizes with a substantial shape deformation. Since the fragmentation frequency is proportional to the particle size, the rate of transformation of the larger particles is high compared to that of small ones.

4.1.3. Fragmentation process coupled with EG-CBH activities

In enzymatic hydrolysis reactions, the enzyme activities are combined with the hydrodynamic shear stress effect for an efficient transformation of the complex biomass matrix into fermentable sugars. The combination of the pure fragmentation and the erosion processes in a global model is an essential step for the modelling of this reaction.

In this case, the frequency of the erosion process is kept proportional to the particle surface (L^2) and the fragmentation frequency proportional to the particle size (L). The substrate fraction converted to cellobiose by the CBH activity is transformed into glucose by the β -glucosidase activity. The inhibition effect is introduced for the three different activities. The results are illustrated in the figures 5, 6, 7 and 8.

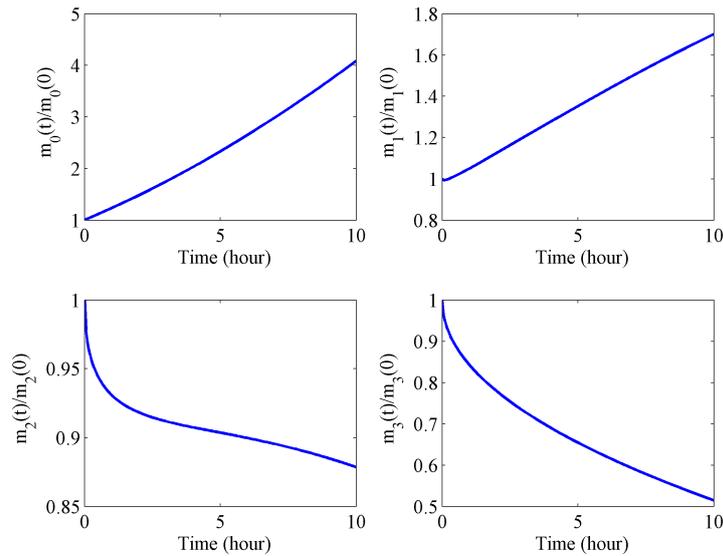


FIGURE 5: The time-evolution of the four first reduced moments of the initial distribution in which the particles are undergoing a pure fragmentation and erosion process simultaneously.

The time evolution of the moments of the initial PSD (Figure 5) shows a continuous increase of the particle concentration due to the fragmentation process in one hand and a decrease of the total volume of the substrate thanks to the erosion process in the other hand. The substrate conversion kinetic is given in Figure 8. In the Figure 6, the initial PSD undergoing fragmentation and erosion processes is transformed all along the reaction. The accumulation of the small particles formed after the desintegration of the large ones is becoming more and more important.

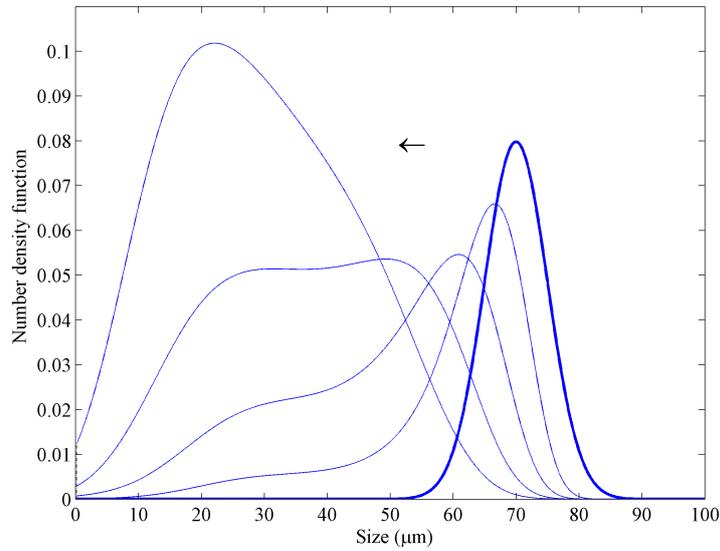


FIGURE 6: The time-evolution of the initial PSD undergoing both pure fragmentation and erosion processes. The PSDs from right to left correspond respectively to the times $t = 0, 1, 3, 6$ and 10 hours of hydrolysis.

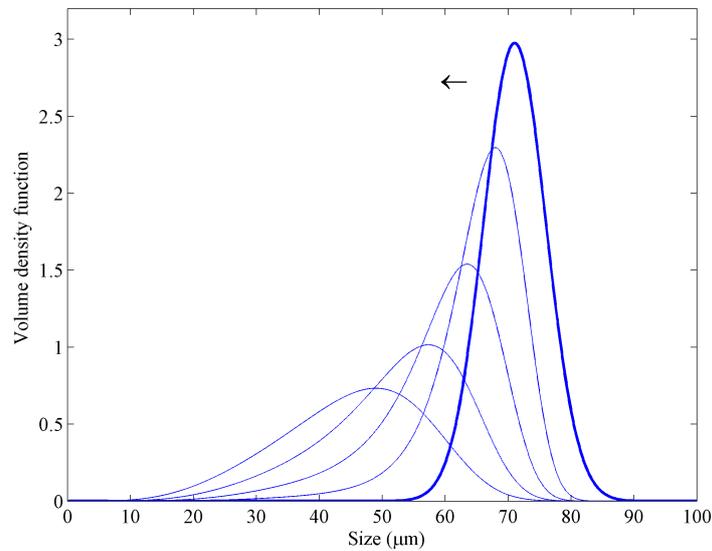


FIGURE 7: The time-evolution of the initial volume-based density distribution undergoing both pure fragmentation and erosion processes. The distributions correspond from right to left respectively to the times $t = 0, 1, 3, 6$ and 10 hours of hydrolysis.

Since the conservative variable in the case of particulate substrates is the particle volume, we give in Figure 7 the evolution of the volume based density function during hydrolysis reaction derived from the evolution of the number density function (Figure 6) assuming the sphericity of the particles. Recall that this assumption has been formulated in the theoretical framework section in order to transform the PBE written

in terms of volume-based density function into number density function based PBE. As we can see in Figure 7, a tail toward the small sizes is formed as a consequence of the fragmentation process and the intensity of the initial distribution decreases all along the reaction time because of the erosion process.

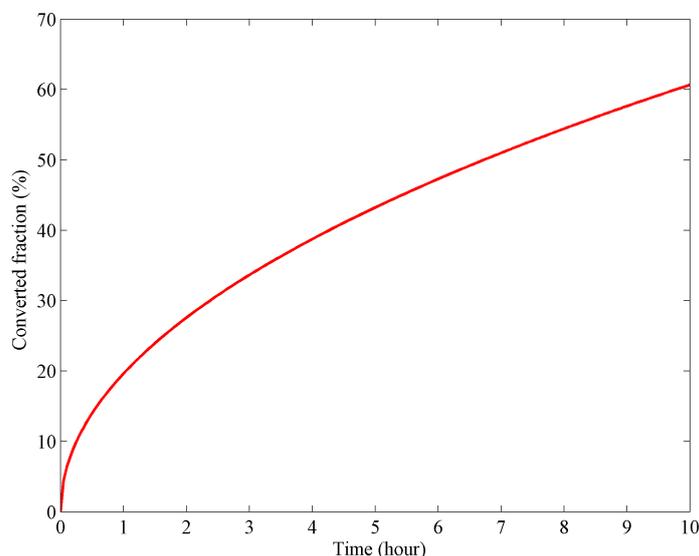


FIGURE 8: Evolution of the converted fraction of the substrate into simple sugars in the case of EG-CBH activities with the inhibition effect

The kinetic of transformation of the substrate into simple sugars (Figure 8) shows a rapid initial phase followed by a progressive decreasing rate step. The slowdown of the kinetic of sugar release is due to the inhibition effect : the accumulation of the simple sugars affects negatively the enzyme activities. This typical profile is in agreement with the experimental results as it will be discussed in the next section.

4.2. Experimental results

In this section, we give some experimental results obtained using particulate cellulose (Avicel PH-102 and Avicel PH-105) submitted to enzymatic hydrolysis under the conditions commonly used in literature. The experiments described below aim to support our modelling approach such as the importance of the substrate structure and the evolution of the physical properties of the substrates during the hydrolysis reaction. The population balance framework developed in this contribution is based on these considerations which is not the case for Michaelis-Menten based kinetic models widely used in literature.

4.2.1. Mechanical properties of the substrates

The two different substrates used in this study (Avicel PH-102 and Avicel PH-105) have different initial PSDs. Solutions from these substrates are prepared with the same loading (1% w/v) and sonicated during 5 mn. The PSDs before and after sonication are measured using the laser diffraction analyser for each substrate. The results are given in figures 9 and 10.

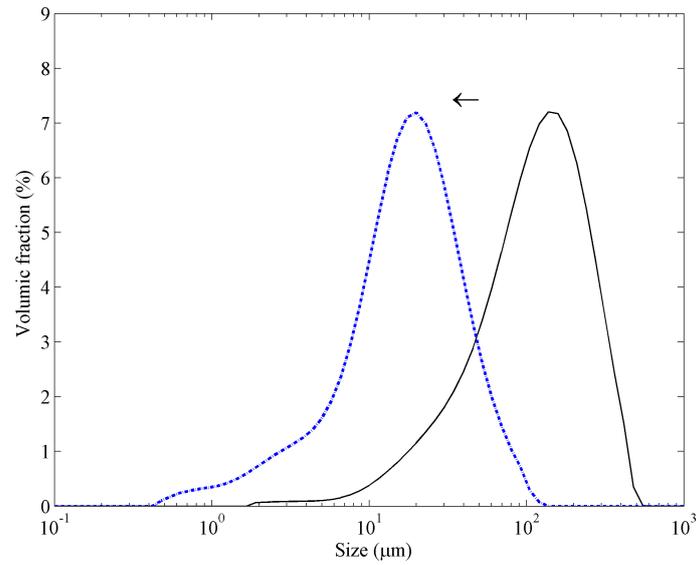


FIGURE 9: Ultrasound effect on the particle size distribution of Avicel PH-102 determined using laser diffraction analysis : Initial PSD (continuous line) and PSD after sonication (dashed line).

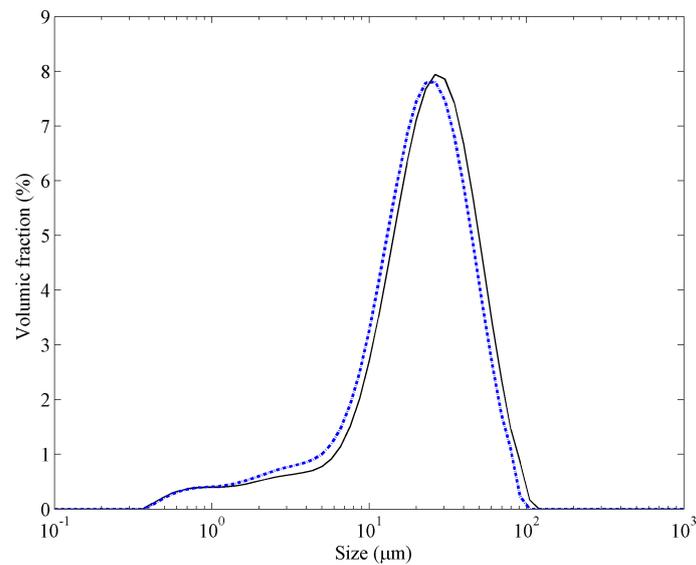


FIGURE 10: Ultrasound effect on the particle size distribution of Avicel PH-105 determined using laser diffraction analysis : Initial PSD (continuous line) and PSD after sonication (dashed line).

The figures 9 and 10 reveal a substantial different behaviour of the two substrates against sonication. The PSD of Avicel PH-102 initially centered around a mean size of $D_{43}(t_i) = 140\mu\text{m}$ shifts completely toward small sizes thus, after 5 minutes of sonication, the new PSD is centered around $D_{43}(t_f) = 22\mu\text{m}$ (Figure 9). This means that the substrate particles are sensitive to the sonication dissipated energy. This

energy is sufficient to affect the cohesion of the particles and leads ultimately to their disintegration into smaller particles. The behavior of Avicel PH-105 is definitely different. The PSD is minimally affected by the sonication (Figure 10), its mean size changes from $D_{43}(t_i) = 30\mu\text{m}$ to $D_{43}(t_f) = 28\mu\text{m}$. This gives an indication on the cohesion force of the substrate particles which is sufficiently high to face the sonication energy which is not the case for Avicel PH-102.

This simple test shows the importance of the cohesion force of the substrate particles when dealing with particulate systems. Thus, even the two substrates are pure cellulose with comparative crystallinity index, their mechanical resistance is substantially different. This means that their behaviour during the enzymatic hydrolysis reaction will be also completely different since the cohesion of the substrate particles will be distinctly affected by both the hydrodynamic shear stress as well as the enzyme activities. This will be confirmed in the next section.

4.2.2. Enzymatic hydrolysis of Avicel PH-102 and Avicel PH-105

The enzymatic hydrolysis reactions have been conducted for 24 hours using the two different substrates in the same conditions. The evolution of the PSDs as well as the conversion into simple sugars have been tracked all along the reactions. The results are given in the figures 11, 12 and 13.

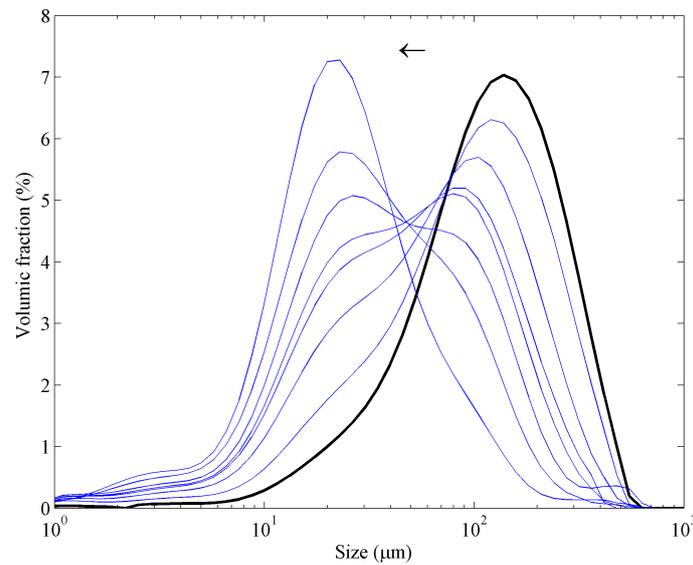


FIGURE 11: Particle size distribution evolution during the enzymatic hydrolysis of Avicel PH-102. The distributions from right to left correspond respectively to the times $t = 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8$ and 24 hours of hydrolysis.

As expected, the PSD of Avicel PH-102 shows a spectacular evolution all along the reaction as given by Figure 11. The initial PSD goes progressively to the small sizes : larger particles are broken up and form new small particles more and more numerous. After 24 hours of hydrolysis, the final PSD is completely dissociated from the initial one. The mean size of the substrate particles moves from $D_{43}(t_i) = 140\mu\text{m}$ to

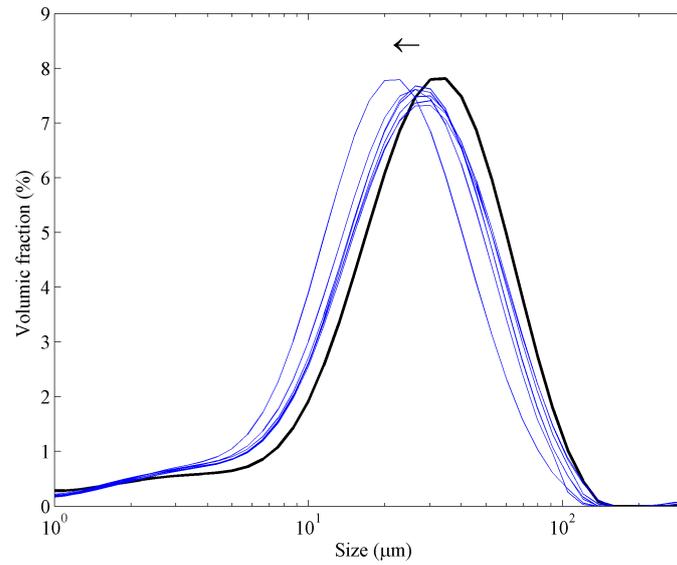


FIGURE 12: Particle size distribution evolution during the enzymatic hydrolysis of Avicel PH-105. The distributions from right to left correspond respectively to the times $t = 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8$ and 24 hours of hydrolysis.

$D_{43}(t_f) = 33\mu\text{m}$. The total converted fraction in this time interval is around 25%.

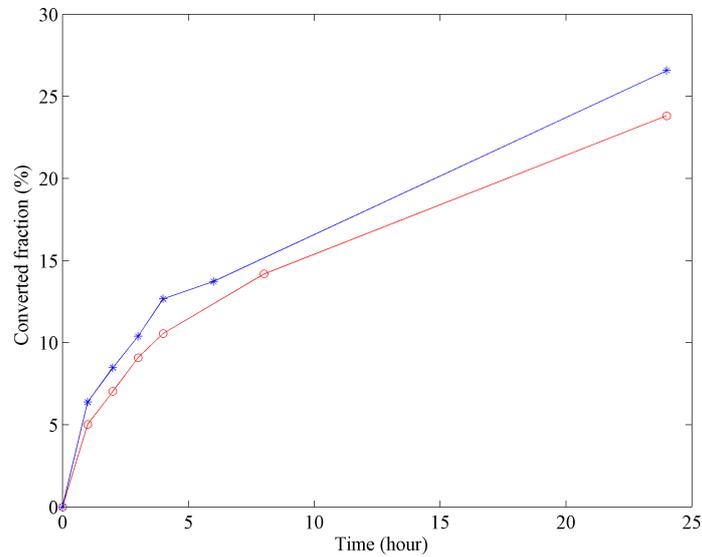


FIGURE 13: Experimental substrate converted fraction evolution during enzymatic hydrolysis of Avicel PH-102 (red circles) and Avicel PH-105 (blue stars).

In the case of Avicel PH-105, the evolution of the PSD is not significant compared to that of Avicel PH-102. Indeed, the mean size of the substrate particles decreases from $D_{43}(t_i) = 30\mu\text{m}$ to just $D_{43}(t_i) = 24\mu\text{m}$

in 24 hours of hydrolysis (Figure 12) but the kinetic of simple sugars release follows exactly that of Avicel PH-102 as shown in Figure 13. The examination of the Figure 12 shows that with the slight translation of the initial PSD into small sizes, the global shape is conserved. This can be explained by the high cohesion force of the substrate particles thus, the erosion process is dominating.

The results of the enzymatic hydrolysis reactions corroborate those discussed in the previous section where the sonication effect has been explored. The physical properties of the two substrates used in these experiments are significantly different. These results support our modelling approach in which a cohesion force has been proposed in order to manage the behavior of the particulate system submitted to the hydrodynamic shear stress in one hand and to the cellulolytic activities on the other hand. This allows the tracking of the PSD evolution as well as the kinetic of the simple sugars release all along the hydrolysis reaction which is not the case with the classical modelling approaches. Indeed, as discussed before, when using Michaelis-Menten based kinetic models, the variable is the substrate concentration. Thus, the evolution of the substrate properties cannot be predicted and the only output is the conversion rate.

Furthermore, if we examine the conversion kinetics of the two substrates (Figure 13), we note that they are surprisingly similar. Starting from a global information on the granulometry of the two substrates, since the enzymatic hydrolysis reactions are heterogenous catalytic processes, one expects that the conversion of Avicel PH-105 would be substantially higher than that of Avicel PH-102. This is motivated by the fact that, for the same substrate concentration, the total surface developed by the Avicel PH-105 particles is higher than that developed by the Avicel PH-102 particles. The high converted fraction in the case of Avicel PH-102 is explained by its mechanical properties which allow significant transformation of the PSD during the reaction (Figure 11). The constant translation of the initial PSD toward small sizes induces the generation of new accessible surface and boosts by the way the conversion rate. This shows the importance of having access to the PSD evolution in parallel with the conversion rate to be able to interpret the results of hydrolysis reactions appropriately.

5. Conclusion and perspectives

In this study, the case of particulate substrates is explored. The population balance approach developed initially for the soluble substrates has been extended to insoluble substrates since these systems are ubiquitous when dealing with enzymatic hydrolysis reactions.

The transition to the particulate substrates brings additional challenges since the particle fragmentation process is dissociated from the intrinsic cellulolytic activities which was not the case when dealing with soluble substrates especially in the case of EG activity. In fact, the action of the EG activity on a cellulose chain induces automatically the breakup of this chain and the formation of two smaller chains. In the case of an insoluble cellulose particle, the action of the EG activity leads to the breakage of an accessible glycosidic bond without the fragmentation of the particle. This activity affects the structural features of the substrate particles mainly their cohesion force. Thus, the fragmentation process has been modelled by taking into

account the dynamic evolution of this cohesion force and the hydrodynamic shear stress. The CBH activity is still considered as an erosion process since it leads to a specific product even in particulate substrates. The novelty here is the formulation of the breakage kernel which has been rethought since the length scales are extremely distinct between the cellobiose molecules and the substrate particles. The β -glucosidase activity is modelled as a michaelian kinetic and the inhibition effect has been incorporated for the different cellulolytic activities. The population balance equation has been solved numerically using the Direct Quadrature Method of Moments (DQMOM) coupled with the Maximum Entropy reconstruction technique.

The numerical tests in different cases show a consistent results for both the fragmentation and the erosion processes. The population balance model predicts the evolution of the substrate initial PSD and the conversion rate. The experimental results obtained by the sonication test confirm the importance of the mechanical properties of the cellulose particles. The two different substrates tested present distinct behaviours against this assay. Avicel PH-102 is extremely sensitive to the ultrasounds which induce a severe fragmentation process while Avicel PH-105 is minimally affected. The enzymatic hydrolysis reactions conducted with identical conditions show the same results. The particle size distribution of Avicel PH-102 evolves along the reaction which is poorly the case of that of Avicel PH-105 but the conversion rates are similar. These experimental tests support the modelling approach and point to the importance of the coupling between the PSD evolution and the conversion rate for a judicious interpretation of the hydrolysis reaction results.

The dynamic character of the cohesion force of the substrate particles which can be characterized by the notion of the *age* of the substrate intervenes in our case in the formulation of the breakage frequency of the substrate particles. The introduction of this notion as a new variable leading to a multivariable population balance model would be of great importance for process considerations. This allows the monitoring of the sequential addition of the substrate for example. Finally, the added value of the modelling approach presented in this contribution is its possible extension for multivariable systems without losing its robustness. In fact, the Direct Quadrature Method of Moments is the appropriate framework for such a task.

Acknowledgments

The authors would like to thank *Toulouse White Biotechnology* and *Région Midi-Pyrénées* for their financial support.

