



HAL
open science

Relation morphologie/réactivité des substrats lignocellulosiques : impact du prétraitement par explosion à la vapeur

Charlotte Loustau Cazalet

► To cite this version:

Charlotte Loustau Cazalet. Relation morphologie/réactivité des substrats lignocellulosiques : impact du prétraitement par explosion à la vapeur. Génie des procédés. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAI099 . tel-02143068

HAL Id: tel-02143068

<https://theses.hal.science/tel-02143068>

Submitted on 29 May 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Ingénierie – Matériaux, Mécanique, Environnement,
Énergétique, Procédés, Production**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Charlotte LOUSTAU CAZALET

Thèse dirigée par **Christine CHIRAT, Professeur, Grenoble INP-
PAGORA**

préparée au sein de **IFP Energies Nouvelles**
dans **l'École Doctorale Ingénierie – Matériaux, Mécanique,
Énergétique, Environnement, Procédés, Production (IMEP2)**

Relation morphologie/réactivité des substrats lignocellulosiques : impact du prétraitement par explosion à la vapeur

Thèse soutenue publiquement le **10 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Mr, Stéphane, GRELIER

Professeur, Laboratoire de chimie des polymères organique, Université de
Bordeaux 1 Président

Mme, Stéphanie, BAUMBERGER

Professeur INRA-AgroParisTech, Université de Paris-Saclay, Rapporteur

Mr, Pierre Yves, PONTALIER

Maitre de conférence, ENSIACET, ENSIACET INP, Toulouse, Rapporteur

Mme, Aurore, RICHEL

Professeur, AgroBioTech, Université de Liège, Belgique, Membre

Mr, Dominique, LACHENAL

Professeur, INP-PAGORA, Communauté Université Grenoble Alpes, Membre

Mme, Christine, CHIRAT

Professeur, INP-PAGORA, Communauté Université Grenoble Alpes, Membre

Mr, Damien, HUDEBINE

Ingénieur de recherche, IFP Energies Nouvelles, Etablissement de Lyon, Invité

Mme, Séverine, HUMBERT

Ingénieur de recherche, IFP Energies Nouvelles, Etablissement de Lyon Invitée



REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier, dans un premier temps, ma directrice de thèse, **Christine CHIRAT**, professeur INP-PAGORA, pour l'intérêt qu'elle a porté à ces travaux de thèse, pour sa grande disponibilité et pour ses multiples conseils durant ces trois années.

Je remercie ensuite l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier mon travail avec attention : **Stéphanie BAUMBERGER**, professeur INRA AgroParisTech, et **Pierre Yves PONTALIER**, maître de conférence ENSIACET, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour les échanges constructifs qui m'ont permis de préciser mes propos et d'améliorer mon manuscrit final ; **Dominique LACHENAL**, professeur INP-PAGORA, pour sa lecture minutieuse de mon manuscrit, pour l'intérêt qu'il y a porté et pour avoir accepté d'examiner cette thèse ; **Aurore RICHEL** professeur AgroBioTech Gembloux, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité Chimie Biologie Industrielle et pour avoir accepté d'examiner ces travaux. Mes remerciements s'adressent également à **Stéphane GRELIER** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

Je remercie l'**Institut Français du Pétrole et des Energies Nouvelles** qui a financé cette thèse en m'accordant un poste d'allocataire de recherche. Je remercie en particulier **Luc NOUGIER**, **Pierre POROT** et **Christophe Boyer**, pour m'avoir accueilli au sein de la direction Conception Modélisation Procédés.

J'adresse de chaleureux remerciements à mes encadrants de thèse, **Damien HUDEBINE** et **Séverine HUMBERT**, pour leur qualité pédagogique et scientifique, leur sympathie, leur écoute et surtout pour le temps conséquent qu'ils m'ont accordé. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous.

Une grande partie de ce travail de recherche a été réalisé en laboratoire, c'est pourquoi je remercie du fond du cœur l'équipe Elbaïte, **Serge**, **Amandine**, **Michel**, **Séverine**, **Mehdi**, **Karine**, **Pierre** et **Elodie**, pour leur enthousiasme et leur gentillesse. Ces longues heures de labo n'auraient pas été les mêmes sans vous. En parlant laboratoire, je tiens sincèrement à remercier **Nicolas JACQUET** et **Eric GROIGNET**, pour leur accueil au sein de l'Université d'Agro BioTech Gembloux mais surtout un grand merci à **Thibaut ISTASSE** et **Brieuc LECART** pour leur aide précieuse sur la Steam. Que votre avenir soit rempli de recherches fructueuses. Enfin, je remercie la direction Physique et Analyse pour l'ensemble des analyses réalisées et surtout **Marc**, **Romain**, **Denis**, **Marc** et **Florent**.