Nomenclature

A	Constant appearing in the cohesion force
$B(t)$	Parameter of the breakage frequency
a_i	First time derivative of the weights of the quadrature nodes
b_i	First time derivative of the product of the weighted abscissas
C_C	Cellobiose molar concentration
C_G	Glucose molar concentration
c_i	Weighted abscissas
D	Impeller diameter
F_H	Hydrodynamic force
F_p	Particle cohesion force
G	Shear rate
k	Moments order
K_{CBH}	Inhibition constant of the CBH
K_{EG}	Inhibition constant of the EG
K_m	Parameter of the Michaelis-Menten type kinetic
K_P	Inhibition constant of the β -glucosidase
L	Particle size
L_i	Abscissas of the quadrature nodes
$m_k(t)$	k^{th} order moment
$n(L, t)$	Number based particle size distribution
$n'(v, t)$	Volume based particle size distribution
N	Number of quadrature nodes
N_p	Impeller power number
N_s	Impeller speed
P	Dissipated power
$S_L^B(L, t)$	Source term of the PBE accounting for the pure breakage process
$S_L^{CBH}(L, t)$	Source term of the PBE accounting for the erosion process
t	Time
v	Particle volume
V	Tank volume
v_c	Volume of the elementary particle for the erosion process (m^3)
V_m	Parameter of the Michaelis-Menten type kinetic
w_i	Weights of the quadrature nodes

Greek Symbols

α	Exponent
β_B	Breakage kernel
β_{CBH}	Erosion kernel
$\delta(v - v_c)$	Dirac delta function centered on v_c
ϵ	Average turbulent energy dissipation rate
φ	Coefficient of the breakage frequency
Γ_B	Particle breakage frequency
Γ_{CBH}	Erosion frequency for CBH activity
Γ_{CBH_0}	Intrinsic erosion frequency for CBH activity
Γ_{EG}	Chains breakage frequency for EG activity
Γ_{EG_0}	Intrinsic chains breakage frequency for EG activity (t^{-1})
λ	Particle size
μ	Mean of the PSD
ν	Kinematic viscosity
η	Dynamic viscosity
ρ_f	Volumic mass of the fluid
ρ_p	Volumic mass of the substrate particles
σ	Standard deviation
θ	Coefficient of particle's fatigue

Abbreviations

CBH	Cellobiohydrolase
CBM	Carbon-Binding Module
CD	Catalytic Domain
CLD	Chain Length Distribution
DQMOM	Direct Quadrature Method of Moments
EG	Endoglucanase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ME	Maximum Entropy
PBE	Population Balance Equation
PD	Product-Difference algorithm
pH	Potentail of hydrogen
PSD	Particle Size Distribution
Rs	Substrate reactivity

References

- Bansal, P., Hall, M., Realff, M. J., Lee, J. H., & Bommarius, A. S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*, 27, 833–848. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009001402>. doi :10.1016/j.biotechadv.2009.06.005.
- Biggs, C. A., & Lant, P. A. (2002). Modelling activated sludge flocculation using population balances. *Powder Technology*, 124, 201–211. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591002000177>.
- Camp, T. R., & Stein, P. C. (1943). Velocity gradients and internal work in fluid motion. *Journal of the Boston Society of Civil Engineers*, 85, 219–37. URL : <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=168348&indexSearch=ID>.
- Chauve, M. (2011). *Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats cellulosiques*. Ph.D. thesis INSA, Toulouse. URL : <http://www.theses.fr/2011GRENV066/abes>.
- Coufort, C., & Line, A. (2003). Forces on spherical particles in terms of upstream flow characteristics. *Chemical Engineering Research and Design*, 81, 1206–1211. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876203724186>.
- Crespo, E. F. (2011). Application of particle fracture energy distributions to ball milling kinetics. *Powder Technology*, 210, 281–287. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591011001458>.
- Ding, A., Hounslow, M. J., & Biggs, C. A. (2006). Population balance modelling of activated sludge flocculation : Investigating the size dependence of aggregation, breakage and collision efficiency. *Chemical engineering science*, 61, 63–74. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250905004410>.
- Douaire, M., Mercade, M., Morchain, J., & Loubiere, P. (2011). A unique phenotypic modification of *Lactococcus lactis* cultivated in a Couette bioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 108, 559–571. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22974/full>.
- Frances, C., & Lin, A. (2014). Comminution process modeling based on the monivariate and bivariate direct quadrature method of moments. *AIChE Journal*, 60, 1621–1631. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.14358/full>.
- Gordon, R. G. (1968). Error bounds in equilibrium statistical mechanics. *Journal of Mathematical Physics*, 9, 655–663. URL : <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jmp/9/5/10.1063/1.1664624>.
- Hilden, L., & Johansson, G. (2004). Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology letters*, 26, 1683–1693. URL : <http://link.springer.com/article/10.1007/s10529-004-4579-8>.
- Huang, R., Su, R., Qi, W., & He, Z. (2011). Bioconversion of Lignocellulose into Bioethanol : Process Intensification and Mechanism Research. *BioEnergy Research*, 4, 225–245. URL : <http://link.springer.com/article/10.1007/s12155-011-9125-7>. doi :10.1007/s12155-011-9125-7.

- John, V., & Thein, F. (2012). On the efficiency and robustness of the core routine of the quadrature method of moments (QMOM). *Chemical Engineering Science*, *75*, 327–333. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000925091200187X>.
- Jumaa, M., El Saleh, F., Hassan, I., Mller, B. W., & Kleinebudde, P. (2000). Influence of cellulose type on the properties of extruded pellets. Part I. Physicochemical characterisation of the cellulose types after homogenisation. *Colloid and Polymer Science*, *278*, 597–607. URL : <http://link.springer.com/article/10.1007/s003960000292>.
- Kadam, K. L., Rydholm, E. C., & McMillan, J. D. (2004). Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnology progress*, *20*, 698–705. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp034316x/full>.
- Khodaverdi, M., Jeihanipour, A., Karimi, K., & Taherzadeh, M. J. (2012). Kinetic modeling of rapid enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose after pretreatment by NMMO. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *39*, 429–438. URL : <http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-011-1048-y>.
- Kleinebudde, P. (1997). The crystallite-gel-model for microcrystalline cellulose in wet-granulation, extrusion, and spheronization. *Pharmaceutical research*, *14*, 804–809. URL : <http://link.springer.com/article/10.1023/A:1012166809583>.
- Lebaz, N., Cockx, A., Sprandio, M., & Morchain, J. (2015). Reconstruction of a distribution from a finite number of its moments : a comparative study in the case of depolymerization process. *Computers & Chemical Engineering*, *Under revision*.
- Levine, S. E., Fox, J. M., Blanch, H. W., & Clark, D. S. (2010). A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, *107*, 37–51. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22789/full>.
- Mansfield, S. D., Mooney, C., & Saddler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology progress*, *15*, 804–816. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp9900864/full>.
- Marchisio, D. L., & Fox, R. O. (2005). Solution of population balance equations using the direct quadrature method of moments. *Journal of Aerosol Science*, *36*, 43–73. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021850204003052>.
- Marchisio, D. L., Pikturna, J. T., Fox, R. O., Vigil, R. D., & Barresi, A. A. (2003). Quadrature method of moments for population-balance equations. *AIChE Journal*, *49*, 1266–1276. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.690490517/abstract>.
- Neto, J. M., dos Reis Garcia, D., Rueda, S. M. G., & da Costa, A. C. (2013). Study of kinetic parameters in a mechanistic model for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse subjected to different pretreatments. *Bioprocess and biosystems engineering*, *36*, 1579–1590. URL : <http://link.springer.com/article/10.1007/s00449-013-0930-6>.
- Nopens, I., Biggs, C. A., De Clercq, B., Govoreanu, R., Wilen, B. M., Lant, P., & Vanrolleghem, P. A. (2002). Modelling the activated sludge flocculation process combining laser light diffraction particle sizing and population

balance modelling(PBM). *Water Science & Technology*, 45, 41–49. URL : <http://modeleau.fsg.ulaval.ca/fileadmin/modeleau/documents/Publications/pvr317.pdf>.

Sin, G., Meyer, A. S., & Gernaey, K. V. (2010). Assessing reliability of cellulose hydrolysis models to support biofuel process design identifiability and uncertainty analysis. *Computers & chemical engineering*, 34, 1385–1392. URL : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135410000554>.

Spicer, P. T., & Pratsinis, S. E. (1996). Coagulation and fragmentation : Universal steady-state particle-size distribution. *AIChE Journal*, 42, 1612–1620. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.690420612/full>.

Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D. J., & Saddler, J. N. (2004). Effects of sugar inhibition on cellulases and -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. In *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 47, 2003, in Breckenridge, CO* (pp. 1115–1126). Springer. URL : http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-837-3_90.

Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., & Jenkins, B. M. (2009). Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnology and bioengineering*, 102, 1558–1569. URL : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.22197/full>.

V.2.3 Conclusion

Dans cette deuxième partie de l'article consacré à l'utilisation de la méthode des moments pour la modélisation de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose, l'extension du modèle de bilan de population au cas d'un substrat particulaire est traitée. Ce cas caractéristique de la plupart des substrats naturels amène des difficultés supplémentaires au niveau modélisation. En effet, la fragmentation des particules est dissociée de l'activité enzymatique comme il a été mentionné précédemment.

Le processus de fragmentation est la conséquence des contraintes hydrodynamiques exercées sur les particules du substrat. Ces particules peuvent être caractérisées par leur force de cohésion qui détermine leur comportement face aux contraintes hydrodynamiques. Les propriétés mécaniques des particules évoluent durant l'hydrolyse enzymatique du fait des attaques EG. Ces différents aspects sont pris en compte dans la modélisation lors de la formulation du noyau et de la fréquence de rupture des particules. De même, l'activité CBH est assimilée à un phénomène d'érosion des particules. Les résultats numériques obtenus dans les différents cas considérés (fragmentation, érosion et combinaison des deux processus) sont cohérents. Le processus de fragmentation pure induit une forte évolution de la distribution de taille des particules avec l'apparition de plus en plus de particules de petites tailles tout en préservant le volume total. Le processus d'érosion aboutit quant à lui au déplacement de la distribution de taille initiale vers les petites tailles sans aucune déformation. La perte en masse accompagnant cette évolution donne accès à la cinétique de production du cellobiose. La combinaison des deux processus accélère la transformation du substrat. Notons que l'activité β -glucosidase ainsi que le phénomène d'inhibition ont été pris en compte. La résolution via DQMOM couplée avec la technique de reconstruction basée sur le maximum d'entropie se fait en un temps très raisonnable (quelques secondes).

Les résultats expérimentaux obtenus avec le passage aux ultrasons des deux types de substrats (Avicel PH-102 et Avicel PH-105) confirment l'importance de la cohésion des particules. En effet, les deux substrats ont un comportement complètement différent vis à vis de la sonication. La distribution de taille des particules d'Avicel PH-102 se décale complètement vers les petites tailles après 5 minutes de sonication. L'énergie reçue par les particules est suffisante pour les casser et les fragmenter en particules plus petites. De leur côté, les particules d'Avicel PH-105 sont très peu sensibles aux ultrasons, la distribution de taille reste quasiment identique avant et après sonication. Ainsi, malgré

le fait que la composition des deux substrats est identique, leurs propriétés mécaniques sont différentes d'où la justesse d'introduire la notion de cohésion des particules pour pouvoir gérer l'évolution de la distribution de taille. Ces résultats sont confirmés par les expériences d'hydrolyse enzymatique. En effet, la distribution de taille des particules d'Avicel PH-102 évolue d'une façon significative au cours de l'hydrolyse contrairement à celle de l'Avicel PH-105. Pourtant, les cinétiques de conversion en sucres simples sont quasiment identiques. L'Avicel PH-105 ayant une taille moyenne initiale beaucoup plus petite que l'Avicel PH-102, la surface développée est plus importante à même quantité de substrat, ainsi nous nous attendions à une conversion plus rapide, ce qui n'est pas le cas. Cela s'explique par l'évolution rapide de la distribution de taille des particules d'Avicel PH-102 ce qui génère une surface accessible de plus en plus importante et de ce fait une conversion comparable à celle de l'Avicel PH-105. Cela montre à quel point le suivi simultané de l'évolution de la distribution de taille et de la cinétique de conversion peut aider à mieux interpréter les résultats des expériences d'hydrolyse enzymatique. Ces informations ne sont accessibles que via une modélisation basée sur le formalisme du bilan de population.

En dernier lieu, il faut souligner que le caractère dynamique de la force de cohésion des particules peut être géré d'une façon plus appropriée en introduisant une dimension supplémentaire au bilan de population qui pourrait être l'*âge* des particules à titre d'exemple. Cela permettrait de prendre en compte des aspects jusque-là inaccessibles via la modélisation classique tel que l'ajout séquentiel de substrat. L'atout de la démarche de modélisation proposée dans cette contribution réside dans la robustesse de l'approche DQMOM et sa souplesse pour une extension aux problèmes multivariés.

V.3 Résultats expérimentaux

Avant d'attaquer la partie expérimentale, il nous semble important de rappeler l'objectif de cette partie et comment elle s'articule avec la partie modélisation amplement décrite jusque-là. La figure V.2 est un schéma global récapitulatif illustrant les deux grandes parties de ce travail avec les différentes sous-parties.

La partie expérimentale est dédiée à l'acquisition d'une base de données fiable regroupant aussi bien la caractérisation physique du substrat à savoir l'évolution de sa distri-

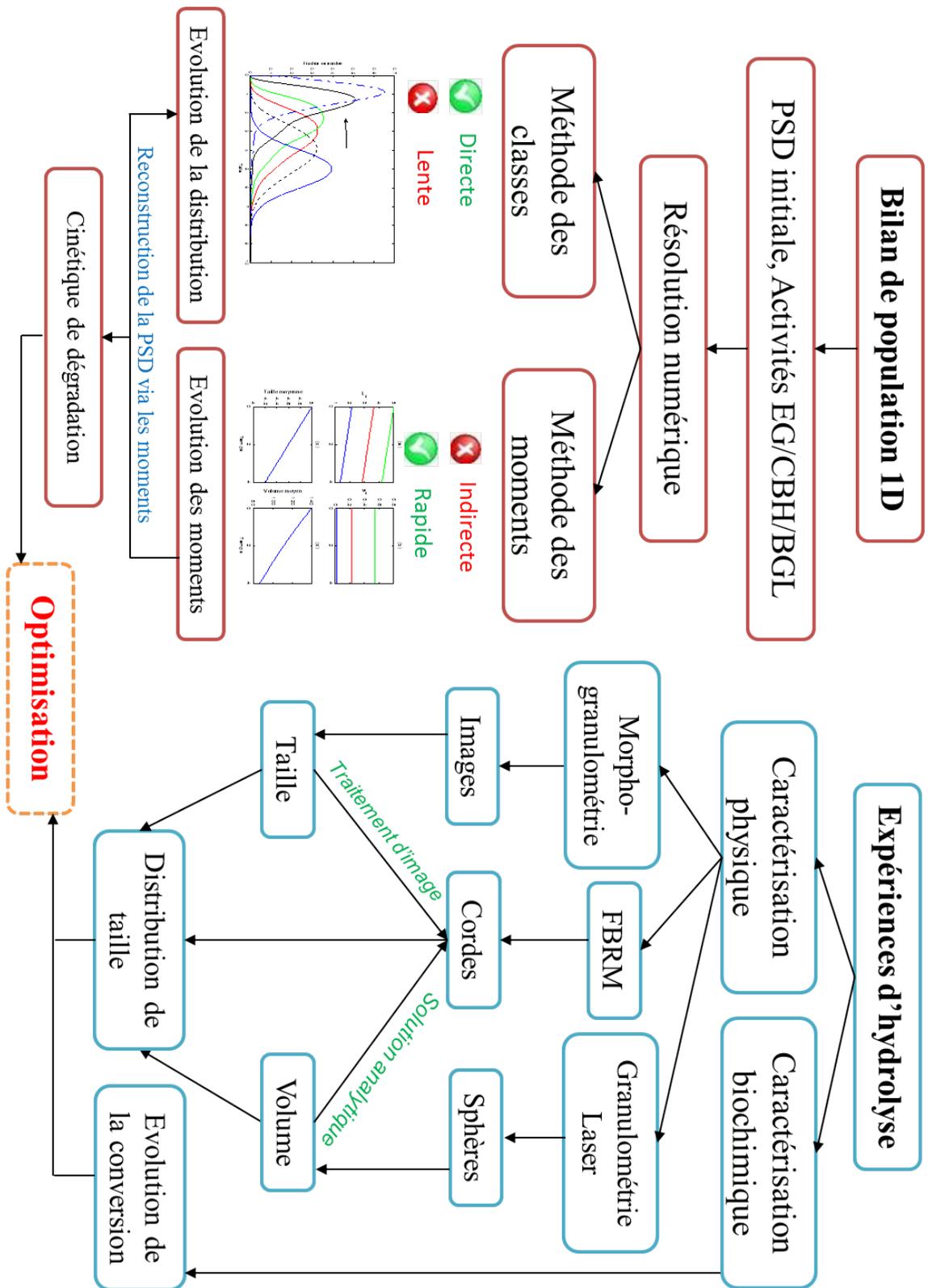


FIGURE V.2 – Schéma global de la démarche de modélisation par le bilan de population couplée aux outils de caractérisation physique et biochimique du substrat/réaction

bution de taille durant la réaction que le suivi dynamique de la production des sucres.

Ce type de données est essentiel pour la comparaison avec le modèle et surtout pour son intégration dans une boucle globale d'optimisation visant à identifier les paramètres du modèle.

Par ailleurs, l'utilisation de plusieurs outils de caractérisation physique est motivée par la volonté d'avoir une information de qualité sur la forme et la distribution de taille des particules puisqu'il n'est pas toujours facile d'un point de vue technique d'avoir un outil unique multi-tâche et fiable. L'utilisation de ces techniques permet de coupler leurs avantages mais nécessite de disposer d'outils numériques capables de convertir les différents types de données expérimentales pour pouvoir les traiter de la façon la plus appropriée.

Cette tâche était d'une importance capitale dans notre étude puisqu'il s'agissait de valider du point de vue quantitatif les méthodes de mesure de distribution. Nous avons alors pu constater que la conversion des distributions constituait un sujet d'étude en soi dans le domaine des solides divisés. Il s'agit d'un problème encore ouvert et faisant l'objet de développements continus comme en témoigne la publication récente de ([Agimelen et al., 2015b](#)). Nous avons produit un certain nombre d'outils permettant de réaliser certaines conversions. Nous avons également pu identifier grâce à ce travail les limitations intrinsèques de l'approche FBRM qui demeure assez sensible à l'état de surface des particules. Pour nous il s'est avant tout agi de produire des données expérimentales dans un format exploitable en vue de la confrontation aux résultats de la modélisation.

Nous avons décrit dans le Chapitre [III](#) l'ensemble des expériences effectuées dans différentes conditions ainsi que les résultats obtenus en terme de conversion en sucres simples (cellobiose et glucose). Nous n'avons toutefois pas exploité les analyses des sucres réducteurs obtenues par la technique DNS. Nous donnons dans la figure [V.3](#) un résultat type (expérience 1) où nous comparons la concentration des sucres réducteurs obtenue avec le DNS avec celle des sucres simples (glucose + cellobiose) obtenue par HPLC.

Cette comparaison montre que les deux concentrations se superposent. Ce constat n'est pas propre à l'expérience 1 mais nous l'avons retrouvé sur l'ensemble des expériences. Le DNS est une technique spectrophotométrique qui détecte la présence de molécules (quelque soit leur taille) ayant une extrémité réductrice. La superposition des résultats des deux techniques montre que les sucres présents en milieu réactionnel tout au long de l'hydrolyse de l'Avicel PH-101 sont simples. En d'autres termes, l'étape limitante est la

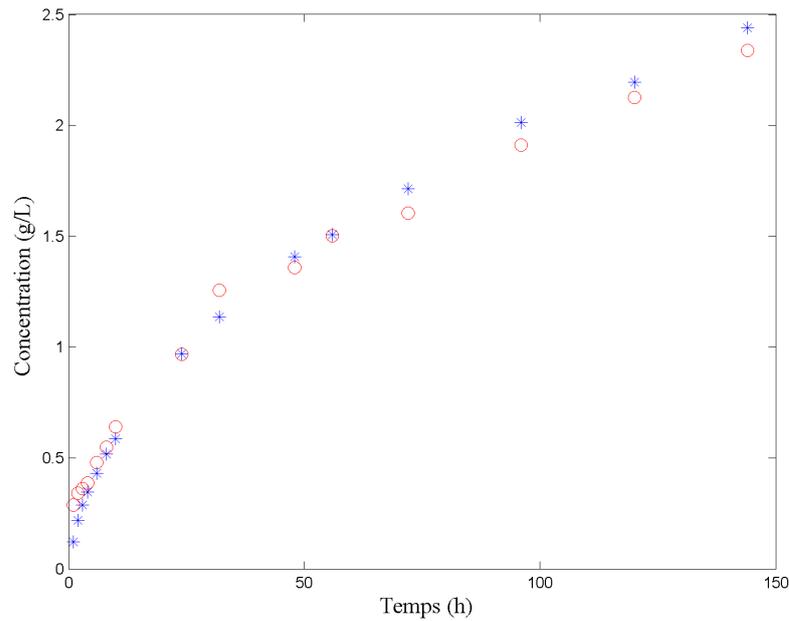


FIGURE V.3 – Évolution des concentrations en sucres réducteurs (ronds) et en sucres simples (glucose + cellobiose : *) durant l'expérience 1

solubilisation du substrat, les chaînes cellulosiques produites sont instantanément transformées en sucres simples.

Ce résultat est très important car il montre que, lors de la modélisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un substrat particulaire, il n'est pas nécessaire de coupler deux bilans de populations distincts : un propre au substrat particulaire et l'autre au substrat soluble. Les vitesses de transformation sont très différentes, de ce fait, il suffit de considérer l'étape de transformation du substrat particulaire et de fixer une taille minimale au-delà de laquelle le substrat est considéré comme soluble. Ainsi, tout ce qui franchit cette limite peut être considéré comme du sucre simple. Cela conforte la nécessité de disposer de techniques de reconstruction des distributions via les moments instantanément avec la résolution numérique du bilan de population.

Nous nous penchons à présent sur les analyses granulométriques avant et au cours de l'hydrolyse obtenues via les outils expérimentaux mis en œuvre.

V.3.1 Analyse au morpho-granulomètre

Comme mentionné précédemment, l'analyse au morpho-granulomètre se base sur le traitement d'images de particules dispersées au préalable en voie sèche ou humide. Des tests de caractérisation initiale de l'Avicel PH-101 ont été réalisés avant son hydrolyse enzymatique. La figure V.4 montre les particules de ce substrat sous microscope avec un grossissement important ($\times 50$). L'image est prise avec le Mastersizer G3S et donne une idée sur la forme des particules qui sont plutôt allongées.

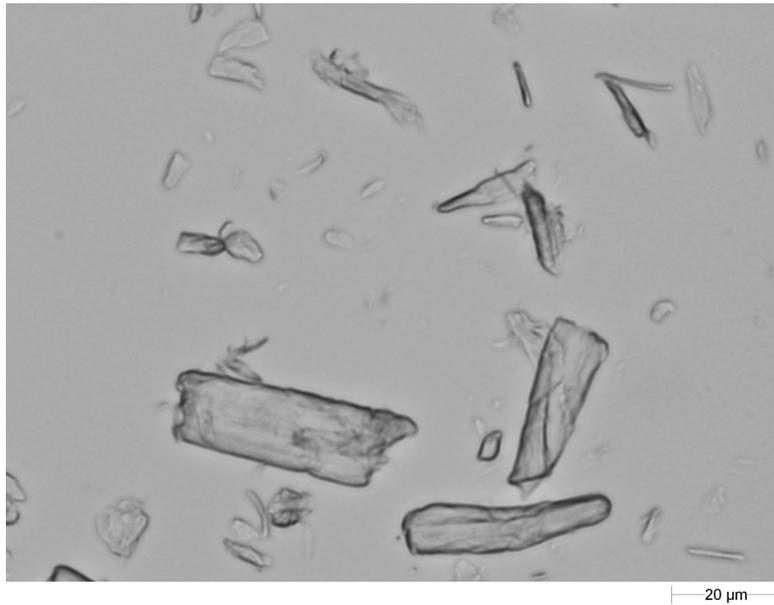


FIGURE V.4 – Image de particules d'Avicel PH-101 sous microscope avec un grossissement $\times 50$ obtenue avec le Mastersizer G3S

Ce type d'image est l'information de base nécessaire aux traitements post-acquisition effectués par le logiciel associé à cet outil. La différence des niveaux de gris entre les particules et le support permet leur détection (opération manuelle). La figure V.5 représente une image reconstituée de l'ensemble des particules détectées après seuillage. Cette étape est la plus critique vue ses conséquences sur la qualité de l'analyse. En effet, la sur/sous-estimation de la surface des particules peut être importante et il n'y a malheureusement aucune façon de la quantifier. Cela est dû notamment à la profondeur de focalisation des optiques qui ne permet pas toujours une bonne délimitation des contours des particules épaisses. Pour les particules de petites tailles, on constate que leur propriétés optiques s'apparentent à celle du support ce qui complique leur détection. Notons que la Figure V.5 est obtenue à partir d'une dispersion en voie sèche suite à une optimisation de la

quantité de substrat dispersée pour éviter les chevauchements de particules, ce qui est une autre source d'erreur.

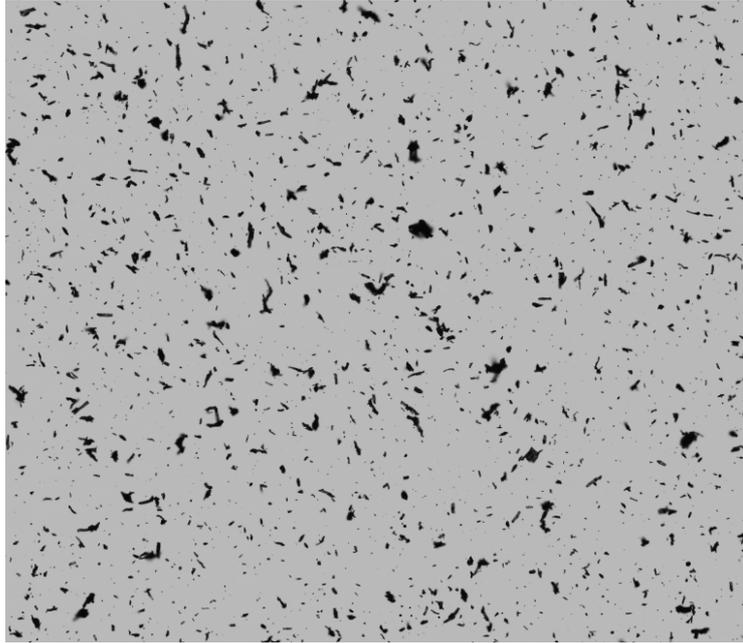


FIGURE V.5 – Image composite d'une dispersion de particules d'Avicel PH-101 après seuillage et détection avec un grossissement $\times 10$ (Mastersizer G3S)

Une fois les particules délimitées, le logiciel de traitement d'images *Morphologi v7.21* se charge de les répertorier en calculant leurs propriétés (surface, contour, longueur, taille moyenne ...) sur la base de leurs images respectives. Nous donnons dans la Figure V.6 la distribution de taille des particules d'Avicel PH-101 obtenue avec un grossissement $\times 5$.

Comme nous pouvons le constater, cette optique permet un balayage de l'ensemble des tailles supérieures à $1.5 \mu\text{m}$. Les particules d'Avicel PH-101 forment une distribution monomodale centrée autour d'une taille moyenne de $17 \mu\text{m}$ (taille moyenne en nombre). Notons que les particules ont été réparties sur une grille géométrique de premier terme $u_0 = 1.5 \mu\text{m}$ et de raison $q = 2^{0.1}$. Des combinaisons d'optiques peuvent être utilisées pour détecter des particules plus petites. Cela est particulièrement intéressant pour le suivi de l'évolution de la distribution de taille au cours de l'hydrolyse puisque la fragmentation des particules initiales donne des particules de plus en plus petites nécessitant des grossissements importants.

L'intérêt de l'analyse morfo-granulométrique réside dans son principe qui se base sur la visualisation des particules et, de ce fait, l'accès à leur taille se fait sans aucun biais. De plus, d'autres informations, notamment morphologiques, sont accessibles. Nous donnons à

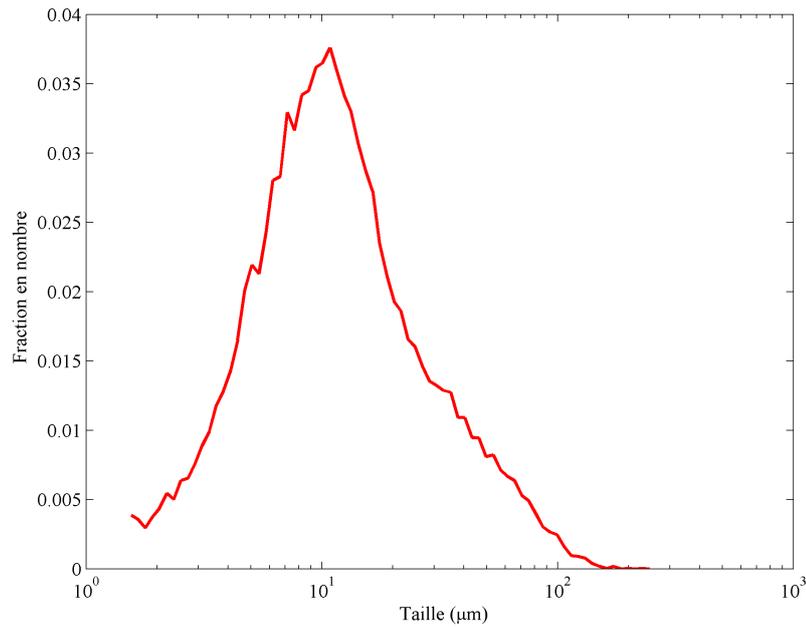


FIGURE V.6 – *Distribution de taille en nombre de particules d'Avicel PH-101 en voie sèche avec une optique $\times 5$ (Mastersizer G3S)*

titre d'exemple la distribution du ratio d'aspect (rapport largeur/longueur des particules détectées) des particules d'Avicel PH-101 dans la Figure V.7.

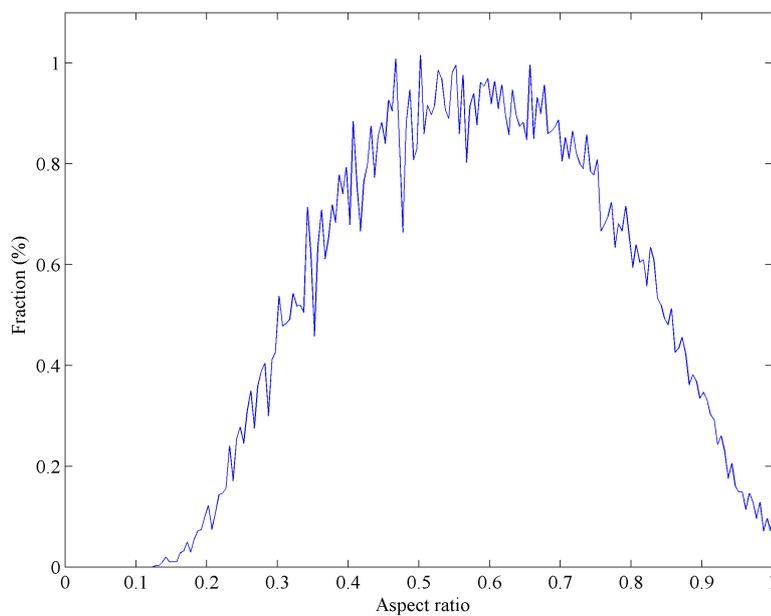


FIGURE V.7 – *Distribution du ratio d'aspect des particules d'Avicel PH-101 dispersées en voie sèche et analysées avec une optique $\times 5$ (Mastersizer G3S)*

Si les particules du substrat étaient sphériques, leur ratio d'aspect serait de 1. Or, dans le cas des particules d'Avicel PH-101, ce paramètre est distribué autour de 0.6, ce qui donne une estimation de la forme allongée des particules. En d'autres termes, la longueur des particules est globalement deux fois plus importante que leur largeur.

Cette technique, utilisée en voie sèche, permet une caractérisation fine et riche des substrats utilisés dans l'étude tel que l'Avicel PH-101 montré dans les exemples précédents. Néanmoins, le suivi de l'évolution de la distribution de taille des particules du substrat durant la réaction d'hydrolyse est délicat. En effet, nous avons testé différents protocoles expérimentaux sans succès.

La première approche était de faire des prélèvements séquentiels durant l'hydrolyse et d'extraire la phase solide par séchage pour analyse. L'inconvénient majeur dans ce cas est l'agglomération des particules après séchage. Ainsi, malgré la pulvérisation sous pression des échantillons lors de l'analyse en voie sèche, nous détectons des agglomérats de particules qui faussent le résultat. Des techniques de séchage plus poussées telle que l'atomisation par exemple peuvent être utilisées mais nécessitent des installations spécifiques dont nous ne disposons pas au niveau du laboratoire.

La deuxième approche était de conduire des analyses sur les échantillons directement en voie humide. La technique consiste à déposer un petit volume de l'échantillon (quelques gouttes) sur une lame en verre, de le recouvrir avec une lamelle en s'assurant qu'aucune bulle d'air n'est piégée. Pour éviter le séchage du film liquide entre la lame et la lamelle sous la lumière du microscope, une colle est déposée sur les bords de la lamelle. L'analyse dans ce cas est plutôt qualitative. En effet, le nombre limité de particules détectées dans chaque test est statistiquement insuffisant pour représenter l'état de l'ensemble du système (réacteur de 0.5 L). De plus, le protocole préparatoire est fastidieux et ne permet pas toujours des analyses fiables (formation d'agglomérats de particules dans ce cas aussi). Ainsi, les différents tests effectués n'étaient pas concluants.

Cet outil permet donc le suivi de l'évolution des propriétés morphologiques des particules de substrat au cours de la réaction. Cependant, il ne permet pas de produire des distributions en taille fiables lorsque le substrat est en hydrolyse en voie humide. Néanmoins, la caractérisation de l'état initial du substrat a toute son importance notamment pour des besoins de comparaison avec les autres techniques comme nous le verrons ultérieurement. Par ailleurs, l'utilisation d'une cellule liquide (deux plaques en verre parallèles

avec un entrefer réglable et une alimentation en continu) permettrait une visualisation dynamique des particules sous écoulement et pourrait être d'un grand intérêt dans notre cas.

V.3.2 Analyse avec la sonde FBRM

La sonde FBRM G400 permet un suivi *in situ* et en continu de l'évolution de la distribution de cordes des particules du substrat durant son hydrolyse sur une gamme de longueurs allant de 1 à 1000 μm . L'analyse est très rapide (quelques secondes) et le résultat est donné sous différents formats comme montré dans la Figure V.8.

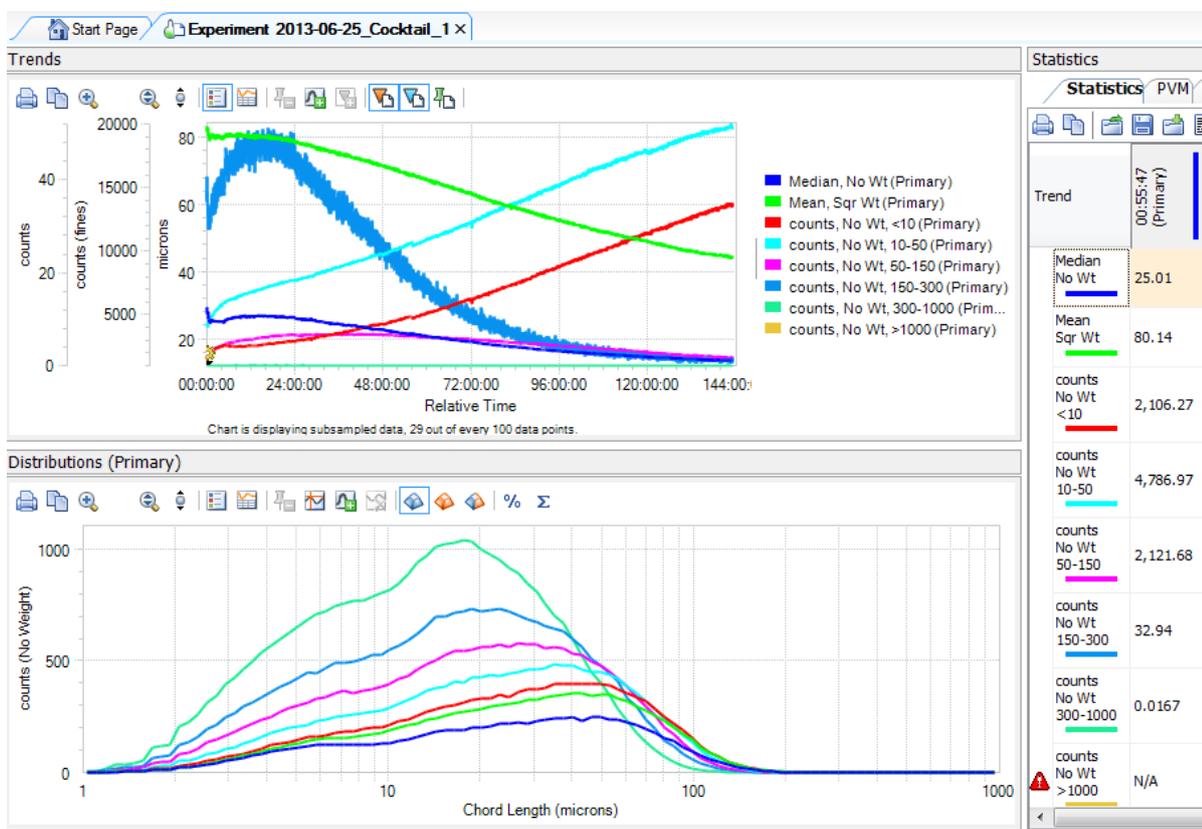


FIGURE V.8 – Données fournies par la sonde FBRM G400 : Evolution des propriétés moyennes et des classes de cordes (haut), évolution de la distribution de cordes (bas) et estimation des propriétés moyennes et du nombre de cordes détectées dans chaque classe (droite)

En effet, le logiciel de traitement statistique des données associé à la sonde FBRM G400 permet d'accéder directement à un certain nombre de propriétés de la distribution de cordes telles que sa moyenne en nombre/volume, la médiane, l'écart-type ... etc (Figure V.8 à droite). Il permet aussi de suivre l'évolution du nombre total de cordes

détectées par intervalle de taille (Figure V.8 haut) en plus des différents représentations des distributions de cordes (nombre, volume, absolue, normée, cumulée, . . . ; Figure V.8 bas). Par ailleurs, les données brutes des distributions de cordes sont exportables pour des traitements supplémentaires si nécessaire.

V.3.2.1 Test à blanc du substrat Avicel PH-101

L'essentiel des expériences réalisées dans le cadre de cette étude et décrites dans le Chapitre III concernent un substrat cellulosique de type Avicel PH-101. L'étude du comportement de ce substrat dans l'eau et sous agitation est réalisée au préalable. Cette étude concerne le suivi de l'évolution de la distribution de cordes des particules du substrat dans des conditions similaires à celles de l'hydrolyse mais sans ajout de biocatalyseur en utilisant la sonde FBRM G400. Elle vise à explorer les phénomènes de gonflement des particules en présence d'eau et leur possible fragmentation sous l'effet des contraintes hydrodynamiques. Le résultat est donné dans la Figure V.9.

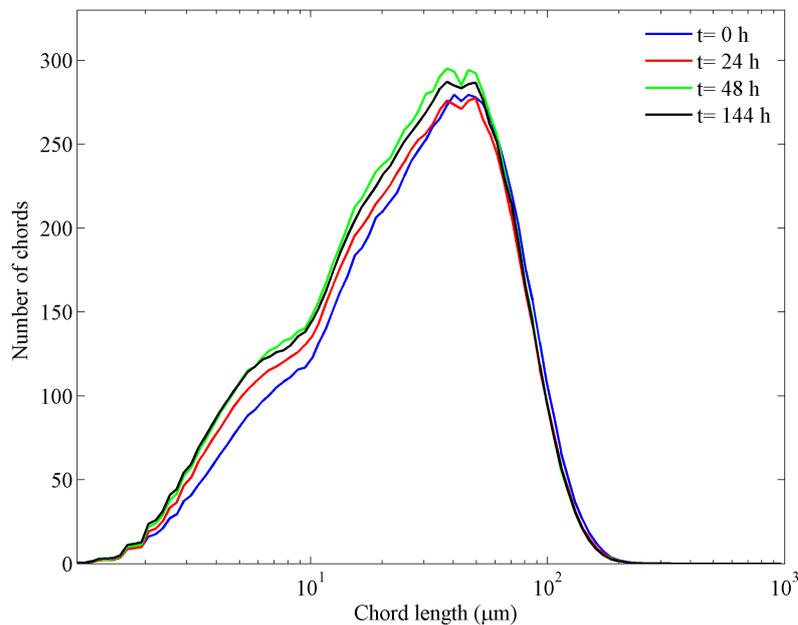


FIGURE V.9 – Évolution de la distribution de cordes des particules d'Avicel PH-101 dans l'eau et sous agitation mécanique

Comme montré sur la Figure V.9, les distributions de cordes (CLDs) du substrat restent stables durant les 144 h que dure l'analyse. Cela signifie que le phénomène de gonflement des particules du substrat en présence d'eau est négligeable, de même pour la

fragmentation sous l'effet des contraintes hydrodynamiques. Ainsi, tout changement au niveau de la CLD durant les réactions d'hydrolyse serait la conséquence directe ou indirecte des attaques enzymatiques. La conséquence directe est la décroissance progressive de la taille des particules via le phénomène d'érosion suite aux attaques des exoglucanases (CBH) et la conséquence indirecte est la fragmentation des particules une fois fragilisées par les attaques endoglucanases (EG).

V.3.2.2 Analyse des résultats d'une expérience type

Nous donnons dans cette partie les résultats d'analyse d'une expérience d'hydrolyse type (expérience 1) pour illustrer l'ensemble des informations qui peuvent être extraites suite au suivi via la technique FBRM.

Nous donnons dans la Figure V.10 l'évolution de la distribution de cordes des particules d'Avicel PH-101 durant la réaction d'hydrolyse et dans la Figure V.11 la même évolution mais avec des CLDs normées par le nombre total de cordes détectées.

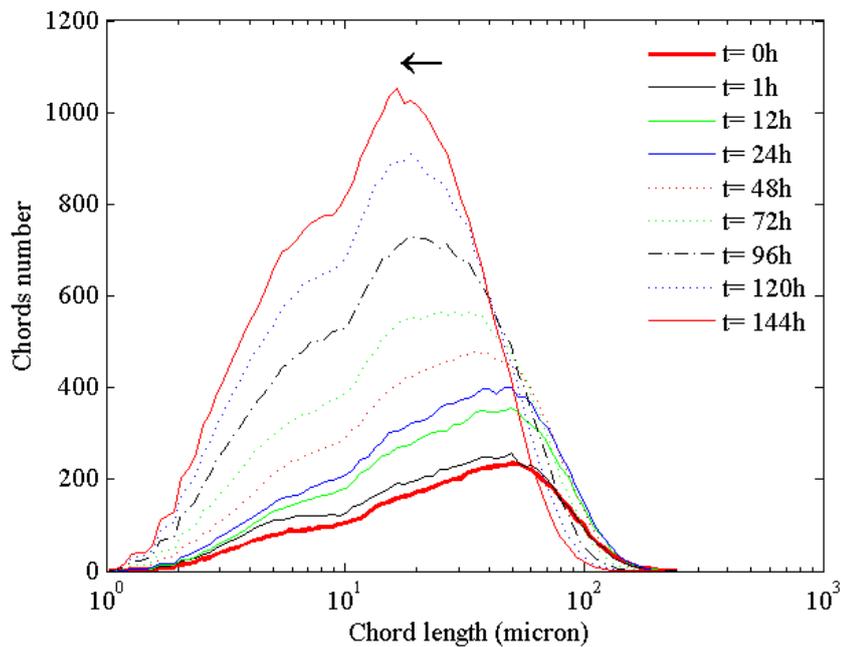


FIGURE V.10 – Évolution de la distribution de cordes des particules d'Avicel PH-101 durant l'hydrolyse (expérience 1)

La distribution de cordes (CLD) initiale évolue d'une façon significative durant la réaction d'hydrolyse, de plus en plus de cordes sont détectées, ce qui est expliqué par l'augmentation du nombre de particules issues de la rupture des particules initiales. Cette

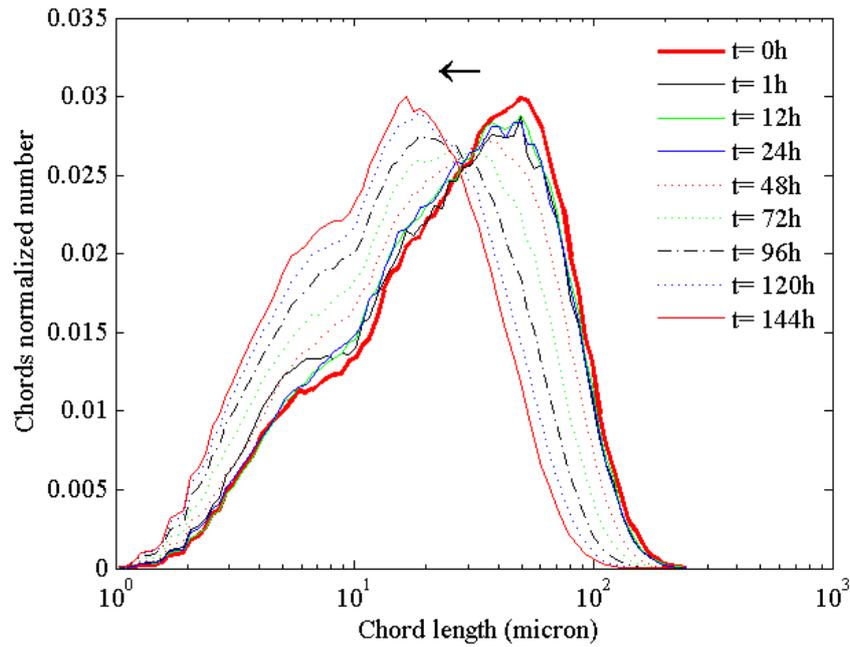


FIGURE V.11 – Évolution de la distribution de cordes normée des particules d'Avicel PH-101 durant l'hydrolyse (expérience 1)

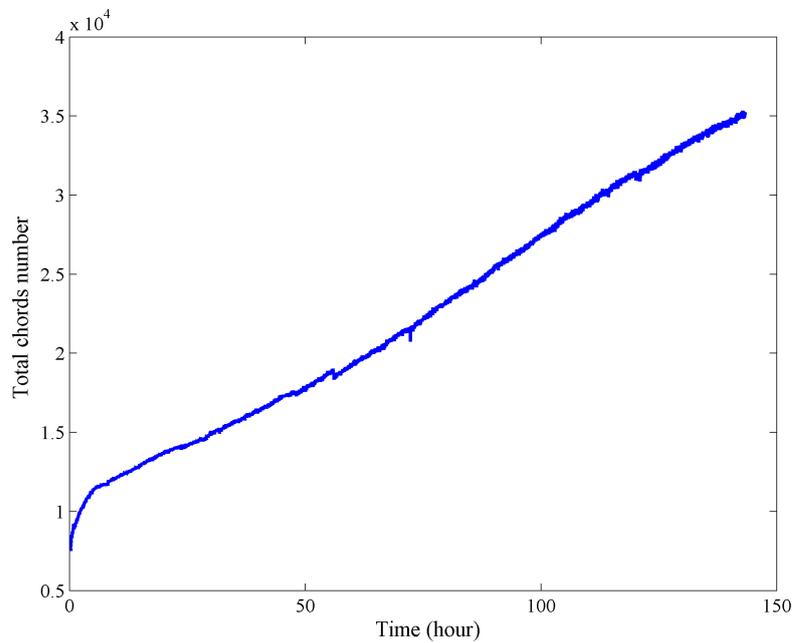


FIGURE V.12 – Évolution du nombre total de cordes détectées durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)

rupture intervient grâce à l'activité du cocktail qui fragilise les particules. Ces dernières cèdent face aux contraintes hydrodynamiques. Le nombre total de cordes détectées est en

constante augmentation tout au long de la réaction comme montré dans la Figure V.12. L'analyse de la Figure V.11 montre que la CLD glisse vers les petites tailles mais après une phase initiale de 24 h où elle reste quasiment identique. Dans la Figure V.10, cela se traduit par une augmentation de l'intensité de la distribution uniquement.

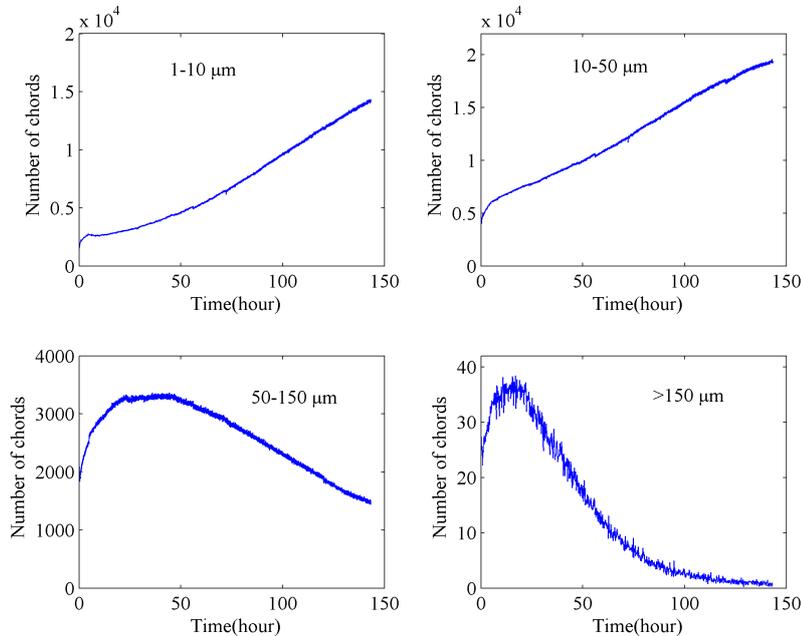


FIGURE V.13 – Évolution du nombre total de cordes détectées par intervalles de tailles durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)

Pour comprendre ce qui se passe durant cette phase initiale, nous donnons dans la Figure V.13 l'évolution du nombre total de cordes détectées par classe de tailles. Nous constatons que pour les deux classes $[50-150] \mu\text{m}$ et $[150-300] \mu\text{m}$ représentatives des grosses particules, le nombre total de cordes détectées par la sonde augmente initialement. Cela peut être expliqué par la fragmentation des particules de ces deux classes sans que les particules filles ne tombent dans les classes inférieures. L'existence de quelques grosses particules (taille $> 300 \mu\text{m}$) que la sonde ne détecte pas et qui, en se désintégrant, donnent naissance à des particules qui tombent dans ces classes est possible aussi. Cette hypothèse est confortée par les analyses au morfo-granulomètre : nous détectons bien quelques particules de taille $> 300 \mu\text{m}$ et que nous ne retrouvons pas avec la sonde puisqu'elles sont très peu nombreuses et donc ont une probabilité très faible d'être détectées.