Un pensé aux ingénieurs avec qui j'ai pu discuter biomasse ou encore jouer au volley, je pense notamment à **Alain**, **Séverine**, **Marie-Olive**, **Gilles**, **Caroline**, **Romain**, **Marc**, **Agnès**, **Marine**, **Patrick**, **Alain**... Un remerciement particulier à **Nadège** pour tous tes conseils et ton suivi tout au long de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également aux anciens et futurs thésards IFPEN, compagnons de route de ces trois ans. Les moments partagés, au détour d'un couloir, autour d'un café ou encore d'un petit verre, m'ont créé des souvenirs formidables et je suis certaine que d'autres arriveront prochainement ! Un grand merci donc à **Dina**, **Robin**, **Charlotte**, **Svetan**, **Sonia**, **Kevin**, **Marisa**, **Mathieu**, **Léonor**, **Wei**, **Fabien**, **Sophie**, **Joël**, **Ana Rita**, **Emile**, **Caroline**, **Etienne**, **Coralie**, **Clément**, **Ana Theresa**, **Damien**, **Angélique**, **Paul**, **Alexis**, **Carole**, **Larissa**, **Rick**, **Julie** ...

J'en profite également pour remercier mes amis ; ceux qui malgré la distance ont toujours répondu présent, je pense particulièrement à **Gab**, **Charlène** et **Toinou** ; Les « montpelliérains » pour leur chaleur du cœur, **Masky**, **Ysess**, **Camille**, **Léa** et **Vinz** ; et ceux que j'appellerai les réguliers, les

mignons **Dylan** et **Maelle**, les miminets **Etienne** et **Marion** mais aussi **Henri**, **Agnès**, **Brikou**, **Sophie**, **Lucas** et **Mika**.

Je remercie également **Pierre**, qui a su me soutenir, m'encourager et surtout me supporter durant ces années. Cette thèse et moi te devons beaucoup.

Ces remerciements ne peuvent s'achever sans une pensée pour ma famille. Un grand merci à mes grands parents, **Mariette** et **Jean**, à mes oncles et tantes, **Jackie** et **Bruno**, **Muriel** et **Didier**, **Christine** et **Serge**, et à mes cousins et leurs conjoints, **Jean** et **Adelise**, **Anne-Sophie** et **Alexandre**, **Pierre** et **Agathe**, **Théo**, **Margot**. Mais surtout à mes parents, **Claire** et **Didier**, et ma grande sœur **Marie** pour leur amour et leur soutien indéfectible qui ont construit le socle de ce que je suis et ce que je fais.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| Contexte..... | 3 |
| Objectifs de la thèse..... | 8 |
| CHAPITRE I : ETAT DE L'ART..... | 11 |
| I.1. Introduction..... | 15 |
| I.2. Procédé de bioconversion de la lignocellulose en éthanol..... | 16 |
| I.2.A. Composition chimique de la biomasse..... | 16 |
| I.2.B. Les étapes clés du procédé biologique de transformation de la lignocellulose en éthanol..... | 21 |
| I.2.C. Focus sur les différents types de prétraitement et leurs impacts sur les caractéristiques physico-chimiques de la biomasse..... | 26 |
| I.3. La cuisson acide : prétraitement à l'acide dilué..... | 35 |
| I.3.A. Généralités sur le procédé..... | 35 |
| I.3.B. Influence des conditions opératoires..... | 36 |
| I.3.C. Evolution des caractéristiques physiques de la biomasse après prétraitement et leur influence sur la réactivité..... | 44 |
| I.3.D. Conclusion sur le prétraitement à l'acide dilué..... | 46 |
| I.4. Le prétraitement par explosion à la vapeur..... | 48 |
| I.4.A. Impact des conditions opératoires..... | 48 |
| I.4.B. Influence des caractéristiques physiques de la biomasse après prétraitement..... | 52 |
| I.4.C. Conclusion sur le prétraitement par explosion à la vapeur..... | 55 |
| I.5. Les humines..... | 56 |
| I.5.A. Généralités..... | 56 |
| I.5.B. Caractérisation des humines..... | 56 |
| I.5.C. Mécanisme de formation..... | 58 |
| I.5.D. Impact sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique..... | 59 |
| I.5.E. Eviter la formation d'humines..... | 60 |
| I.6. Conclusion..... | 62 |
| I.7. Stratégie de la thèse..... | 64 |
| I.8. Références..... | 65 |
| CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES..... | 83 |
| II.1. Introduction..... | 87 |
| II.2. Méthodologie expérimentale de cuisson acide..... | 88 |
| II.2.A. La cuisson acide..... | 88 |
| II.2.B. Le post-traitement..... | 90 |