Au cours de la réaction, la désintégration des particules des deux grandes classes (Figure V.13) alimente les classes inférieures dont le nombre de cordes détectées ne cesse

d'augmenter. Il faut aussi garder à l'esprit que les petites particules sont elles aussi attaquées et disparaissent dès lors que leur taille est $< 1 \mu\text{m}$.

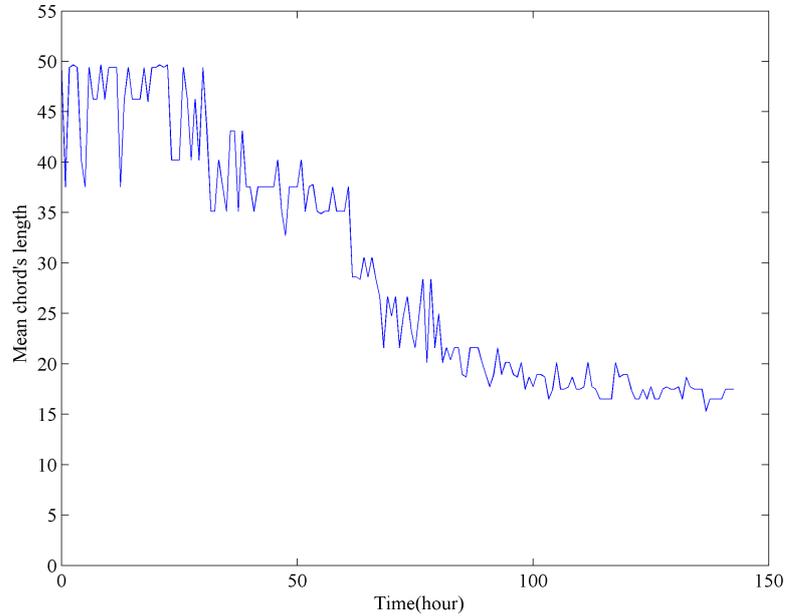


FIGURE V.14 – Évolution de la corde moyenne en nombre durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)

Nous donnons dans la Figure V.14 l'évolution de la corde moyenne représentative de l'évolution globale de la taille des particules d'Avicel PH-101. Elle passe de $50 \mu\text{m}$ initialement à moins de $20 \mu\text{m}$ en fin de réaction, ce qui représente une évolution conséquente de la taille des particules du substrat.

V.3.2.3 Exploitation des résultats de la sonde FBRM

Pour pouvoir exploiter les résultats fournis par la sonde FBRM G400, la conversion des distributions de cordes en distributions de taille est une étape déterminante. En effet, l'initialisation du modèle de bilan de population repose sur la distribution de taille des particules du substrat, de même que la confrontation des prévisions du modèle avec les données expérimentales à différents instants de la réaction.

Si nous superposons la distribution de taille des particules d'Avicel PH-101 issue du morpho-granulomètre avec la distribution de cordes associée donnée par la sonde FBRM G400 (Figure V.15), nous constatons un décalage important entre les deux distributions. Ce décalage est dans le sens inverse de nos prévisions. En effet, nous nous attendions,

comme le montre le résultat du modèle de conversion des distributions de taille (PSD) en CLD donné dans la Figure V.16 (les détails du modèle sont donnés dans l'Annexe A), à avoir une CLD décalée vers les petites tailles par rapport à la PSD dont elle est issue. Cela est motivé par le fait qu'une particule peut donner une multitude de cordes de tailles comprises entre la plus petite corde détectable par la sonde et la plus longue arête reliant deux points de la particule.

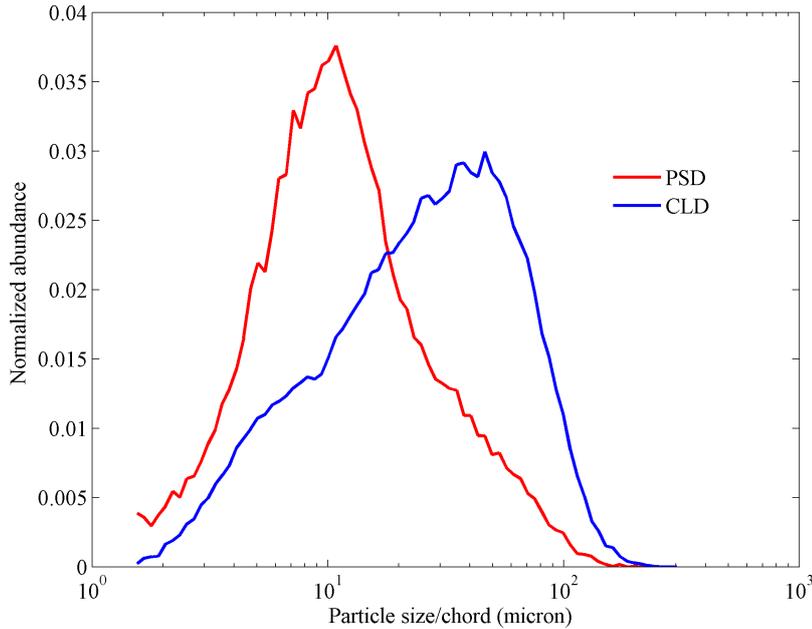


FIGURE V.15 – *Comparaison de la distribution de taille des particules d'Avicel PH-101 (morpho-granulomètre) avec sa distribution de cordes associée (sonde FBRM)*

A première vue, le résultat donné dans la Figure V.15 peut être expliqué par la non-sphéricité des particules d'Avicel PH-101. Le fait de détecter des cordes de taille supérieure aux plus grandes particules vues par le morpho-granulomètre appuie cette explication puisque les données du morpho-granulomètre sont des diamètres des disques de mêmes surfaces que les particules détectées. Pour éliminer cette hypothèse, des tests supplémentaires ont été réalisés avec les deux outils. Dans ces tests, trois familles de particules sphériques en PVC ont été utilisées. Les diamètres de ces particules sont respectivement de 60, 84 et 170 μm . Les résultats sont résumés dans la Figure V.17 ci-après.

Les résultats obtenus dans le cas de particules sphériques sont semblables à ceux obtenus avec les particules d'Avicel PH-101 non-sphériques. En effet, dans les trois cas considérés, nous constatons systématiquement un décalage à droite des CLDs par rapport

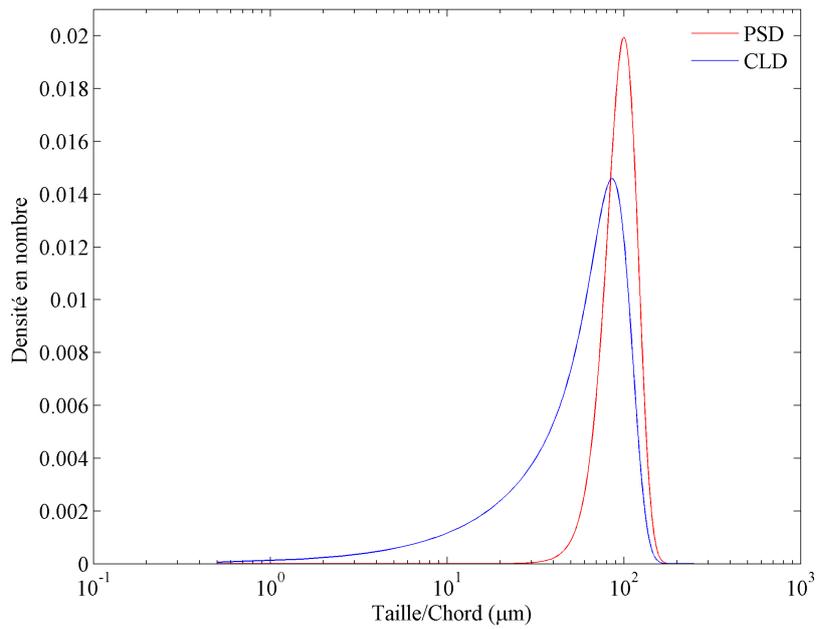


FIGURE V.16 – Génération analytique d’une distribution de cordes associée à une distribution de taille dans le cas de particules de forme sphérique (voir Annexe A)

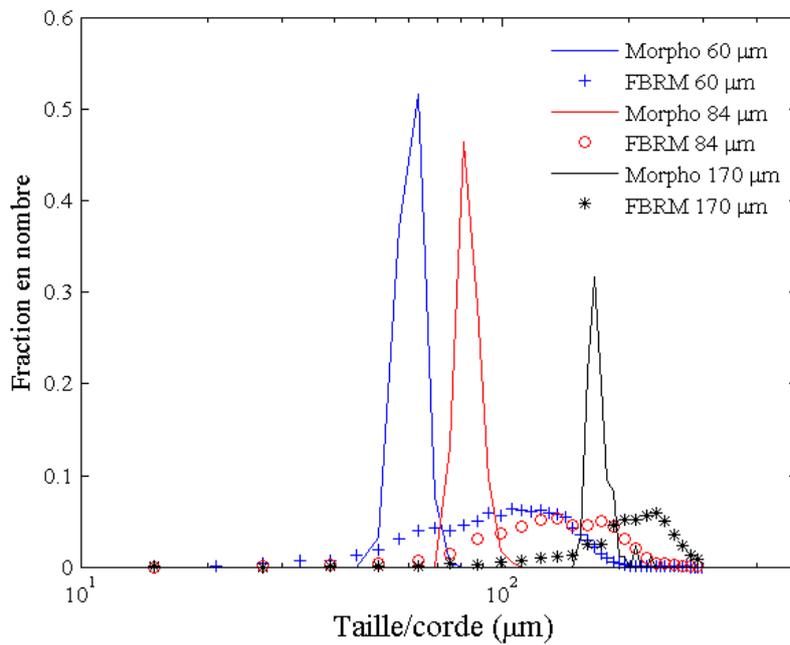


FIGURE V.17 – Distributions de taille (morpho-granulomètre) et leurs distributions de cordes associées (sonde FBRM) de trois différentes familles de particules sphériques

à leurs PSDs respectives, ce qui est, théoriquement, exclu puisque dans le cas d’une particule sphérique, la plus longue corde est son diamètre. Or, la sonde FBRM détecte

bien des cordes de taille supérieure au diamètre de la plus grande particule.

Ce phénomène que nous venons de décrire est rapporté dans un travail récent. (Vay *et al.*, 2012) ont constaté que la CLD fournie par la sonde FBRM est grandement affectée par les propriétés des particules en suspension, notamment leurs propriétés de surface. Pour démontrer cela, (Scheler, 2013) ont utilisé des particules sphériques de polystyrène monodisperses dont les propriétés de surface sont différentes. Les résultats sont résumés dans la Figure V.18.

Nous voyons bien que sur les trois lots de particules ayant la même taille mais dont les propriétés de surface et donc de réflexion sont différentes, les signaux récupérés sont complètement différents et nous retrouvons notamment la surestimation constatée lors de nos tests. Cela démontre l'existence d'autres paramètres à prendre en compte pour pouvoir faire le passage PSD-CLD et inversement. Dans notre cas, le problème peut être particulièrement ardu si les propriétés des particules de cellulose attaquées changent au cours de la réaction.

Par ailleurs, des travaux très récents (Agimelen *et al.*, 2015a; Agimelen *et al.*, 2015b) proposent un modèle de conversion PSD-CLD dans le cas de particules non-sphériques. Pour valider le modèle, les auteurs utilisent deux types de données expérimentales : des données issues des analyses au granulomètre laser et des données obtenues via une technique de visualisation *in situ* des particules en suspension. Ces données une fois converties en CLD via le modèle proposé sont comparées à celles fournies par la sonde FBRM G400. Ces travaux méritent une analyse approfondie pour pouvoir les exploiter dans notre cas.

V.3.3 Analyse au granulomètre laser

La dernière technique expérimentale utilisée dans cette étude pour accéder à l'évolution de la distribution de taille des particules du substrat durant son hydrolyse est la granulométrie laser. Cette technique, comme discuté précédemment, fournit des distributions de taille exprimées en fractions volumiques avec une hypothèse sur la forme des particules (sphériques). Les résultats du suivi de l'évolution de la distribution de taille des particules d'Avicel PH-101 durant leur hydrolyse (expérience 1) sont donnés dans la Figure V.19.

La distribution initiale évolue vers les petites tailles suite à la fragmentation des particules subissant les attaques enzymatiques. Les distributions étant normalisées, aucune

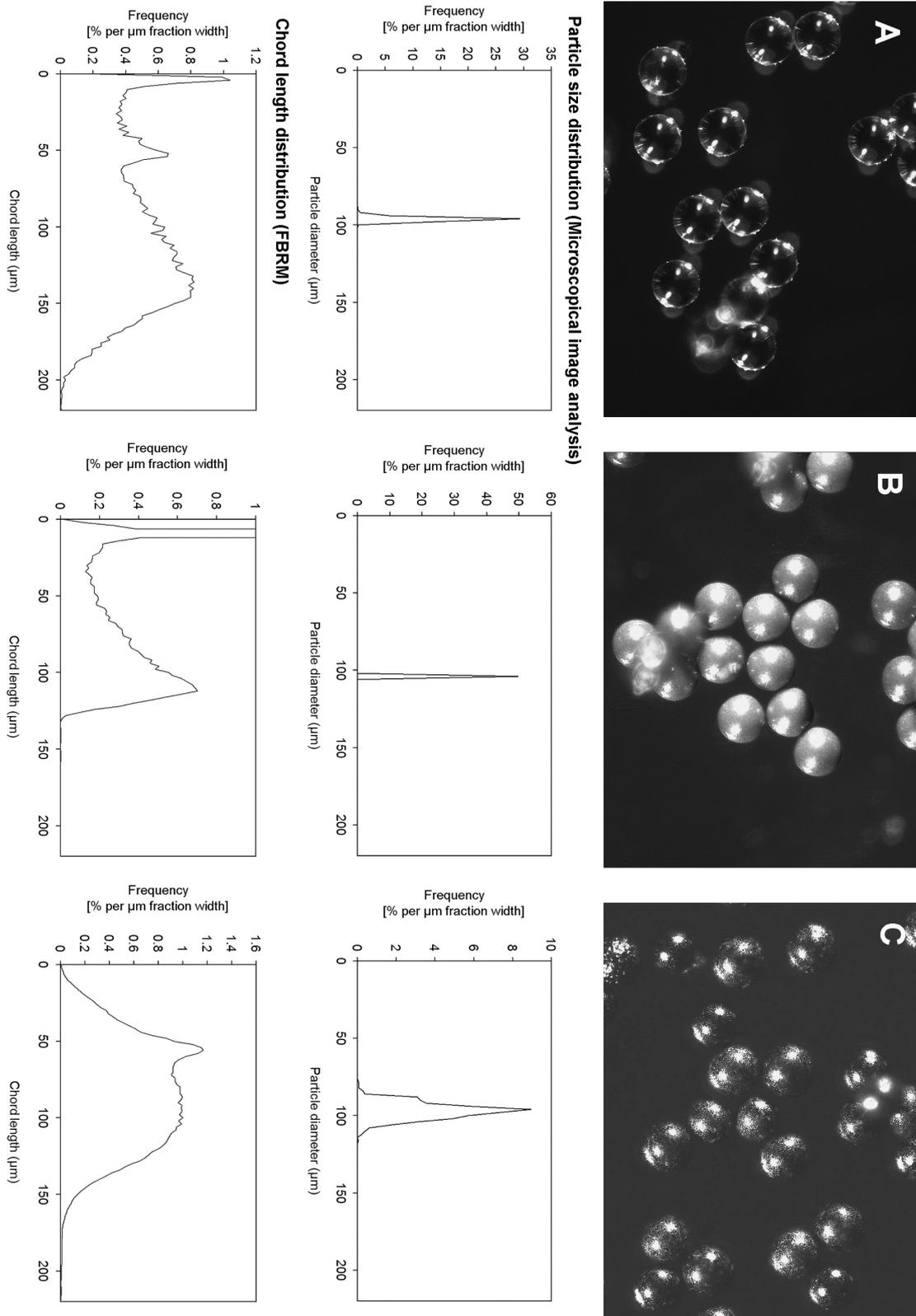


FIGURE V.18 – Images de particules sphériques monodisperses et de même taille (à droite) avec leurs distributions de taille (au milieu) et leurs distributions de cordes mesurées avec la sonde FBRM (à gauche) : (A) particules transparentes, (B) particules noires de surface lisse, (C) particules noires de surface rugueuse (Scheler, 2013)

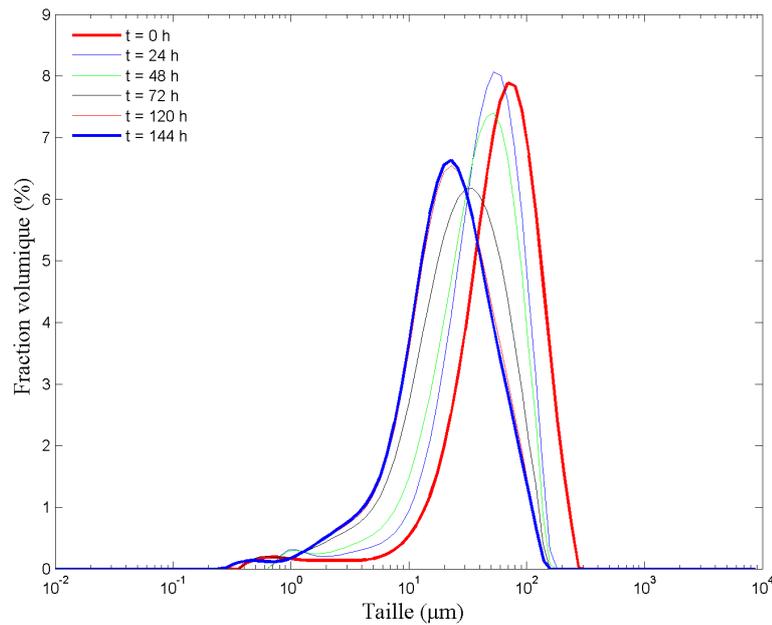


FIGURE V.19 – Évolution de la distribution de taille exprimée en fractions volumiques durant l'hydrolyse enzymatique de l'Avicel PH-101 (expérience 1)

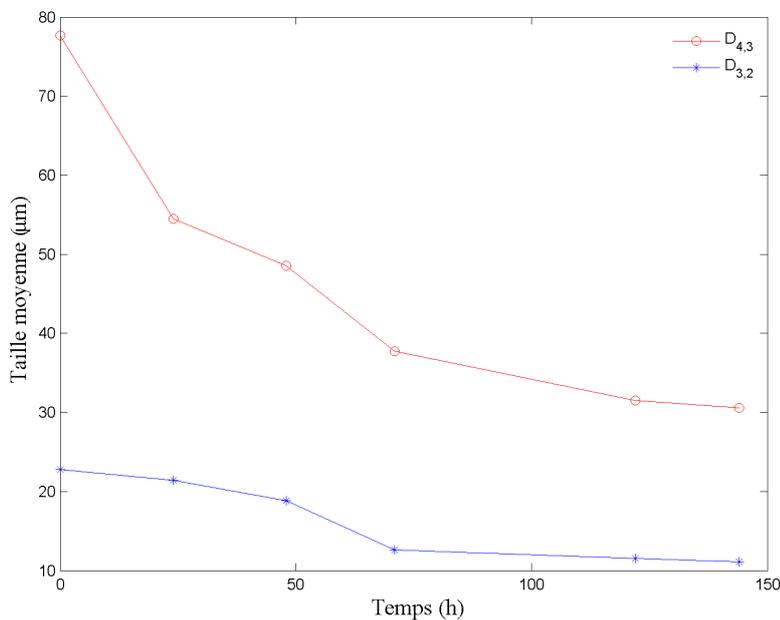


FIGURE V.20 – Évolution des tailles moyennes ($d_{4,3}$ et $d_{3,2}$) des particules d'Avicel PH-101 durant son hydrolyse enzymatique (expérience 1)

information sur la fréquence du processus de fragmentation (via le nombre total de particules détectées à chaque instant) n'est accessible. En revanche, les propriétés moyennes

des distributions peuvent être calculées. A titre d'exemple, nous représentons dans la Figure V.20 l'évolution du diamètre moyen en volume $d_{4,3}$ et du diamètre de Sauter $d_{3,2}$ au cours de la réaction. Cette évolution est importante, le diamètre $d_{4,3}$ passe de 77 μm initialement à 30 μm en fin de réaction (après 144 h d'hydrolyse).

Ayant développé une stratégie de résolution de l'équation de bilan de population dans le cas de l'hydrolyse enzymatique basée sur la méthode des moments, nous pouvons exploiter directement les moments expérimentaux calculés à partir des données du granulomètre laser.

Dans le cas général, les moments expérimentaux peuvent être évalués de la façon suivante : si nous considérons que la densité $n(x)$ est constante sur une classe $[X_i, X_{i+1}]$, c'est-à-dire :

$$n(x) = \frac{N_i}{X_{i+1} - X_i}, \quad \forall x \in [X_i, X_{i+1}] \quad (\text{V.1})$$

Les moments expérimentaux m_k^* sont calculés alors comme suit :

$$\begin{aligned} m_k^* &= \int_0^\infty n(x)x^k dx \\ &= \sum_i \int_{X_i}^{X_{i+1}} n(x)x^k dx \\ &\approx \sum_i \frac{N_i}{X_{i+1} - X_i} \int_{X_i}^{X_{i+1}} x^k dx \\ &\approx \sum_i \frac{N_i (X_{i+1}^{k+1} - X_i^{k+1})}{(X_{i+1} - X_i)(k+1)} \end{aligned} \quad (\text{V.2})$$

Notons que dans le cas spécifique des résultats issus de la granulométrie laser, nous avons accès directement aux moments normalisés par rapport au volume total, en d'autres termes à $M_k^*(t) = \frac{m_k^*(t)}{m_3^*(t)}$. Ainsi, l'accès aux moments d'ordre inférieur à 3 n'est possible que par la conversion des distributions en volume en distribution en nombre moyennant une hypothèse sur la forme des particules. Nous donnons dans la Figure V.21 l'évolution des moments réduits d'ordre 3, 4, 5 et 6 au cours de l'hydrolyse et dans la Figure V.22 celle des moments réduits d'ordre 0, 1, 2 et 3. Les moments d'ordre inférieur (0, 1 et 2) sont estimés sous l'hypothèse de particules sphériques.

Comme nous nous y attendions, le moment d'ordre 3 réduit reste constant et vaut

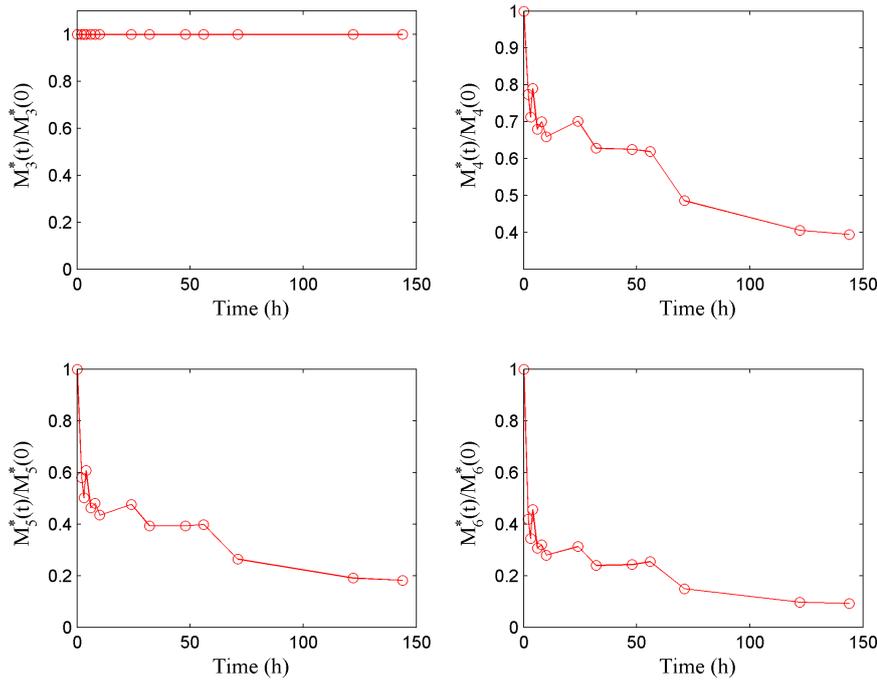


FIGURE V.21 – Évolution des moments réduits d'ordre 3, 4, 5 et 6 de la distribution de taille durant l'hydrolyse (expérience 1)

l'unité puisque l'ensemble des moments sont normalisés par rapport à $m_3^*(t)$. Les moments d'ordre supérieur (4, 5 et 6) décroissent d'une façon monotone et continue contrairement aux moments d'ordre inférieur (0, 1 et 2) qui montrent une évolution bruitée. Cela s'explique par la qualité des résultats fournis par l'outil d'analyse. En effet, une incertitude acceptable au niveau des fractions volumiques (donnée de base) peut avoir une répercussion considérable sur la distribution en nombre et fausser ainsi complètement le résultat. Malheureusement, l'interprétation physique des moments concerne essentiellement les quatre premiers (nombre, longueur, surface et volume) dans notre cas. De ce fait, les résultats issus de la granulométrie laser sont difficilement exploitables quantitativement pour les besoins de confrontation avec le modèle de bilan de population.

Une solution possible serait de confronter les moments expérimentaux d'ordre supérieur au modèle en couplant les données sur les conversions. Cela permettrait de prédire numériquement l'évolution des moments d'ordre inférieur selon le schéma global donné dans la figure V.23. Ainsi, le modèle de bilan de population sera un moyen d'analyse et d'interprétation des données expérimentales.

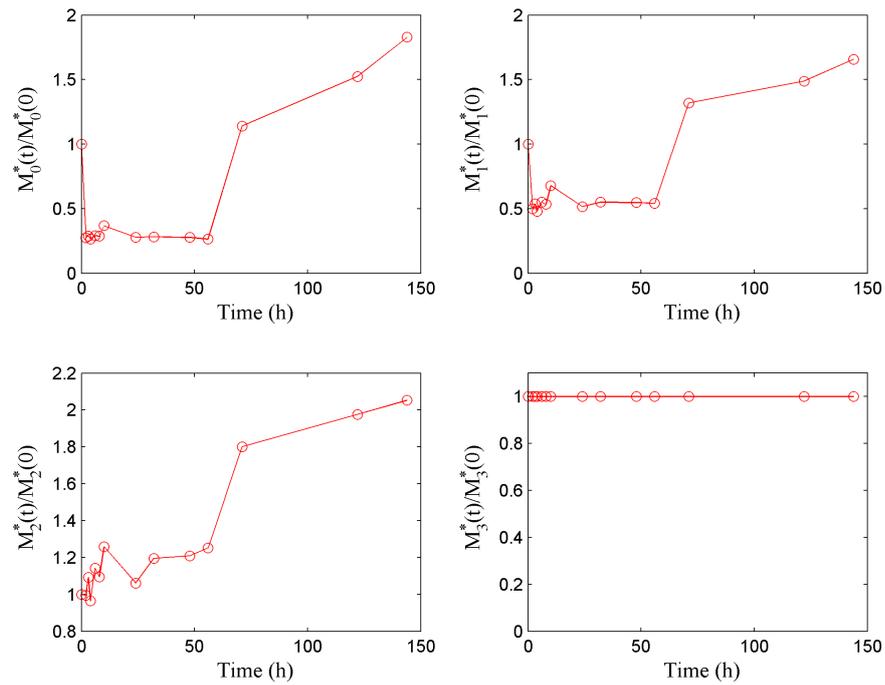


FIGURE V.22 – Évolution des moments réduits d'ordre 0, 1, 2 et 3 de la distribution de taille durant l'hydrolyse (expérience 1)

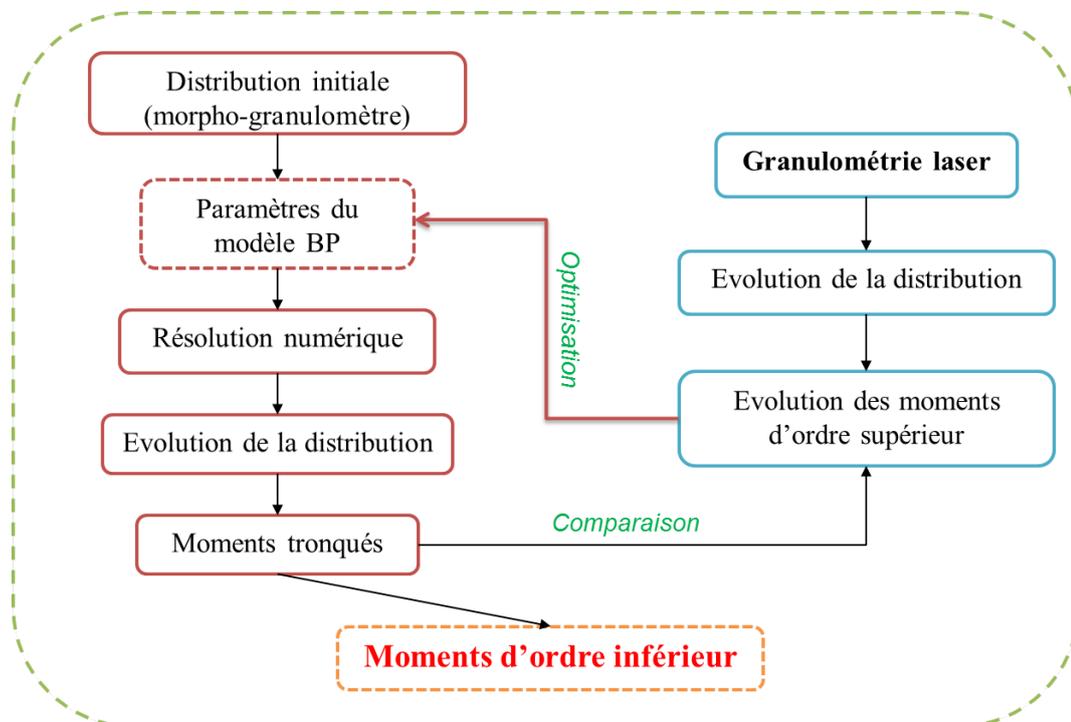


FIGURE V.23 – Prédiction de l'évolution des moments d'ordre inférieur à partir des moments expérimentaux d'ordre supérieur

V.3.4 Conclusion sur les outils expérimentaux

Nous avons exposé dans cette partie quelques résultats expérimentaux obtenus en utilisant les trois différentes techniques granulométriques à savoir la morpho-granulométrie optique, la technique FBRM et la granulométrie par diffraction laser. Ces techniques sont distinctes de par leur principe de mesure et, de ce fait, les résultats renvoyés sont exprimés différemment.

Les analyses au morpho-granulomètre sont basées sur le traitement d'images de particules dispersées. Les dispersions en voie sèche permettent de traiter un nombre suffisamment important de particules mais ne sont pas toujours possibles. En effet, les échantillons liquides prélevés lors des expériences d'hydrolyse nécessitent des techniques poussées de séchage pour pouvoir les exploiter. Les tests en voie liquide n'étaient pas concluants, ils ne permettent pas de traiter un nombre de particules statistiquement représentatif de l'ensemble de la population. Ainsi, cette technique est plutôt recommandée pour la caractérisation initiale du substrat. Elle a l'avantage de fournir des données riches sur la forme des particules. L'utilisation d'une cellule liquide comme expliqué auparavant est une alternative prometteuse dans notre cas.

La technique FBRM a l'avantage d'être rapide et permet un suivi *in situ* et en continu de la distribution de cordes (CLD) des particules du substrat hydrolysé. Elle permet d'avoir accès à un certain nombre d'informations notamment qualitatives caractérisant le substrat à un temps donné. Ainsi, les phénomènes de fragmentation ou de dissolution par exemple peuvent être mis en évidence mais la complexité de la conversion des CLDs en distributions de taille exclue, pour le moment et pour notre cas, toute exploitation quantitative. En effet, les deux techniques développées pour assurer cette conversion (basées sur une solution analytique pour l'une et sur le traitement d'images pour l'autre, décrites dans l'Annexe A) ne donnent pas les mêmes résultats que ceux fournis par la sonde FBRM G400. Des phénomènes de réflexion et de diffusion de la lumière (laser) sur la surface des particules, comme avancé dans la littérature, expliquent ce décalage.

La granulométrie laser, quant à elle, permet le suivi *ex situ* (en voie liquide) de l'évolution de la distribution de taille durant l'hydrolyse. Les distributions renvoyées sont exprimées en fractions volumiques et ne permettent pas une analyse quantitative des phénomènes de rupture. De même pour les moments d'ordre inférieur (0, 1 et 2), leur estimation est très bruitée, ce qui ne permet pas leur exploitation. L'accès aux proprié-

tés moyennes, notamment le $d_{4,3}$, est toutefois possible et avec une bonne précision. Le couplage du modèle de bilan de population avec les moments expérimentaux d'ordre supérieur pourra servir à la prédiction des moments d'ordre inférieur comme montré sur la figure V.23.

Au terme de cette analyse, nous avons exposé et commenté les résultats expérimentaux fournis par les différents outils dans le cas d'une réaction d'hydrolyse enzymatique. Ces résultats sont riches mais exprimés différemment selon l'outil considéré ce qui ne facilite pas toujours la comparaison voire même leur exploitation. Parmi les trois outils d'analyse granulométrique, la technique FBRM semble la plus appropriée pour alimenter le modèle de bilan de population. En effet, les caractéristiques techniques de l'analyse (*in situ*, continue et rapide) et la qualité des résultats (distribution en nombre absolue) sont des atouts majeurs. La seule limite, pour le moment, réside dans la conversion des distributions de cordes en distributions de taille, problème suscitant un intérêt scientifique croissant et qui sera surmonté certainement dans un avenir proche. De même, le couplage entre la morpho-granulométrie et la granulométrie laser est possible (figure V.23) et promet d'être riche.

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était le développement d'une approche de modélisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique de la lignocellulose basée sur le formalisme de bilan de population. Cette approche se décline en deux volets : numérique et expérimental. Le volet numérique comprend les développements théoriques nécessaires dans le cas spécifique de l'hydrolyse enzymatique et les méthodes numériques appropriées de résolution de l'équation de bilan de population. La caractérisation du système par des métrologies spécifiques est visée par le volet expérimental. L'une des motivations à l'origine de ce travail est la nécessité de disposer d'un outil prédictif pouvant être utilisé pour la conception de procédés originaux dans le domaine de la biocatalyse hétérogène. Au final, ce travail a permis le développement d'un modèle générique basé sur le formalisme de bilan de population à une dimension. Ce modèle intègre les mécanismes enzymatiques élémentaires et traduit l'évolution de la distribution de taille des chaînes/particules ainsi que les cinétiques de conversion en sucres simples. Testée dans différentes conditions, l'approche proposée montre une grande robustesse et constitue, de ce fait, un premier noyau cohérent exploitable en biocatalyse comme en procédé.

L'analyse bibliographique a mis en lumière la large palette de phénomènes physiques et biologiques impliqués dans l'hydrolyse enzymatique de substrats lignocellulosiques. De cette complexité découle de sérieuses difficultés à produire des données expérimentales quantitatives et fiables. L'analyse a dans le même temps révélé que la grande majorité des études de modélisation visaient à reproduire de façon globale les résultats issus des expériences menées en réacteur fermé. Les approches les plus répandues sont basées sur des schémas cinétiques simples de type Michaelis-Menten ou des modèles d'adsorption. Plus récemment, des approches mécanistiques basées sur une description fine de la réaction

tels que les modèles stochastiques par exemple sont proposées mais restent des tentatives isolées.

L'examen approfondi d'un modèle d'adsorption-réaction, largement repris dans la littérature, montre vite ses limites. Ce modèle considère la réaction d'hydrolyse enzymatique d'un substrat particulière comme une succession de deux étapes : une première étape où le substrat est transformé en cellobiose par l'action des endoglucanases (EG) et des cellobiohydrolases (CBH) en phase hétérogène et une deuxième étape où le cellobiose est transformé en glucose par les β -glucosidases (BGL). Dans la première étape, les phénomènes d'adsorption, d'inhibition et de réactivité sont pris en compte par l'intermédiaire de paramètres ou de fonctions correctives. La deuxième étape, ayant lieu en phase homogène, est traduite par une cinétique michaelienne. La validation expérimentale du modèle est basée sur la régression de données d'hydrolyse globales (concentrations en sucres simples produits à différents instants en mode batch) pour l'identification de l'ensemble des paramètres. Si dans la littérature les chercheurs ne s'étaient pas sur la procédure numérique d'identification des paramètres du modèle, la confrontation de nos propres données expérimentales à ce type de modèle montre qu'il est sur-paramétré et, de ce fait, la procédure d'identification aboutit à un espace de solutions au lieu d'une solution unique. Cela est confirmé par une analyse statistique poussée dans le chapitre III. Ainsi, la structure simple du modèle reposant sur une variable globale du système, à laquelle des paramètres décrivant des processus ayant lieu à différentes échelles sont adjoints, n'est pas appropriée. Cela appuie notre démarche d'aller vers une approche plus avancée et mieux adaptée aux systèmes hétérogènes.

Le modèle que nous proposons repose sur le formalisme de bilan de population. Nous avons traité le cas d'une réaction d'hydrolyse enzymatique d'un substrat cellulosique. Dans un premier temps, nous avons considéré un substrat soluble. Les deux activités cellulolytiques sont prises en compte. L'activité endoglucanase (EG) est assimilée à une rupture pure aléatoire tandis que l'activité cellobiohydrolase (CBH) est modélisée comme un processus de dissolution. L'équation de bilan de population est résolue par la méthode des classes en utilisant la technique des pivots fixes pour la première activité et la technique des pivots glissant pour la deuxième. Enfin, les deux activités sont combinées dans un modèle global résolu par la technique des pivots glissants. Dans les différents cas considérés, le modèle prédit l'évolution de la distribution de taille des chaînes au cours de

l'hydrolyse ainsi que la cinétique de conversion en sucres simples. De plus, le phénomène de synergie entre les EG/CBH est reproduit numériquement. En effet, la combinaison des deux activités booste la conversion puisque la rupture des chaînes par les EG offre des extrémités supplémentaires aux CBH. Rappelons que dans ce cas, la seule limitation est la disponibilité du substrat. L'effet d'inhibition des activités enzymatiques par leur propre produit est exploré en dernier lieu. Les limites de la méthode des classes en terme de précision/temps de calcul ainsi que sa complexité lors du passage à des systèmes bi/multi-dimensionnels ont motivé le passage à la méthode des moments.

La méthode des moments sous ses différentes variantes donne accès à l'évolution temporelle des moments d'une propriété distribuée, aucune information sur la distribution elle-même n'est directement accessible. Néanmoins, des techniques de reconstruction des distributions via la connaissance d'un nombre fini de leurs moments existent. Une étude comparative de trois techniques (la technique basée sur la fonction densité du noyau Bêta, la technique basée sur les splines et la technique basée sur le maximum d'entropie) est menée avec une application dans le cas d'un processus de dépolymérisation. A l'issue de cette étude, la technique du maximum d'entropie s'avère la plus appropriée pour un couplage avec la méthode des moments pour une reconstruction simultanée des distributions au cours de la résolution. Cela est justifié par le nombre minimal de moments requis, la précision de la reconstruction et le coût de calcul très faible. Ce travail répond à la nécessité d'avoir accès à la distribution de taille durant la résolution pour des besoins de confrontation avec les données expérimentales.

La méthode de quadrature des moments directe (DQMOM) couplée avec la technique de reconstruction basée sur le maximum d'entropie est utilisée pour la résolution de l'équation de bilan de population dans le cas de l'hydrolyse enzymatique d'un substrat soluble. L'activité EG est traduite par une rupture binaire aléatoire des chaînes tandis que l'activité CBH est assimilée à un processus d'érosion aboutissant à la production du cellobiose. L'activité β -glucosidase (BGL) est incluse dans le modèle global via une cinétique michaelienne. L'effet d'inhibition des différentes activités est pris en compte. Des tests ont été conduits en considérant les activités EG et CBH séparément et en combinaison et donnent des résultats consistants avec un coût de calcul substantiellement amélioré. De même pour le modèle global où les trois activités et l'effet d'inhibition sont pris en compte. L'évolution temporelle des moments et de la distribution de taille ainsi que la cinétique

de production du cellobiose et du glucose sont accessibles.

L'extension du modèle pour un substrat particulière est explorée en dernier lieu. Dans ce cas, le processus de fragmentation est une conséquence des contraintes hydrodynamiques exercées sur les particules. En effet, les attaques EG fragilisent les particules et affectent leur force de cohésion. L'intégration de la force hydrodynamique et de la force de cohésion dynamique dans le modèle de bilan de population est proposée. L'activité CBH est traduite par un noyau d'érosion. L'approche numérique proposée est supportée par les données expérimentales. En effet, les tests de sonication montrent que la force de cohésion peut être un critère discriminant pour la caractérisation des substrats. De plus, les expériences d'hydrolyse enzymatique de substrats cellulosiques distincts soulignent l'importance d'avoir accès à la fois à l'évolution de la distribution de taille des particules et aux cinétiques de conversion en sucres simples pour une interprétation judicieuse des résultats, tâche rendue possible grâce au modèle de bilan de population développé.

Par ailleurs, les métrologies utilisées dans le cadre de ce travail visant la caractérisation (morpho)-granulométrique du substrat avant et durant sa transformation (morpho-granulométrie optique, technique FBRM, granulométrie à diffraction laser) mettent le doigt, encore une fois, sur la complexité expérimentale d'accéder à cette donnée essentielle pour la modélisation. En effet, les difficultés techniques liées à la nature du système étudié, à la gamme de mesure propre à chaque outil, son principe de fonctionnement et à la nature des données produites sont autant d'obstacles à franchir avant de disposer d'un résultat quantitatif de qualité. Des outils numériques servant à comparer les résultats des différentes techniques expérimentales ont été développés. Des études plus poussées sont nécessaires pour une meilleure exploitation de ces résultats.

Le but ultime est de disposer d'un modèle prédictif qui contribuera efficacement à la conception optimale d'un procédé de fractionnement de la biomasse lignocellulosique par voie biologique. Il interviendra notamment au niveau de la formulation des cocktails enzymatiques dans son volet compositionnel et apportera des éléments de réponse quant à la stratégie d'alimentation en biomasse/biocatalyseur à l'échelle procédé entre autres. Pour récapituler, en revenant aux enjeux soulevés dans l'introduction, cette étude dédiée aux substrats cellulosiques a permis :

- La prédiction de la production dynamique des sucres simples durant la réaction d'hydrolyse enzymatique

- La reproduction numérique de l'effet de synergie entre les enzymes
- La prédiction de l'évolution de la distribution de taille des particules du substrat durant la réaction
- De jeter les bases d'une démarche de modélisation robuste et flexible pour la prise en compte, à terme, de plusieurs hétérogénéités du système

Un certain nombre de développements ou d'études à plus ou moins long terme sont nécessaires. Tout d'abord, il serait très utile d'exploiter la base de données expérimentales combinant sucres simples et distributions granulométriques. Il s'agira de bien identifier les éventuelles améliorations à apporter au modèle et/ou au traitement des données. Dans un second temps, il serait utile d'intégrer le phénomène d'adsorption. Ceci nécessitera l'ajout d'une variable (unique ou distribuée) définissant la quantité d'enzymes libres. De là, il deviendra possible d'étudier l'intérêt d'un recyclage de la biomasse, de la phase liquide ou plus largement de simuler un fonctionnement à contre-courant comme dans une colonne d'extraction. Ce genre d'étude nécessite un couplage avec un modèle de transport. L'équipe dans laquelle ce travail a été mené dispose des outils pour réaliser cette intégration. L'association avec un outil d'optimisation constitue un développement intéressant également pour identifier des paramètres du modèle et pourra être conduit en collaboration avec d'autres équipes au sein du laboratoire. Plus largement, la mise au point d'un outil de simulation intégrant l'état et l'âge des particules ouvre des perspectives très vastes en matière de représentation des systèmes biologiques par essence dynamiques et hétérogènes.

Annexe A

Transformation d'une PSD en CLD et inversement

Depuis une vingtaine d'année, la technique FBRM est utilisée pour le suivi *in-situ* et en temps réel des systèmes particuliers pour différentes applications (e.g. précipitation, cristallisation, polymérisation). Néanmoins, contrairement aux appareils classiques d'analyse granulométrique qui donnent directement la distribution de taille (PSD), les sondes FBRM fournissent, grâce à leur principe de fonctionnement, des distribution de cordes (CLD) sans aucun lien direct avec les PSD correspondantes comme expliqué dans le Chapitre II.

De ce fait, différentes études ont été conduites dans le but de remonter aux PSD à partir des CLD données par les sondes en adoptant différentes stratégies (Langston *et al.*, 2001; Li & Wilkinson, 2005; Worlitschek *et al.*, 2005; Ruf *et al.*, 2000).

A.1 PSD-CLD : Solution analytique

Li et Wilkinson proposent un modèle pour générer la CLD d'une PSD de particules ayant une géométrie connue et régulière (sphérique, ellipsoïde, ...) en considérant leur projection 2D sur un plan (Li & Wilkinson, 2005).

Considérons une population de particules avec un diamètre caractéristique D compris entre D_{min} et D_{max} ayant fonction densité en nombre $n(D)$. Le nombre de particules $N_i(D)$ dans la classe i tel que $D_i \leq D < D_{i+1}$ se calcule selon l'équation (A.1) :

$$N_i(D) = N_{\bar{D}_i} = N_p \int_{D_i}^{D_{i+1}} n(D) dD = N_p n_i \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (\text{A.1})$$

N_p est le nombre total de particules de la population considérée, N est le nombre de classes de diamètres avec $D_1 = D_{min}$ et $D_{N+1} = D_{max}$. Nous considérons que toutes les particules d'une classe donnée i ont un même diamètre \bar{D}_i qui est le pivot de la classe qui peut être par exemple la moyenne arithmétique $\frac{1}{2}(D_i + D_{i+1})$ ou géométrique $\sqrt{D_i \times D_{i+1}}$ des deux bornes de la classe en question. $N_{\bar{D}_i}$ est le nombre de particules dans la classe i et $n_i = N_{\bar{D}_i}/N_p$ est la fraction en nombre de ces particules de diamètre caractéristique \bar{D}_i (dans la classe i).

Par analogie à la PSD, la CLD, noté $c(L)$ dont les longueurs de cordes L sont comprises entre une taille minimale L_{min} et une taille maximale L_{max} , est divisée en M classes. Toutes les cordes M d'une même classe j tel que $M_j \leq L < M_{j+1}$ sont considérées comme ayant la même longueur \bar{L}_j définie comme la moyenne arithmétique ou géométrique de la classe. Le nombre de cordes $M_{\bar{L}_j}$ dans la classe j est donné par la relation suivante :

$$M_j(L) = M_{\bar{L}_j} = M_c \int_{L_j}^{L_{j+1}} c(L) dL = M_c c_j \quad j = 1, 2, \dots, M \quad (\text{A.2})$$

M_c est le nombre total de cordes détectées, $c_j = \frac{M_{\bar{L}_j}}{M_c}$ est la fraction de cordes de la j^{me} classe. Pour une particule ayant un diamètre D_i , la probabilité qu'elle soit à l'origine d'une corde de longueur comprise entre L_j et L_{j+1} est :

$$P_{\bar{D}_i}(L_j, L_{j+1}) = P_{\bar{D}_i}(L_{j+1}) - P_{\bar{D}_i}(L_j), \quad i = 1, 2, \dots, N \quad \text{et} \quad j = 1, 2, \dots, M \quad (\text{A.3})$$

Où $P_{\bar{D}_i}(L)$ désigne la probabilité de mesurer une longueur de corde inférieure ou égale à L sur une particule de taille \bar{D}_i .

A partir de là, le nombre de cordes $M_{\bar{L}_j}$ dans la classe j prend en compte la contribution de la population de particules et peut se calculer avec la relation suivante :

$$M_{\bar{L}_j} = \sum_{i=1}^N N_{\bar{D}_i} P_{\bar{D}_i} = N_p A_j X \quad (\text{A.4})$$

Avec $A_j = [a_{j,1} a_{j,2} \dots a_{j,i} \dots a_{j,N}]$, $a_{i,j} = P_{\bar{D}_i}(L_j, L_{j+1})$, $X = [n_1 n_2 \dots n_i \dots n_N]^T$.

L'équation (A.4) peut être écrite sous une forme plus simple :

$$C = \frac{N_p}{M_c} AX \quad (\text{A.5})$$

Avec $A_j = \begin{bmatrix} A_1 \\ \vdots \\ A_j \\ \vdots \\ A_M \end{bmatrix}$ est la matrice des probabilités de taille $M \times N$,

$C = \begin{bmatrix} c_1 \\ \vdots \\ c_j \\ \vdots \\ c_M \end{bmatrix}$ est un vecteur de taille M (CLD) et X un vecteur de taille N (PSD).

La matrice A permet le passage analytique d'une PSD à sa CLD associée.

A.1.1 Cas de particules sphériques

Considérons une population de particules sphériques caractérisées par leurs diamètres $2a_i$. La probabilité d'avoir une corde de longueur L_j (Figure A.1) est donnée par l'équation ci-dessous :

$$P = \begin{cases} \sqrt{1 - \left(\frac{L_j}{2a_i}\right)^2} & \text{si } L_j \leq 2a_i \\ 0 & \text{si } L_j > 2a_i \end{cases} \quad (\text{A.6})$$

De là, on déduit la probabilité que la corde soit dans la classe (L_j, L_{j+1}) :

$$P_{D_i}(L_j, L_{j+1}) = \begin{cases} \sqrt{1 - \left(\frac{L_j}{2a_i}\right)^2} - \sqrt{1 - \left(\frac{L_{j+1}}{2a_i}\right)^2} & \text{si } L_j < L_{j+1} \leq 2a_i \\ \sqrt{1 - \left(\frac{L_j}{2a_i}\right)^2} & \text{si } L_j \leq 2a_i < L_{j+1} \\ 0 & \text{si } 2a_i < L_j < L_{j+1} \end{cases} \quad (\text{A.7})$$

A.1.2 Modèle CLD-PSD : Problème inverse

Pour transformer une CLD en PSD, nous allons effectuer le travail inverse de ce qui a été développé jusque-là. Il suffit donc d'inverser le système dans l'équation (A.5) pour

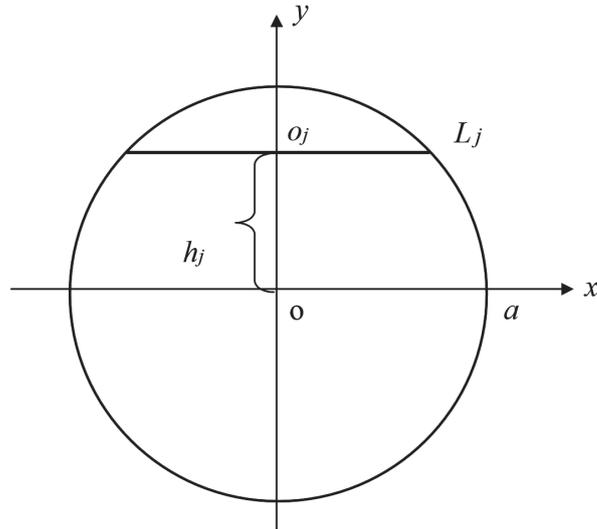


FIGURE A.1 – *Projection 2D d'une particule sphérique*

avoir la PSD \hat{X} en fonction de la CLD :

$$\hat{X} = (A^T A)^{-1} A^T C \quad (\text{A.8})$$

Cette méthode conduit généralement à des résultats oscillants car il s'agit d'un problème de matrice mal conditionnée. En effet, si la matrice $A^T A$ n'est pas inversible ou bien la CLD est perturbée par un bruit, la PSD calculée sera instable. Hormis l'utilisation de la méthode des moindres carrés, d'autres techniques ont été testées pour remédier à ce problème, on note notamment les algorithmes des moindres carrés sous contraintes et les méthodes itératives reposant sur le théorème de Bayes (Simmons *et al.*, 1999; Langston *et al.*, 2001; Langston, 2002; Wynn, 2003; Worlitschek *et al.*, 2005).

Une contrainte de lissage dans le cas des moindres carrés sous contraintes est utilisée pour imposer que la solution soit *lisse* c'est-à-dire ne présente pas d'irrégularité brutale. Un coefficient λ est introduit et on cherche à minimiser la fonction (A.9) :

$$\min \left\{ \|A\hat{X} - C\|^2 + \lambda \|\hat{X}\|^2 \right\} \quad (\text{A.9})$$

Cette contrainte s'exprime sous la forme matricielle suivante :

$$\hat{X} = (A^T A + \lambda B)^{-1} A^T C \quad (\text{A.10})$$

Néanmoins, cette méthode n'assure pas que toutes les valeurs de la PSD calculées soient

positives (Worlitschek *et al.*, 2005; Li & Wilkinson, 2005; Le Ba, 2009). Li et Wilkinson imposent une contrainte complémentaire (Non-Negative Least Squares Problem) pour que la PSD obtenue ne contienne aucune valeur négative (Li & Wilkinson, 2005).

$$\min f(x) = \|AX - C\|^2, \quad X_i \geq 0, i = 1, 2, \dots, N \quad (\text{A.11})$$

A.1.3 Résultats numériques

Pour les besoins du test, nous avons choisi une PSD de forme simple donnée par une gaussienne centrée sur une taille de 100 μm et avec un écart-type de 20. Les classes des tailles et des cordes suivent une loi arithmétique de premier terme $u_0 = 0$ et de raison $q = 1$.

Nous donnons dans la Figure A.2 les résultats numériques obtenus à partir de la solution analytique développée précédemment dans le cas d’une population de particules sphériques en termes de génération de la CLD associée et le travail inverse.

La distribution en bleu représente la CLD issue de la PSD suivant une loi gaussienne. Sa forme fortement asymétrique avec un prolongement vers les petites tailles est la signature de l’ensemble des cordes possibles de longueur inférieure ou égale aux diamètres des particules mères que le laser de la sonde peut croiser d’une façon complètement aléatoire. Nous notons bien qu’aucune corde n’est plus longue que la plus grande particule de la PSD puisque le diamètre d’une particule sphérique est sa plus longue corde possible.

A partir de la CLD et en faisant le travail inverse (équation (A.8)), nous retombons bien sur la PSD initiale (petits ronds sur le graphique). Dans ce cas, étant donné la simplicité de la forme des particules, l’inversion de la matrice du système ne pose pas de problème.

A.2 PSD-CLD : Traitement d’image

L’existence d’une solution analytique donnant la CLD associée à une PSD n’est garantie que dans le cas où la forme des particules est simple. Dans le cas de particules ayant une forme quelconque, le problème devient complexe et n’admet pas de solution analytique d’où la nécessité de chercher des alternatives puisque nos matrices cellulodiques sont composées de particules non-sphériques.

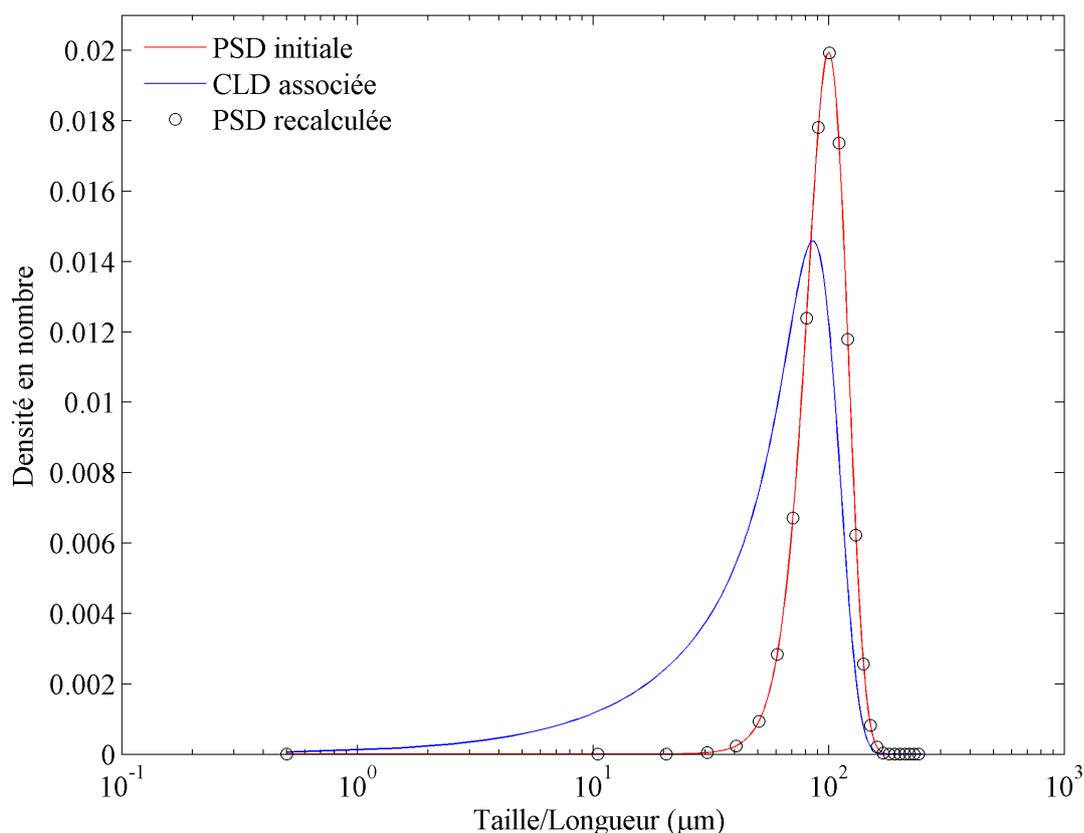


FIGURE A.2 – Génération de la CLD d’une PSD et inversement dans le cas de particules de forme sphérique

La technique proposée ici est l’exploitation des données issues de la morpho- granulométrie pour développer un outil numérique capable de générer une CLD à partir des images de particules. Le principe de cette technique ainsi que sa validation sont développés ci-après.

A.2.1 Principe de la technique

La technique est basée sur un traitement particulier d’un lot d’images de particules. Les différentes étapes de la procédure sont décrites dans l’algorithme donné dans la Figure A.3. Pour mimer le caractère aléatoire de la génération des cordes, à partir du lot de particules, une seule est sélectionnée par un tirage aléatoire, ce qui est équivalent au passage de la particule à côté de la sonde FBRM.

Cette particule en mouvement présente un certain côté face à la sonde d’où la génération d’une orientation aléatoire de l’image. Une fois ce travail fait, l’image de la particule

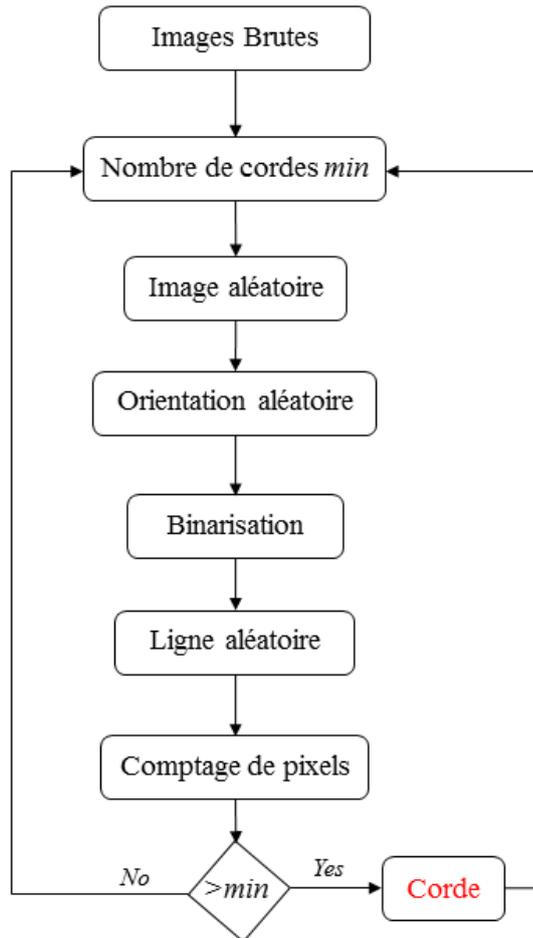


FIGURE A.3 – Schéma global de l’algorithme de génération des cordes à partir du traitement d’images de particules

est binarisée sous forme de matrice pour les besoins du traitement. L’endroit exact de la coupe du laser est généré aussi aléatoirement donnant la ligne de la matrice concernée. Par un simple comptage de pixels, nous remontons à la longueur de la corde générée. Si cette corde est inférieure à la limite de détection de la sonde, elle n’est pas prise en compte. Ce travail est effectué jusqu’à ce que la CLD finale soit stable.

Ce traitement est effectué sous *Matlab* en utilisant la *Toolbox Image Processing*.

A.2.2 Validation de la technique

La validation de cette technique se fait par comparaison avec le résultat obtenu via la solution analytique présentée précédemment. En effet, si nous nous plaçons dans le cas de particules sphériques, nous pourrions confronter les deux méthodes.

Nous présentons dans la figure A.4 une comparaison entre les deux méthodes dans le

cas de particules sphériques monodisperses de diamètre $100 \mu\text{m}$. La solution analytique est donnée aussi par (Li & Wilkinson, 2005). La distribution des classes suit une loi géométrique de premier terme $u_0 = 1$ et de raison $q = 1.1938$.

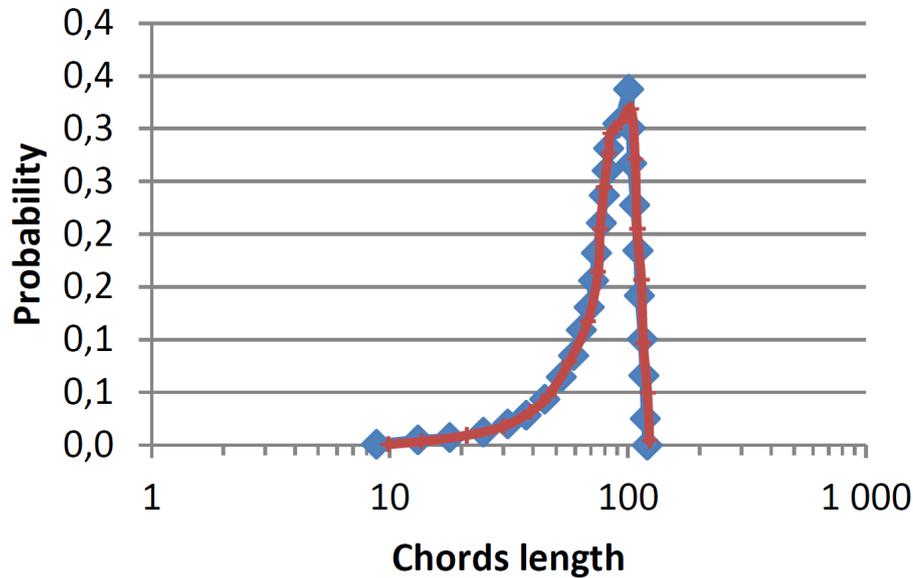


FIGURE A.4 – Comparaison des CLDs issues de la solution analytique (rouge) et par traitement d’images (bleu)

Comme nous le constatons bien sur la Figure A.4, les deux méthodes donne sensiblement le même résultat avec des particules sphériques, ce qui valide l’approche par le traitement d’image proposée. De ce fait, cette deuxième technique peut être étendue pour le cas de particules ayant une forme quelconque. Par contre, le chemin inverse (CLD→PSD) n’est pas possible dans ce cas.

La mise en œuvre et la validation numérique de cette technique ont été effectuées par Larissa Brito, Maxime Cartier, Simon Deslandes et Géraud De Villeneuve dans le cadre d’un Projet d’Initiation à la Recherche (PIR) 4A au Département Génie des Procédés et Environnement (INSAT) que j’ai co-encadré.

Annexe B

Algorithme Produit-Différence (PD)

Nous donnons dans cette annexe une description succincte de l'algorithme Produit-Différence (PD) utilisé pour accéder aux poids (w_i) et aux abscisses (L_i) nécessaires pour le calcul des moments dans la méthode QMOM et pour l'initialisation de la méthode DQMOM. Pour plus de détails, le lecteur peut consulter ([Gordon, 1968](#)).

B.1 Principe de l'algorithme

Nous décrivons les différentes étapes de l'algorithme PD basé sur un ensemble de moments normalisés par le moment d'ordre 0. La première étape consiste à construire une matrice P de taille $2N + 1$ ayant pour composantes $P_{i,j}$ qui sont les combinaisons des moments telles que :

$$\begin{cases} P_{i,1} = \delta_{i1} & i \in 1, \dots, 2N + 1 \\ P_{i,2} = (-1)^{i-1} m_{i-1} & i \in 1, \dots, 2N + 1 \\ P_{i,j} = P_{1,j-1}P_{i+1,j-2} - P_{1,j-2}P_{i+1,j-1}, & j \in 3, \dots, 2N + 1, i \in 1, \dots, 2N + 2 - j \end{cases} \quad (\text{B.1})$$

où δ_{i1} est le symbole de Kronecker.

A titre d'exemple, dans le cas d'une quadrature avec deux points $N = 2$, la matrice P est donnée dans l'équation (B.2) :

$$P = \begin{bmatrix} 1 & 1 & m_1 & m_2 - m_1^2 & m_3 m_1 - m_2^2 \\ 0 & -m_1 & -m_2 & -m_3 + m_2 m_1 & 0 \\ 0 & m_2 & m_3 & 0 & 0 \\ 0 & -m_3 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{B.2})$$

La seconde étape consiste à générer un vecteur α de taille $2N$ et dont la première composante est nulle ($\alpha_1 = 0$) et les autres composantes se calculent comme suit :

$$\alpha_i = \frac{P_{1,i+1}}{P_{1,i}P_{1,i-1}}, \quad i \in 2, \dots, 2N \quad (\text{B.3})$$

Dans la troisième étape, une matrice tridiagonale symétrique est construite à partir du vecteur α dont les termes diagonaux a_i et codiagonaux b_i sont :

$$\begin{cases} a_1 = \alpha_2 \\ a_i = \alpha_{2i} + \alpha_{2i-1} & i \in 2, \dots, N \\ b_i = -\sqrt{\alpha_{2i+1}\alpha_{2i}} & i \in 1, \dots, N-1 \end{cases} \quad (\text{B.4})$$

La génération des abscisses L_i et des poids w_i se fait par le calcul des valeurs et des vecteurs propres de la matrice. Les valeurs propres sont les abscisses L_i et les poids sont calculés :

$$w_i = m_0 v_{i1}^2 \quad (\text{B.5})$$

où v_{i1} est la première composante du i^{me} vecteur propre.

B.2 Exemple : une distribution gaussienne

Pour illustrer le résultat de cet algorithme, nous prenons une distribution gaussienne (équation (IV.82)) ayant comme moyenne $\mu = 10$ et un écart-type de $\sigma = 2$. Pour une quadrature à trois points ($N = 3$), les poids sont $w_1 = w_3 = \frac{1}{6}$ et $w_2 = \frac{2}{3}$ et les abscisses L_i sont :

$$\begin{cases} L_1 = \mu - \sqrt{3}\sigma = 10 - 2\sqrt{3} \approx 6.54 \\ L_2 = \mu = 10 \\ L_3 = \mu + \sqrt{3}\sigma = 10 + 2\sqrt{3} \approx 13.46 \end{cases} \quad (\text{B.6})$$

Comme nous pouvons le voir sur la Figure B.1, les poids (w_i) ne sont pas des estimations de $n(L_i)$ mais donnent une information qualitative sur la densité $n(L)$ (e.g. symétrie, présence d'un pic).

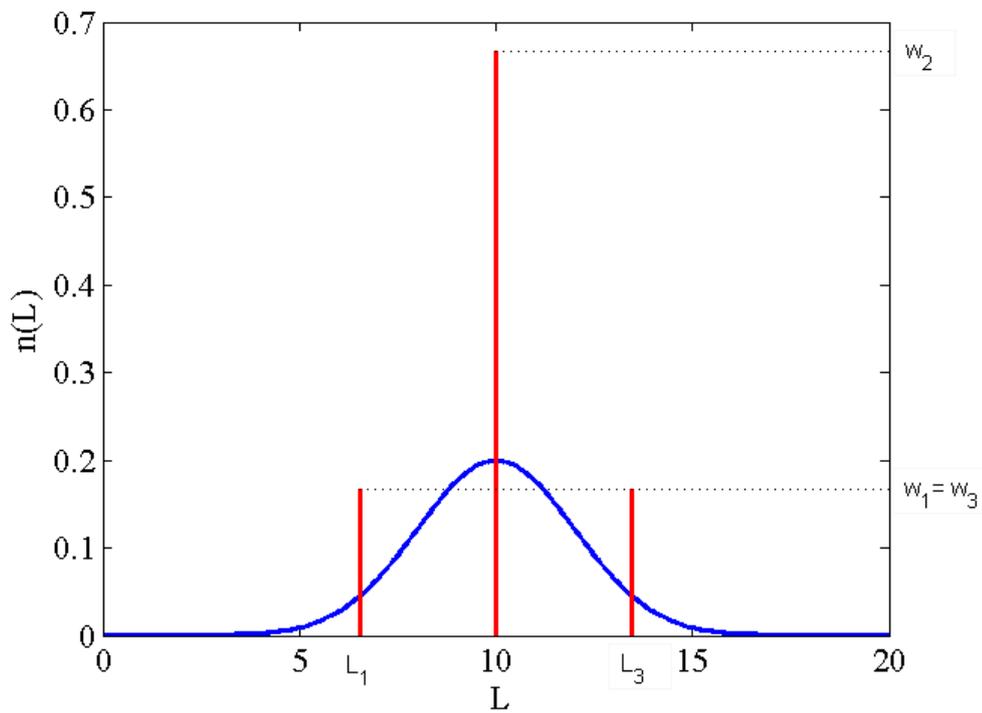


FIGURE B.1 – *Abscisses et poids calculés via l'algorithme PD pour une distribution gaussienne*

References

- ADAPA, PHANI KUMAR, KARUNAKARAN, CHITHRA, TABIL, LOPE G., & SCHOENAU, GREG J. 2009. Potential applications of infrared and Raman spectromicroscopy for agricultural biomass. *Agricultural Engineering International : CIGR Journal*.
- AGARWAL, U. P., REINER, R. S., & RALPH, S. A. 2010. Cellulose I crystallinity determination using FT-Raman spectroscopy : univariate and multivariate methods. *Cellulose*, **17**(4), 721–733.
- AGIMELEN, OKPEAFOH S., HAMILTON, PETER, HALEY, IAN, NORDON, ALISON, VASILE, MASSIMILIANO, SEFCIK, JAN, & MULHOLLAND, ANTHONY J. 2015a. Estimation of particle size distribution and aspect ratio of non-spherical particles from chord length distribution. *Chemical Engineering Science*, **123**, 629–640.
- AGIMELEN, OKPEAFOH S., JAWOR-BACZYNSKA, ANNA, MCGINTY, JOHN, TACHTATZIS, CHRISTOS, DZIEWIERZ, JERZY, HALEY, IAN, SEFCIK, JAN, & MULHOLLAND, ANTHONY J. 2015b. Integration of in situ Imaging and Chord Length Distribution Measurements for Estimation of Particle Size and Shape. *arXiv :1505.03320 [physics]*, May. arXiv : 1505.03320.
- ALLEN, T. 1997. *Particle size measurement : Volume 1. Powder sampling and particle size determination*. London, Chapman & Hall.
- ALVIRA, PETAL, TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., & NEGRO, M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : a review. *Bioresource technology*, **101**(13), 4851–4861.
- ANDREAUS, JUERGEN, AZEVEDO, H., & CAVACO-PAULO, A. 1999. Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes. *Journal of molecular catalysis B : Enzymatic*, **7**(1), 233–239.
- ANDRIĆ, PAVLE, MEYER, ANNE S., JENSEN, PETER A., & DAM-JOHANSEN, KIM. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis : II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors. *Biotechnology Advances*, **28**(3), 407–425.
- ANDRIC, P., MEYER, A. S., JENSEN, P. A., & DAM-JOHANSEN, K. 2010. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis : I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology advances*, **28**(3), 308–324.

- ANGARITA, J. D., SOUZA, R. B. A., CRUZ, A. J. G., JR., E. C. BISCAIA, & SECCHI, A. R. 2015. Kinetic Modeling for Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Sugarcane Straw. *Biochemical Engineering Journal*.
- ARANTES, VALDEIR, & SADDLER, JACK N. 2011. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for biofuels*, **4**(1), 1–17.
- ASZTALOS, ANDREA, DANIELS, MARCUS, SETHI, ANURAG, SHEN, TONGYE, LANGAN, PAUL, REDONDO, ANTONIO, & GNANAKARAN, SANDRASEGARAM. 2012. A coarse-grained model for synergistic action of multiple enzymes on cellulose. *Biotechnol Biofuels*, **5**(1), 55–55.
- ATHANASSOULIS, G. A., & GAVRILIADIS, P. N. 2002. The truncated Hausdorff moment problem solved by using kernel density functions. *Probabilistic Engineering Mechanics*, **17**(3), 273–291.
- AVRAMIDIS, ST, & SIAU, J. F. 1987. An investigation of the external and internal resistance to moisture diffusion in wood. *Wood Science and Technology*, **21**(3), 249–256.
- BALAT, MUSTAFA. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway : A review. *Energy Conversion and Management*, **52**(2), 858–875.
- BANSAL, PRABUDDHA. 2011. Computational and experimental investigation of the enzymatic hydrolysis of cellulose.
- BANSAL, PRABUDDHA, HALL, MÉLANIE, REALFF, MATTHEW J., LEE, JAY H., & BOMMARIUS, ANDREAS S. 2009. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*, **27**(6), 833–848.
- BANSAL, PRABUDDHA, HALL, MÉLANIE, REALFF, MATTHEW J., LEE, JAY H., & BOMMARIUS, ANDREAS S. 2010. Multivariate statistical analysis of X-ray data from cellulose : a new method to determine degree of crystallinity and predict hydrolysis rates. *Bioresource technology*, **101**(12), 4461–4471.
- BANSAL, PRABUDDHA, VOWELL, BRYAN J., HALL, MÉLANIE, REALFF, MATTHEW J., LEE, JAY H., & BOMMARIUS, ANDREAS S. 2012. Elucidation of cellulose accessibility, hydrolysability and reactivity as the major limitations in the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*, **107**(0), 243–250.
- BATTERHAM, R. J., HALL, J. S., & BARTON, G. 1981. Pelletizing kinetics and simulation of full scale balling circuits. In : *Proceedings of the 3rd International Symposium on Agglomeration*, vol. 136. Nurnberg W. Germany.
- BELDMAN, G., VORAGEN, A. G. J., ROMBOUTS, F. M., & PILNIK, W. 1988. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**(2), 173–178.
- BELTRAME, PIER LUIGI, CARNITI, PAOLO, FOCHER, BONAVENTURA, MARZETTI, ANNAMARIA, & SARTO, VIRGINIO. 1984. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials : A kinetic study. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**(10), 1233–1238.
- BERLIOZ, SOPHIE. 2007. *Etude de l'estérification de la cellulose par une synthèse sans solvant. Application aux matériaux nanocomposites*. Ph.D. thesis, Université Joseph-Fourier-Grenoble I.

- BETRABET, S. M., & PARALIKAR, K. M. 1977. Effect of cellulase on the morphology and fine structure of cellulosic substrates. 1. wheat straw pulp. *Cellulose Chem Technol*, **11**, 615–625.
- BEZERRA, RUI MF, & DIAS, ALBINO A. 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, **126**(1), 49–59.
- BREUIL, C., CHAN, M., & SADDLER, J. N. 1990. Comparison of the hydrolytic activity of commercial cellulase preparations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**(1), 31–35.
- BRITTAİN, HARRY G. 2001. Particle-size distribution. Part I. Representations of particle representations of partide shape, size, and distribution. *Pharmaceutical technology*, **25**(12), 38–45.
- BUBNER, PATRICIA, PLANK, HARALD, & NIDETZKY, BERND. 2013. Visualizing cellulase activity. *Biotechnology and bioengineering*, **110**(6), 1529–1549.
- CATALDI, TOMMASO RI, CAMPA, CRISTIANA, & DE BENEDETTO, GIUSEPPE E. 2000. Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection : The potential is still growing. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, **368**(8), 739–758.
- CHANG, VINCENT S., & HOLTZAPPLE, MARK T. 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Pages 5–37 of : Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer.
- CHAUVE, MARIE. 2011. *Modélisation cinétique de l'hydrolyse enzymatique des substrats celluloses*. Ph.D. thesis, INSA, Toulouse.
- CHAUVE, MARIE, MATHIS, HUGUES, HUC, DELPHINE, CASANAVE, DOMINIQUE, MONOT, FRÉDÉRIC, & FERREIRA, NICOLAS LOPES. 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*, **3**(1), 3.
- CHEN, LIMEI, WILSON, REGINALD H., & MCCANN, MAUREEN C. 1997. Investigation of macromolecule orientation in dry and hydrated walls of single onion epidermal cells by FTIR microspectroscopy. *Journal of molecular structure*, **408**, 257–260.
- CHEN, YAO, STIPANOVIC, ARTHUR J., WINTER, WILLIAM T., WILSON, DAVID B., & KIM, YOUNG-JUN. 2007a. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. *Cellulose*, **14**(4), 283–293.
- CHEN, YAO, STIPANOVIC, ARTHUR J., WINTER, WILLIAM T., WILSON, DAVID B., & KIM, YOUNG-JUN. 2007b. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. *Cellulose*, **14**(4), 283–293.
- CHEN, YI, WEN, YUE, ZHOU, JUNWEI, XU, CHAO, & ZHOU, QI. 2012. Effects of pH on the hydrolysis of lignocellulosic wastes and volatile fatty acids accumulation : The contribution of biotic and abiotic factors. *Bioresource technology*, **110**, 321–329.
- CHINGA-CARRASCO, GARY, JOHNSEN, PER OLAV, & ØYAAS, KARIN. 2010. Structural quantification of wood fibre surfaces—Morphological effects of pulping and enzymatic treatment. *Micron*, **41**(6), 648–659.
- CIOLACU, D., CIOLACU, F., & POPA, V. I. 2011. Amorphous cellulose—Structure and characterization. *Cellulose Chemistry and Technology*, **45**(1), 13.

- CLESCERI, L. S., SINITSYN, A. P., SAUNDERS, A. M., & BUNGAY, H. R. 1985. Recycle of the cellulase—enzyme complex after hydrolysis of steam-exploded wood. *Applied biochemistry and biotechnology*, **11**(6), 433–443.
- COLE, SYDNEY WILLIAM. 1933. The determination of reducing sugars by titration of ferricyanide. *Biochemical Journal*, **27**(3), 723.
- COLOM, X., CARRILLO, F., NOGUÉS, F., & GARRIGA, P. 2003. Structural analysis of photo-degraded wood by means of FTIR spectroscopy. *Polymer Degradation and Stability*, **80**(3), 543–549.
- CONVERSE, A. O., OOSHIMA, H., & BURNS, D. S. 1990. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on lignin and cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **24**(1), 67–73.
- COSGROVE, DANIEL J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, **6**(11), 850–861.
- COWARD-KELLY, GUILLERMO, AIELLO-MAZZARI, CATERYNA, KIM, SEHOON, GRANDA, CESAR, & HOLTZAPPLE, MARK. 2003. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity. *Biotechnology and bioengineering*, **82**(6), 745–749.
- DAS, KUNAL, RAY, DIPAN, BANDYOPADHYAY, N. R., & SENGUPTA, SUPARNA. 2010. Study of the Properties of Microcrystalline Cellulose Particles from Different Renewable Resources by XRD, FTIR, Nanoindentation, TGA and SEM. *Journal of Polymers and the Environment*, **18**(3), 355–363.
- DASARI, RAJESH K., & BERSON, R. ERIC. 2007. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **137-140**(1-12), 289–299.
- DE SOUZA, L. G. M., JANIGA, G., JOHN, V., & THÉVENIN, D. 2010. Reconstruction of a distribution from a finite number of moments with an adaptive spline-based algorithm. *Chemical Engineering Science*, **65**(9), 2741–2750.
- DECKER, STEPHEN R., ADNEY, WILLIAM S., JENNINGS, EDWARD, VINZANT, TODD B., & HIMMEL, MICHAEL E. 2003. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Pages 689–703 of : Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer.
- DEL RIO, LUIS F., CHANDRA, RICHARD P., & SADDLER, JACK N. 2012. Fibre size does not appear to influence the ease of enzymatic hydrolysis of organosolv-pretreated softwoods. *Bioresource technology*, **107**, 235–242.
- DIEMER, R. B., & OLSON, J. H. 2002. A moment methodology for coagulation and breakage problems : Part 2—moment models and distribution reconstruction. *Chemical Engineering Science*, **57**(12), 2211–2228.
- DRISSEN, R. E. T., MAAS, R. H. W., VAN DER MAAREL, M. J. E. C., KABEL, M. A., SCHOLS, H. A., TRAMPER, J., & BEEFTINK, H. H. 2007. A generic model for glucose production from various cellulose sources by a commercial cellulase complex. *Biocatalysis and Biotransformation*, **25**(6), 419–429.

- EDWARDS, H.G.M., FARWELL, D.W., & WEBSTER, D. 1997. FT Raman microscopy of untreated natural plant fibres. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **53**(13), 2383–2392.
- EMANDI, ANA, ILEANA VASILIU, CRISTINA, BUDRUGEAC, PETRU, & STAMATIN, IOAN. 2011. Quantitative investigation of wood composition by integrated FT-IR and thermogravimetric methods. *Cellulose Chemistry and Technology*, **45**(9), 579.
- EREMEEVA, TATYANA. 2003. Size-exclusion chromatography of enzymatically treated cellulose and related polysaccharides : a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **56**(1–3), 253–264.
- ERIKSSON, T., BÖRJESSON, J., & TJERNELD, F. 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**(3), 353–364.
- ESSENDUBI, MOHAMMED. 2007. *Identification et typage par (micro) spectroscopie IRTF des levures du genre Candida d'origine clinique*. Ph.D. thesis, Reims.
- EVANS, ROBERT, & WALLIS, ADRIAN F. A. 1989. Cellulose molecular weights determined by viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, **37**(8), 2331–2340.
- FAIX, OSKAR. 1988. Practical uses of FTIR spectroscopy in wood science and technology. *Microchimica Acta*, **94**(1-6), 21–25.
- FAN, L. T., & LEE, YONG-HYUN. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose : Derivation of a mechanistic kinetic model. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**(11), 2707–2733.
- FAN, L. T., LEE, YONG-HYUN, & BEARDMORE, DAVID H. 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose : Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **22**(1), 177–199.
- FAN, L. T., LEE, Y.-H., & BEARDMORE, D. R. 1981. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **23**(2), 419–424.
- FLORES-SÁNCHEZ, ARACELI, FLORES-TLACUAHUAC, ANTONIO, & PEDRAZA-SEGURA, LORENA L. 2013. Model-based experimental design to estimate kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **52**(13), 4834–4850.
- GAN, Q, ALLEN, S. J, & TAYLOR, G. 2003. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose : an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, **38**(7), 1003–1018.
- GANESH, K., JOSHI, J. B., & SAWANT, S. B. 2000. Cellulase deactivation in a stirred reactor. *Biochemical engineering journal*, **4**(2), 137–141.
- GARCÍA-APARICIO, MARÍA P., BALLESTEROS, MERCEDES, MANZANARES, PALOMA, BALLESTEROS, IGNACIO, GONZÁLEZ, ALBERTO, & NEGRO, M. JOSÉ. 2007. Xylanase contribution to the efficiency of cellulose enzymatic hydrolysis of barley straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, **137**(1-12), 353–365.
- GAVRILIADIS, P. N., & ATHANASSOULIS, G. A. 2003. Moment data can be analytically completed. *Probabilistic engineering mechanics*, **18**(4), 329–338.

- GHARPURAY, M. M., LEE, YONG-HYUN, & FAN, L. T. 1983. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**(1), 157–172.
- GHOSE, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, **59**(2), 257–268.
- GORDON, ROY G. 1968. Error bounds in equilibrium statistical mechanics. *Journal of Mathematical Physics*, **9**(5), 655–663.
- GREGG, D., & SADDLER, JN. 1995. Bioconversion of lignocellulosic residue to ethanol : Process flowsheet development. *Biomass and Bioenergy*, **9**(1–5), 287–302.
- GRETHLEIN, H. E., ALLEN, D. C., & CONVERSE, A. O. 1984. A comparative study of the enzymatic hydrolysis of acid-pretreated white pine and mixed hardwood. *Biotechnology and bioengineering*, **26**(12), 1498–1505.
- GRETHLEIN, HANS E. 1985. The Effect of Pore Size Distribution on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Substrates. *Nature Biotechnology*, **3**(2), 155–160.
- GRIGGS, ANDREW J., STICKEL, JONATHAN J., & LISCHESKE, JAMES J. 2012a. A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics I : Depolymerization by EGI and CBHI. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**(3), 665–675.
- GRIGGS, ANDREW J., STICKEL, JONATHAN J., & LISCHESKE, JAMES J. 2012b. A mechanistic model for enzymatic saccharification of cellulose using continuous distribution kinetics II : Cooperative enzyme action, solution kinetics, and product inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, **109**(3), 676–685.
- GROHMANN, K., MITCHELL, D. J., HIMMEL, M. E., DALE, B. E., & SCHROEDER, H. A. 1989. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **20**(1), 45–61.
- GUPTA, RAJESH, & LEE, Y. Y. 2009. Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. *Biotechnology and bioengineering*, **102**(6), 1570–1581.
- GUSAKOV, ALEXANDER V., KONDRATYEVA, ELENA G., & SINITSYN, ARKADY P. 2011. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International journal of analytical chemistry*, **2011**.
- ÖHGREN, KARIN, BURA, RENATA, SADDLER, JACK, & ZACCHI, GUIDO. 2007. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource technology*, **98**(13), 2503–2510.
- HILDEN, LARS, & JOHANSSON, GUNNAR. 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnology letters*, **26**(22), 1683–1693.
- HIMMEL, MICHAEL E., & OTHERS. 2009. *Biomass recalcitrance : deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Wiley-Blackwell.
- HODGE, DAVID B., KARIM, M. NAZMUL, SCHELL, DANIEL J., & McMILLAN, JAMES D. 2009. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, **152**(1), 88–107.

- HOLTZAPPLE, MARK, COGNATA, MONA, SHU, YUANCAI, & HENDRICKSON, CHRISTIE. 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, **36**(3), 275–287.
- HOLTZAPPLE, MARK T., CARAM, HUGO S., & HUMPHREY, ARTHUR E. 1984. Determining the inhibition constants in the HCH-1 model of cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**(7), 753–757.
- HONG, JIONG, YE, XINHAO, & ZHANG, Y.-H. PERCIVAL. 2007. Quantitative Determination of Cellulose Accessibility to Cellulase Based on Adsorption of a Nonhydrolytic Fusion Protein Containing CBM and GFP with Its Applications. *Langmuir*, **23**(25), 12535–12540.
- HOSHINO, EIICHI, SHIROISHI, MASAHIRO, AMANO, YOSHIHIKO, NOMURA, MASAFUMI, & KANDA, TAKAHISA. 1997. Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **84**(4), 300–306.
- HOSSEINI, SEYED ALI, & SHAH, NILAY. 2011a. Enzymatic hydrolysis of cellulose part II : Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model. *Biomass and Bioenergy*, **35**(9), 3830–3840.
- HOSSEINI, SEYED ALI, & SHAH, NILAY. 2011b. Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I : Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase. *Biomass and Bioenergy*, **35**(9), 3841–3848.
- HOUNSLOW, M. J., RYALL, R. L., & MARSHALL, V. R. 1988. A discretized population balance for nucleation, growth, and aggregation. *AIChE Journal*, **34**(11), 1821–1832.
- HUANG, ANDREW A. 1975. Kinetic studies on insoluble cellulose–cellulase system. *Biotechnology and Bioengineering*, **17**(10), 1421–1433.
- HULBURT, HO M., & KATZ, STANLEY. 1964. Some problems in particle technology : A statistical mechanical formulation. *Chemical Engineering Science*, **19**(8), 555–574.
- HULT, EVA-LENA, LARSSON, PER TOMAS, & IVERSEN, TOMMY. 2000. A comparative CP/-MAS 13C-NMR study of cellulose structure in spruce wood and kraft pulp. *Cellulose*, **7**(1), 35–55.
- INGESSON, HANNA, ZACCHI, GUIDO, YANG, BIN, ESTEGHLALIAN, ALI R., & SADDLER, JOHN N. 2001. The effect of shaking regime on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of biotechnology*, **88**(2), 177–182.
- JEOH, TINA, WILSON, DAVID B., & WALKER, LARRY P. 2002. Cooperative and Competitive Binding in Synergistic Mixtures of *Thermobifida fusca* Cellulases Cel5A, Cel6B, and Cel9A. *Biotechnology Progress*, **18**(4), 760–769.
- JOHN, V., ANGELOV, I., ÖNCÜL, A. A., & THÉVENIN, D. 2007. Techniques for the reconstruction of a distribution from a finite number of its moments. *Chemical Engineering Science*, **62**(11), 2890–2904.
- JOHN, VOLKER, & THEIN, FERDINAND. 2012. On the efficiency and robustness of the core routine of the quadrature method of moments (QMOM). *Chemical Engineering Science*, **75**, 327–333.

- JR, BERNARDO C. VIDAL, DIEN, BRUCE S., TING, K. C., & SINGH, VIJAY. 2011. Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **164**(8), 1405–1421.
- JØRGENSEN, HENNING, KRISTENSEN, JAN BACH, & FELBY, CLAUS. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars : challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **1**(2), 119–134.
- KADAM, KIRAN L., RYDHOLM, ERIC C., & MCMILLAN, JAMES D. 2004. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Biotechnology progress*, **20**(3), 698–705.
- KADIĆ, ADNAN, PALMQVIST, BENNY, & LIDÉN, GUNNAR. 2014. Effects of agitation on particle-size distribution and enzymatic hydrolysis of pretreated spruce and giant reed. *Biotechnology for biofuels*, **7**(1), 77.
- ÅKERHOLM, MARGARETHA, HINTERSTOISSER, BARBARA, & SALMÉN, LENNART. 2004. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, **339**(3), 569–578.
- KHODAVERDI, MAHDI, JEIHANIPOUR, AZAM, KARIMI, KEIKHOSRO, & TAHERZADEH, MOHAMMAD J. 2011. Kinetic modeling of rapid enzymatic hydrolysis of crystalline cellulose after pretreatment by NMMO. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **39**(3), 429–438.
- KHULLAR, ESHA, DIEN, BRUCE S., RAUSCH, KENT D., TUMBLESÓN, M. E., & SINGH, VIJAY. 2013. Effect of particle size on enzymatic hydrolysis of pretreated Miscanthus. *Industrial Crops and Products*, **44**, 11–17.
- KIM, DONG WON, & HONG, YOUNG GWAN. 2001. Description of cellobiohydrolases Ce16A and Ce17A from *Trichoderma reesei* using Langmuir-type models. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **6**(2), 89–94.
- KIM, DONG WON, KIM, TAE SEUNG, JEONG, YOUNG KYU, & LEE, JAE KUK. 1992. Adsorption kinetics and behaviors of cellulase components on microcrystalline cellulose. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **73**(6), 461–466.
- KIM, DONG WON, JANG, YOUNG HUN, & JEONG, YOUNG KYU. 1998. Adsorption Kinetics and Behaviour of Two Cellobiohydrolases from *Trichoderma Reesei* on Microcrystalline Cellulose. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **27**(2), 97–102.
- KIM, SEHOON, & HOLTZAPPLE, MARK T. 2006. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresource Technology*, **97**(4), 583–591.
- KINNARINEN, TEEMU, & HÄKKINEN, ANTTI. 2014. Influence of enzyme loading on enzymatic hydrolysis of cardboard waste and size distribution of the resulting fiber residue. *Bioresource Technology*, **159**(May), 136–142.
- KLEMAN-LEYER, KAREN M., GILKES, NEIL R., MILLER, ROBERT C., & KIRK, T. KENT. 1994. Changes in the molecular-size distribution of insoluble celluloses by the action of recombinant *Cellulomonas fimi* cellulases. *Biochem. J.*, **302**, 463–469.

- KLEMM, D., PHILPP, B., HEINZE, T., HEINZE, U., & WAGENKNECHT, W. 1998. Comprehensive cellulose chemistry. Volume 1 : Fundamentals and analytical methods. xxii + 260 pp.
- KONG, FANRAN, ENGLER, CADY R., & SOLTES, ED J. 1992. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone, and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. *Applied biochemistry and biotechnology*, **34**(1), 23–35.
- KOSTOGLU, M. 2000. Mathematical analysis of polymer degradation with chain-end scission. *Chemical Engineering Science*, **55**(13), 2507–2513.
- KRISTENSEN, JAN B., FELBY, CLAUS, & JØRGENSEN, HENNING. 2009. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*, **2**(1), 11.
- KRUIS, F. EINAR, MAISELS, ARKADI, & FISSAN, HEINZ. 2000. Direct simulation Monte Carlo method for particle coagulation and aggregation. *AIChE Journal*, **46**(9), 1735–1742.
- KUMAR, DEEPAK, & MURTHY, GANTI S. 2013. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnology for biofuels*, **6**(1), 1–20.
- KUMAR, RAJEEV, & WYMAN, CHARLES E. 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*, **25**(2), 302–314.
- KUMAR, SANJEEV, & RAMKRISHNA, D. 1996a. On the solution of population balance equations by discretization—I. A fixed pivot technique. *Chemical Engineering Science*, **51**(8), 1311–1332.
- KUMAR, SANJEEV, & RAMKRISHNA, D. 1996b. On the solution of population balance equations by discretization—II. A moving pivot technique. *Chemical Engineering Science*, **51**(8), 1333–1342.
- KUMAR, SANJEEV, & RAMKRISHNA, D. 1997. On the solution of population balance equations by discretization—III. Nucleation, growth and aggregation of particles. *Chemical Engineering Science*, **52**(24), 4659–4679.
- LADISCH, M.R., LIN, K.W., VOLOCH, M., & TSAO, G.T. 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, **5**(2), 82–102.
- LAGAERT, STIJN, BELIËN, TIM, & VOLCKAERT, GUIDO. 2009. Plant cell walls : Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. *Pages 1064–1073 of : Seminars in cell & developmental biology*, vol. 20. Elsevier.
- LANGSTON, P. A., BURBIDGE, A. S., JONES, T. F., & SIMMONS, M. J. H. 2001. Particle and droplet size analysis from chord measurements using Bayes' theorem. *Powder technology*, **116**(1), 33–42.
- LANGSTON, PAUL A. 2002. Comparison of least-squares method and Bayes' theorem for deconvolution of mixture composition. *Chemical engineering science*, **57**(13), 2371–2379.
- LAUREANO-PEREZ, LIZBETH, TEYMOURI, FARZANEH, ALIZADEH, HASAN, & DALE, BRUCE E. 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **124**(1-3), 1081–1099.

- LAVENSON, DAVID M., TOZZI, EMILIO J., KARUNA, NARDRAPEE, JEOH, TINA, POWELL, ROBERT L., & MCCARTHY, MICHAEL J. 2012. The effect of mixing on the liquefaction and saccharification of cellulosic fibers. *Bioresource technology*, **111**, 240–247.
- LE BA, HUNG. 2009. *Formation et agglomération de particules d'hydrate de gaz dans une émulsion eau dans huile : Etude expérimentale et modélisation*. Ph.D. thesis, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
- LEE, DORA, ALEX, H. C., WONG, KEN KY, & SADDLER, JOHN N. 1994. Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **45**(1), 407–415.
- LEE, KANGTAEK, & MATSOUKAS, THEMIS. 2000. Simultaneous coagulation and break-up using constant-N Monte Carlo. *Powder Technology*, **110**(1), 82–89.
- LEE, SUN BOK, KIM, I. H., RYU, DEWEY DY, & TAGUCHI, H. 1983. Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism. *Biotechnology and bioengineering*, **25**(1), 33–51.
- LEE, YONG-HYUN, & FAN, L. T. 1983. Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose : (II). Analysis of extended hydrolysis times. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**(4), 939–966.
- LENZ, J., ESTERBAUER, H., SATTLER, W., SCHURZ, J., & WRENTSCHUR, E. 1990. Changes of structure and morphology of regenerated cellulose caused by acid and enzymatic hydrolysis. *Journal of Applied Polymer Science*, **41**(5-6), 1315–1326.
- LEVER, M_. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical biochemistry*, **47**(1), 273–279.
- LI, MINGZHONG, & WILKINSON, DEREK. 2005. Determination of non-spherical particle size distribution from chord length measurements. Part 1 : Theoretical analysis. *Chemical Engineering Science*, **60**(12), 3251–3265.
- LIAO, WEI, WEN, ZHIYOU, HURLEY, SHARON, LIU, YAN, LIU, CHUANBIN, & CHEN, SHULIN. 2005. Effects of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from dairy manure. *Pages 1017–1030 of : Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer.
- LIAO, WEI, LIU, YAN, WEN, ZHIYOU, FREAR, CRAIG, & CHEN, SHULIN. 2008. Kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose in differently pretreated fibers from dairy manure. *Biotechnology and Bioengineering*, **101**(3), 441–451.
- LIITIÄ, TIINA, MAUNU, SIRKKA LIISA, HORTLING, BO, TAMMINEN, TARJA, PEKKALA, OSMO, & VARHIMO, ANTERO. 2003. Cellulose crystallinity and ordering of hemicelluloses in pine and birch pulps as revealed by solid-state NMR spectroscopic methods. *Cellulose*, **10**(4), 307–316.
- LIMAYEM, ALYA, & RICKE, STEVEN C. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production : Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, **38**(4), 449–467.
- LIU, JIA-JER, SRIENC, FRIEDRICH, & FREDRICKSON, A. G. 1997. Solutions of population balance models based on a successive generations approach. *Chemical Engineering Science*, **52**(9), 1529–1540.

- LJUNGGREN, MATTIAS. 2005. Kinetic analysis and modeling of enzymatic hydrolysis and SSF. *Cellulose*, **2**(4), 3.
- LYND, LEE R., WEIMER, PAUL J., ZYL, WILLEM H. VAN, & PRETORIUS, ISAK S. 2002. Microbial Cellulose Utilization : Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**(3), 506–577.
- MANSFIELD, SHAWN D., MOONEY, CAITRIONA, & SADDLER, JOHN N. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology progress*, **15**(5), 804–816.
- MARCHISIO, DANIELE L., & FOX, RODNEY O. 2005. Solution of population balance equations using the direct quadrature method of moments. *Journal of Aerosol Science*, **36**(1), 43–73.
- MARCHISIO, DANIELE L., VIGIL, R. DENNIS, & FOX, RODNEY O. 2003a. Quadrature method of moments for aggregation–breakage processes. *Journal of Colloid and Interface Science*, **258**(2), 322–334.
- MARCHISIO, DANIELE L., PIKTURNA, JESSE T., FOX, RODNEY O., VIGIL, R. DENNIS, & BARRESI, ANTONELLO A. 2003b. Quadrature method of moments for population-balance equations. *AIChE Journal*, **49**(5), 1266–1276.
- MATUANA, L. M., BALATINECZ, J. J., SODHI, R. N. S., & PARK, C. B. 2001. Surface characterization of esterified cellulosic fibers by XPS and FTIR Spectroscopy. *Wood Science and Technology*, **35**(3), 191–201.
- MCGRAW, ROBERT. 1997. Description of aerosol dynamics by the quadrature method of moments. *Aerosol Science and Technology*, **27**(2), 255–265.
- MEAD, LAWRENCE R., & PAPANICOLAOU, NIKOS. 1984. Maximum entropy in the problem of moments. *Journal of Mathematical Physics*, **25**(8), 2404–2417.
- MEDVE, JÓZSEF, STÅHLBERG, JERRY, & TJERNELD, FOLKE. 1997. Isotherms for adsorption of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei* on microcrystalline cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **66**(1), 39–56.
- MEDVE, JÓZSEF, KARLSSON, JOHAN, LEE, DORA, & TJERNELD, FOLKE. 1998. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei* : Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, **59**(5), 621–634.
- MES-HARTREE, M., HOGAN, C. M., & SADDLER, J. N. 1987. Recycle of enzymes and substrate following enzymatic hydrolysis of steam-pretreated aspenwood. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**(4), 558–564.
- MICHAELIS, LEONOR, & MENTEN, MAUD L. 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. z*, **49**(333-369), 352.
- MILLER, GAIL LORENZ. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, **31**(3), 426–428.
- MITTAL, ASHUTOSH, KATAHIRA, RUI, HIMMEL, MICHAEL E., JOHNSON, DAVID K., & OTHERS. 2011. Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose : changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility. *Biotechnol Biofuels*, **4**(1), 41.

- MOHNEN, DEBRA, BAR-PELED, MAOR, & SOMERVILLE, CHRIS. 2008. Cell wall polysaccharide synthesis. *Biomass Recalcitrance : Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*. Blackwell Publishing, Singapore, 94–159.
- MONLAU, F., BARAKAT, A., STEYER, J. P., & CARRERE, H. 2012. Comparison of seven types of thermo-chemical pretreatments on the structural features and anaerobic digestion of sunflower stalks. *Bioresource technology*, **120**, 241–247.
- MORALES-RODRÍGUEZ, RICARDO, CAPRON, MARIE, HUUSOM, JAKOB KJØBSTED, & SIN, GÜRKAN. 2010. Controlled fed-batch operation for improving cellulose hydrolysis in 2G bioethanol production. *Comput.-Aided Chem. Eng.*, **28**, 1497–1502.
- MORALES-RODRIGUEZ, RICARDO, GERNAEY, KRIST V., MEYER, ANNE S., & SIN, GÜRKAN. 2011. A Mathematical Model for Simultaneous Saccharification and Co-fermentation (SSCF) of C6 and C5 Sugars. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **19**(2), 185–191.
- MOVAGARNEJAD, KAMYAR, SOHRABI, MORTEZA, KAGHAZCHI, TAHEREH, & VAHABZADEH, FARZANEH. 2000. A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid–liquid systems. *Biochemical Engineering Journal*, **4**(3), 197–206.
- MOVAGHARNEJAD, KAMYAR. 2005. Modified shrinking particle model for the rate of enzymatic hydrolysis of impure cellulosic waste materials with enzyme reuse by the substrate replacement. *Biochemical Engineering Journal*, **24**(3), 217–223.
- MOVAGHARNEJAD, KAMYAR, & SOHRABI, MORTEZA. 2003. A model for the rate of enzymatic hydrolysis of some cellulosic waste materials in heterogeneous solid–liquid systems. *Biochemical Engineering Journal*, **14**(1), 1–8.
- MUSSATTO, SOLANGE I., FERNANDES, MARCELA, MILAGRES, ADRIANE MF, & ROBERTO, INÊS C. 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*, **43**(2), 124–129.
- NAIDU, G. SATHYA NARAYANA, & PANDA, T. 2003. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, **16**(1), 57–67.
- NAVARRO, DAVID, COUTURIER, MARIE, DA SILVA, GABRIELA GHIZZI DAMASCENO, BERRIN, JEAN-GUY, ROUAU, XAVIER, ASTHER, MARCEL, & BIGNON, CHRISTOPHE. 2010. Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Microbial cell factories*, **9**(1), 58.
- NELSON, MARY L., & O'CONNOR, ROBERT T. 1964. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *Journal of Applied Polymer Science*, **8**(3), 1325–1341.
- NELSON, NORTON, & OTHERS. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. biol. Chem.*, **153**(2), 375–380.
- NETO, JOÃO MOREIRA, GARCIA, DANIELLA DOS REIS, RUEDA, SANDRA MARCELA GÓMEZ, & COSTA, ALINE CARVALHO DA. 2013. Study of kinetic parameters in a mechanistic model for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse subjected to different pretreatments. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**(11), 1579–1590.
- NGUYEN, TIEN-CUONG, ANNE-ARCHARD, DOMINIQUE, COMA, VÉRONIQUE, CAMELEYRE, XAVIER, LOMBARD, ERIC, BINET, CÉDRIC, NOUHEN, ARTHUR, TO, KIM ANH, &

- FILLAUDEAU, LUC. 2013. In situ rheometry of concentrated cellulose fibre suspensions and relationships with enzymatic hydrolysis. *Bioresource technology*, **133**, 563–572.
- NIDETZKY, B, STEINER, W, HAYN, M, & CLAEYSSENS, M. 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei* : a new model for synergistic interaction. *Biochemical Journal*, **298**(Pt 3), 705–710.
- NOPENS, INGMAR. 2005. Modelling the activated sludge flocculation process : a population balance approach. *PhD Thesis, Ghent University, Belgium*.
- O'CONNOR, ROBERT T., DUPRÉ, ELSIE F., & MITCHAM, DONALD. 1958. Applications of infrared absorption spectroscopy to investigations of cotton and modified cottons Part I : physical and crystalline modifications and oxidation. *Textile Research Journal*, **28**(5), 382–392.
- O'DWYER, J. P., ZHU, L., GRANDA, C. B., & HOLTZAPPLE, M. T. 2007. Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model : inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model. *Bioresource technology*, **98**(16), 2969–2977.
- OHMINE, KAZUO, OOSHIMA, HIROSHI, & HARANO, YOSHIO. 1983. Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulose from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**(8), 2041–2053.
- OKAZAKI, M., & MOO-YOUNG, M. 1978. Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose : analytical description of a mechanistic model. *Biotechnology and bioengineering*, **20**(5), 637–663.
- OOSHIMA, HIROSHI, SAKATA, MASARU, & HARANO, YOSHIO. 1983. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**(12), 3103–3114.
- O'SULLIVAN, ANTOINETTE C. 1997. Cellulose : the structure slowly unravels. *Cellulose*, **4**(3), 173–207.
- PAL, RAMENDRA KISHOR, & CHAKRABORTY, SAIKAT. 2013. A novel mixing strategy for maximizing yields of glucose and reducing sugar in enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource technology*, **148**, 611–614.
- PALMQVIST, BENNY, WIMAN, MAGNUS, LIDÉN, GUNNAR, & OTHERS. 2011. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce : a quantitative analysis of conversion and power consumption. *Biotechnology for biofuels*, **4**(10), 1–8.
- PALONEN, HETTI, TENKANEN, MAIJA, LINDER, MARKUS, H, PALONEN, M, TENKANEN, & M, LINDER. 1999. Dynamic Interaction of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolases Cel6A and Cel7A and Cellulose at Equilibrium and during Hydrolysis, Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases Cel6A and Cel7A and cellulose at equilibrium and during hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology, Applied and environmental microbiology*, **65**, **65**(12, 12), 5229, 5229.
- PARK, ENOCH Y., IKEDA, YUKO, & OKUDA, NAOYUKI. 2002. Empirical evaluation of cellulase on enzymatic hydrolysis of waste office paper. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **7**(5), 268–274.

- PARK, SUNKYU, VENDITTI, RICHARD A., ABRECHT, DAVID G., JAMEEL, HASAN, PAWLAK, JOEL J., & LEE, JUNG M. 2007. Surface and pore structure modification of cellulose fibers through cellulase treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, **103**(6), 3833–3839.
- PARK, SUNKYU, JOHNSON, DAVID K., ISHIZAWA, CLAUDIA I., PARILLA, PHILIP A., & DAVIS, MARK F. 2009. Measuring the crystallinity index of cellulose by solid state ¹³C nuclear magnetic resonance. *Cellulose*, **16**(4), 641–647.
- PARK, SUNKYU, BAKER, JOHN O, HIMMEL, MICHAEL E, PARILLA, PHILIP A, & JOHNSON, DAVID K. 2010. Cellulose crystallinity index : measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, **3**(May), 10.
- PRUNESCU, REMUS MIHAIL, & SIN, GÜRKAN. 2013. Dynamic modeling and validation of a lignocellulosic enzymatic hydrolysis process – A demonstration scale study. *Bioresource Technology*, **150**(Dec.), 393–403.
- RAMKRISHNA, DORAISWAMI. 1985. The status of population balances. *Reviews in Chemical Engineering*, **3**(1), 49–95.
- RAMKRISHNA, DORAISWAMI. 2000. *Population balances : Theory and applications to particulate systems in engineering*. Academic press.
- REESE, E. T., & RYU, D. Y. 1980. Shear inactivation of cellulase of *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, **2**(3), 239–240.
- ROWE, RAYMOND C., SHESKEY, PAUL J., QUINN, MARIAN E., ASSOCIATION, AMERICAN PHARMACISTS, PRESS, PHARMACEUTICAL, & OTHERS. 2009. *Handbook of pharmaceutical excipients*. Vol. 6. Pharmaceutical press London.
- RUBIN, EDWARD M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, **454**(7206), 841–845.
- RUF, ALFRED, WORLITSCHKE, JÖRG, & MAZZOTTI, MARCO. 2000. Modeling and experimental analysis of PSD measurements through FBRM. *Particle & Particle Systems Characterization*, **17**(4), 167–179.
- SAAKE, B., KRUSE, TH, & PULS, J. 2001. Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography. *Bioresource technology*, **80**(3), 195–204.
- SADDLER, J N. 1986. Factors limiting the efficiency of cellulase enzymes. *Microbiological sciences*, **3**(3), 84–87.
- SADDLER, J. N., BROWNELL, H. H., CLERMONT, L. P., & LEVITIN, N. 1982. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**(6), 1389–1402.
- SAKATA, M., OOSHIMA, H., & HARANO, Y. 1985. Effects of agitation on enzymatic saccharification of cellulose. *Biotechnology letters*, **7**(9), 689–694.
- SCHELER, STEFAN. 2013. Ray tracing as a supportive tool for interpretation of FBRM signals from spherical particles. *Chemical Engineering Science*, **101**(Sept.), 503–514.
- SCHENZEL, KARLA, FISCHER, STEFFEN, & BRENDLER, ERICA. 2005. New Method for Determining the Degree of Cellulose I Crystallinity by Means of FT Raman Spectroscopy. *Cellulose*, **12**(3), 223–231.

- SCHULT, TOVE, HJERDE, TORGEIR, OPTUN, ODD INGE, KLEPPE, PEDER J., & MOE, STØRKER. 2002. Characterization of cellulose by SEC-MALLS. *Cellulose*, **9**(2), 149–158.
- SCHULZ, HARTWIG, & BARANSKA, MALGORZATA. 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, **43**(1), 13–25.
- SCHURZ, J., BILLIANI, J., HÖNEL, A., EIGNER, W. D., JÁNOSI, A., HAYN, M., & ESTERBAUER, H. 1985. Reaktionsmechanismus und Strukturänderungen beim enzymatischen Abbau von Cellulose durch *Trichoderma reesei*-Cellulase. *Acta Polymerica*, **36**(2), 76–80.
- SCHWANNINGER, M., RODRIGUES, J.C., PEREIRA, H., & HINTERSTOISSER, B. 2004. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vibrational Spectroscopy*, **36**(1), 23–40.
- SCOTT, WILLIAM T. 1968. Analytic studies of cloud droplet coalescence I. *Journal of the atmospheric sciences*, **25**(1), 54–65.
- SEGAL, LGJMA, CREELY, J. J., MARTIN, A. E., & CONRAD, C. M. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, **29**(10), 786–794.
- SHEWALE, J G, & SADANA, J C. 1979. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar production. *Canadian journal of microbiology*, **25**(6), 773–783.
- SHIN, DONGGYUN, YOO, AHRIM, KIM, SEUNG WOOK, & YANG, DAE RYOOK. 2006. Cybernetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation for ethanol production from steam-exploded wood with *Brettanomyces custersii*. *Journal of microbiology and biotechnology*, **16**(9), 1355–1361.
- SHOHAT, JAMES ALEXANDER, & TAMARKIN, JACOB DAVID. 1943. *The problem of moments*. American Mathematical Soc.
- SILVA, GABRIELA GHIZZI D., COUTURIER, MARIE, BERRIN, JEAN-GUY, BULÉON, ALAIN, & ROUAU, XAVIER. 2012. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource technology*, **103**(1), 192–200.
- SILVERSTEIN, REBECCA A., CHEN, YE, SHARMA-SHIVAPPA, RATNA R., BOYETTE, MICHAEL D., & OSBORNE, JASON. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology*, **98**(16), 3000–3011.
- SIMMONS, M. J. H., LANGSTON, P. A., & BURBIDGE, A. S. 1999. Particle and droplet size analysis from chord distributions. *Powder Technology*, **102**(1), 75–83.
- SIN, GÜRKAN, MEYER, ANNE S., & GERNAEY, KRIST V. 2010. Assessing reliability of cellulose hydrolysis models to support biofuel process design—identifiability and uncertainty analysis. *Computers & chemical engineering*, **34**(9), 1385–1392.
- SINITSYN, A. P., GUSAKOV, A. V., & VLASENKO, E. YU. 1991. Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **30**(1), 43–59.

- SINITSYN, A.P., MITKEVICH, O.V., GUSAKOV, A.V., & KLYOSOV, A.A. 1989. Decrease in reactivity and change of physico-chemical parameters of cellulose in the course of enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, **10**(1), 1–14.
- SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., & CROCKER, D. 2007. *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory (NREL) Laboratory Analytical Procedures (LAP) for standard biomass analysis.*
- SOMOGYI, MICHAEL. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*, **195**(1), 19–23.
- SOUSA JR, R., CARVALHO, M. L., GIORDANO, R. L. C., & GIORDANO, R. C. 2011. Recent trends in the modeling of cellulose hydrolysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **28**(4), 545–564.
- STEWART, D., WILSON, H. M., HENDRA, P. J., & MORRISON, I. M. 1995a. Fourier-transform infrared and Raman spectroscopic study of biochemical and chemical treatments of oak wood (*Quercus rubra*) and barley (*Hordeum vulgare*) straw. *Journal of agricultural and food chemistry*, **43**(8), 2219–2225.
- STEWART, DEREK, MCDUGALL, GORDON J., & BATY, ANNETTE. 1995b. Fourier-transform infrared microspectroscopy of anatomically different cells of flax (*Linum usitatissimum*) stems during development. *Journal of agricultural and food chemistry*, **43**(7), 1853–1858.
- STÅHLBERG, JERRY, JOHANSSON, GUNNAR, & PETTERSSON, GÖRAN. 1991. A New Model For Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Based on the Two-Domain Structure of Cellobiohydrolase I. *Nature Biotechnology*, **9**(3), 286–290.
- STIELTJES, T.-J. 1894. Recherches sur les fractions continues. *Pages 1–122 of : Annales de la Faculté des sciences de Toulouse : Mathématiques*, vol. 8.
- STRIEGEL, ANDRÉM. 1997. Theory and applications of DMAc/LiCl in the analysis of polysaccharides. *Carbohydrate polymers*, **34**(4), 267–274.
- STUDDEN, WILLIAM J. 1997. *The theory of canonical moments with applications in statistics, probability, and analysis*. Vol. 338. John Wiley & Sons.
- SUGIYAMA, JUNJI, PERSSON, JAN, & CHANZY, HENRI. 1991. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native celluloses. *Macromolecules*, **24**(9), 2461–2466.
- SZCZODRAK, J., & TARGOŃSKI, Z. 1989. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose : Effect of ethanol and cellulases on particular stages. *Acta Biotechnologica*, **9**(6), 555–564.
- TABKA, M. G., HERPOËL-GIMBERT, I., MONOD, F., ASTHER, M., & SIGOILLOT, J. C. 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and microbial technology*, **39**(4), 897–902.
- TAGLIANI, ALDO. 1999. Hausdorff moment problem and maximum entropy : a unified approach. *Applied Mathematics and Computation*, **105**(2), 291–305.

- TEERI, T. T., KOIVULA, A., LINDER, M., WOHLFAHRT, G., DIVNE, C., & JONES, T. A. 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases : why so efficient on crystalline cellulose? *Biochemical Society Transactions*, 173–8.
- TERINTE, N., IBBETT, R., & SCHUSTER, K. C. 2011. Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD) : Comparison between measurement techniques. *Lenzinger Berichte*, **89**, 118–131.
- VAY, KERSTIN, FRIE\ S S, WOLFGANG, & SCHELER, STEFAN. 2012. Understanding reflection behavior as a key for interpreting complex signals in FBRM monitoring of microparticle preparation processes. *International journal of pharmaceuticals*, **437**(1), 1–10.
- VLIEGHE, MÉLODY. 2014. *Agrégation et rupture de floccs sous contraintes turbulentes : dynamique des propriétés morphologiques*. Ph.D. thesis.
- VÄLJAMÄE, PRIIT, SILD, VELJO, NUTT, ANU, PETTERSSON, GÖRAN, & JOHANSSON, GUNNAR. 1999. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *European Journal of Biochemistry*, **266**(2), 327–334.
- VÁSQUEZ, MARIANA PEÑUELA, SILVA, JULIANA NASCIMENTO C. DA, JR, MAURÍCIO BEZERRA DE SOUZA, & JR, NEI PEREIRA. 2007. Enzymatic Hydrolysis Optimization to Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Pages 141–153 of* : MIELENZ, JONATHAN R., KLASSON, K. THOMAS, ADNEY, WILLIAM S., & MCMILLAN, JAMES D. (eds), *Applied Biochemistry and Biotechnology*. ABAB Symposium. Humana Press.
- WALKER, L.P., & WILSON, D.B. 1991. Enzymatic hydrolysis of cellulose : An overview. *Bioresource Technology*, **36**(1), 3–14.
- WANG, LUSHAN, ZHANG, YUZHONG, GAO, PEIJI, SHI, DONGXIA, LIU, HONGWEN, & GAO, HONGJUN. 2006. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **93**(3), 443–456.
- WANG, Q. Q., HE, Z., ZHU, Z., ZHANG, Y.-HP, NI, Y., LUO, X. L., & ZHU, J. Y. 2012. Evaluations of cellulose accessibilities of lignocelluloses by solute exclusion and protein adsorption techniques. *Biotechnology and bioengineering*, **109**(2), 381–389.
- WATSON, DONNA L., WILSON, DAVID B., & WALKER, LARRY P. 2002. Synergism in binary mixtures of *Thermobifida fusca* cellulases Cel6B, Cel9A, and Cel5A on BMCC and avicel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **101**(2), 97–111.
- WHEELER, JOHN C., & OTHERS. 1974. Modified moments and Gaussian quadratures. *Rocky Mountain Journal of Mathematics*, **4**(2), 287–296.
- WONG, KEN K. Y., DEVERELL, KAY F., MACKIE, KEITH L., CLARK, TOM A., & DONALDSON, LLOYD A. 1988. The relationship between fiber-porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**(5), 447–456.
- WOOD, IAN P., ELLISTON, ADAM, RYDEN, PETER, BANCROFT, IAN, ROBERTS, IAN N., & WALDRON, KEITH W. 2012. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates : Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *biomass and bioenergy*, **44**, 117–121.

- WOOD, THOMAS M., & GARCIA-CAMPAYO, VICENTA. 1990. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*, **1**(2-3), 147–161.
- WOOD T. M., & MCCRAE SHEILA I. 1979. Synergism Between Enzymes Involved in the Solubilization of Native Cellulose. *Pages 181–209 of : Hydrolysis of Cellulose : Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*. Advances in Chemistry, vol. 181. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
- WORLITSCHKEK, JÖRG, HOCKER, THOMAS, & MAZZOTTI, MARCO. 2005. Restoration of PSD from chord length distribution data using the method of projections onto convex sets. *Particle & Particle Systems Characterization*, **22**(2), 81–98.
- WYNN, E. J. W. 2003. Relationship between particle-size and chord-length distributions in focused beam reflectance measurement : stability of direct inversion and weighting. *Powder Technology*, **133**(1), 125–133.
- XIAO, ZHIZHUANG, ZHANG, XIAO, GREGG, DAVID J., & SADDLER, JOHN N. 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **115**(1-3), 1115–1126.
- YANG, BIN, & WYMAN, CHARLES E. 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow-through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, **86**(1), 88–98.
- YEH, AN-I, HUANG, YI-CHING, & CHEN, SHIH HSIN. 2010. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydrate Polymers*, **79**(1), 192–199.
- YU, P. 2005. Molecular chemistry imaging to reveal structural features of various plant feed tissues. *Journal of structural biology*, **150**(1), 81–89.
- ZHANG, MINGJIA, RONGXIN, S. U., WEI, Q. I., RUOYU, D. U., & ZHIMIN, H. E. 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulose with different crystallinities studied by means of SEC-MALLS. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **19**(5), 773–778.
- ZHANG, Y.-H. PERCIVAL, & LYND, LEE R. 2005. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules*, **6**(3), 1510–1515.
- ZHANG, Y.-H. PERCIVAL, & LYND, LEE R. 2006. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnology and Bioengineering*, **94**(5), 888–898.
- ZHANG, YI-HENG PERCIVAL, & LYND, LEE R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose : noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, **88**(7), 797–824.
- ZHANG, YU, XU, JING-LIANG, XU, HUI-JUAN, YUAN, ZHEN-HONG, & GUO, YING. 2010. Cellulase deactivation based kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-exploded wheat straw. *Bioresource technology*, **101**(21), 8261–8266.
- ZHAO, HAIBO, KWAK, JA HUN, CONRAD ZHANG, Z., BROWN, HEATHER M., AREY, BRUCE W., & HOLLADAY, JOHNATHAN E. 2007. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, **68**(2), 235–241.

- ZHAO, XUEBING, ZHANG, LIHUA, & LIU, DEHUA. 2008. Comparative study on chemical pretreatment methods for improving enzymatic digestibility of crofton weed stem. *Bioresource Technology*, **99**(9), 3729–3736.
- ZHAO, XUEBING, ZHANG, LIHUA, & LIU, DEHUA. 2010. Pretreatment of Siam weed stem by several chemical methods for increasing the enzymatic digestibility. *Biotechnology journal*, **5**(5), 493–504.
- ZHAO, XUEBING, ZHANG, LIHUA, & LIU, DEHUA. 2012. Biomass recalcitrance. Part I : the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **6**(4), 465–482.
- ZHENG, YI, PAN, ZHONGLI, ZHANG, RUIHONG, & JENKINS, BRYAN M. 2009. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**(6), 1558–1569.
- ZHENG, YINGFU, ZHANG, SONGPING, MIAO, SHIDA, SU, ZHIGUO, & WANG, PING. 2013. Temperature sensitivity of cellulase adsorption on lignin and its impact on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Journal of biotechnology*, **166**(3), 135–143.
- ZHOU, JIN, WANG, YONG-HONG, CHU, JU, LUO, LING-ZHI, ZHUANG, YING-PING, & ZHANG, SI-LIANG. 2009. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresource Technology*, **100**(2), 819–825.
- ZHU, J. Y., & PAN, X. J. 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production : technology and energy consumption evaluation. *Bioresource technology*, **101**(13), 4992–5002.
- ZHU, LI, O'DWYER, JONATHAN P., CHANG, VINCENT S., GRANDA, CESAR B., & HOLT-ZAPPLE, MARK T. 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, **99**(9), 3817–3828.
- ZIFF, ROBERT M., & MCGRADY, E. D. 1985. The kinetics of cluster fragmentation and depolymerisation. *Journal of Physics A : Mathematical and General*, **18**(15), 3027.