| | |
|---|------------|
| II.3. Méthodologie expérimentale de détente explosive | 93 |
| II.3.A. La préparation du substrat par cuisson..... | 93 |
| II.3.B. La détente explosive | 94 |
| II.3.C. Post-traitement | 96 |
| II.4. Techniques de caractérisation des substrats lignocellulosiques | 97 |
| II.4.A. Caractérisation chimique | 97 |
| II.4.B. Caractérisation de la réactivité en hydrolyse enzymatique | 100 |
| II.4.C. Caractérisation avancée des marcs lavés..... | 102 |
| II.5. Conclusion | 107 |
| II.6. Références | 109 |

CHAPITRE III : ETUDE EXPERIMENTALE DE CUISSON ACIDE..... 111

| | |
|--|------------|
| III.1. Introduction..... | 115 |
| III.2. Description générale de l'étude..... | 116 |
| III.2.A. Description du substrat | 116 |
| III.2.B. Description des points expérimentaux | 117 |
| III.2.C. Validation du plan expérimental..... | 118 |
| III.3. Détermination des rendements expérimentaux | 120 |
| III.3.A. Bilans sur les sucres majoritaires..... | 120 |
| III.3.B. Evolution des rendements en glucose et xylose en fonction du facteur de sévérité..... | 122 |
| III.4. Réactivité des substrats prétraités à l'hydrolyse enzymatique | 127 |
| III.4.A. Rendements en glucose après hydrolyse enzymatique à 72h de la paille de blé prétraitée par cuisson acide | 127 |
| III.4.B. Rendements cumulés en glucose et xylose après prétraitement et hydrolyse enzymatique .. | 128 |
| III.5. Impact des conditions opératoires de prétraitement sur les caractéristiques physico-chimiques des substrats en relation avec leurs réactivités à l'hydrolyse enzymatique | 131 |
| III.5.A. Modification chimique de la paille de blé prétraitée | 131 |
| III.5.B. Modification morphologique de la paille de blé prétraitée | 133 |
| III.5.C. Modification de la porosité de la paille de blé prétraitée | 137 |
| III.5.D. Modification structurale de la paille de blé | 139 |
| III.6. Conclusion générale de l'étude | 141 |
| III.7. Références..... | 143 |

CHAPITRE IV : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA DETENTE EXPLOSIVE

..... 147

| | |
|--|------------|
| IV.1. Introduction | 151 |
| IV.2. Description générale de l'étude | 152 |
| IV.2.A. Stratégie expérimentale | 152 |
| IV.2.B. Choix des conditions opératoires..... | 153 |

| | |
|--|------------|
| IV.3. Caractérisation chimique et réactivité des substrats après détente explosive..... | 157 |
| IV.3.A. Détermination de la composition chimique des substrats après détente explosive | 158 |
| IV.3.B. Réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats après détente explosive | 160 |
| IV.3.C. Consolidation des données expérimentales | 161 |
| IV.3.D. Relation entre la composition chimique des substrats après détente explosive et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique | 162 |
| IV.4. Impact des conditions opératoires de prétraitement sur les caractéristiques physico-chimiques des substrats en relation avec leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique..... | 165 |
| IV.4.A. Modification morphologique de la paille de blé..... | 165 |
| IV.4.B. Modification de la porosité de la paille de blé prétraitée..... | 167 |
| IV.5. Marquage de la cellulose et surface accessible aux enzymes | 170 |
| IV.5.A. Etat de l'art et mise en place de la méthode | 170 |
| IV.5.B. Mode opératoire sélectionné..... | 171 |
| IV.5.C. Résultats et discussion..... | 172 |
| IV.6. Conclusion générale de l'étude..... | 174 |
| IV.7. Références..... | 175 |
| | |
| CHAPITRE V : ETUDE SUR LES HUMINES..... | 177 |
| | |
| V.1. Introduction | 181 |
| V.2. Etude sur les substrats modèles..... | 182 |
| V.2.A. Stratégie expérimentale | 182 |
| V.2.B. Cuisson acide des substrats modèles pris isolément | 184 |
| V.2.C. Cuisson acide des mélanges de substrats modèles par paire | 191 |
| V.2.D. Cuisson acide du mélange des trois substrats modèles..... | 200 |
| V.2.E. Conclusion intermédiaire | 204 |
| V.3. Etude sur un substrat délignifié..... | 206 |
| V.3.A. Stratégie expérimentale | 206 |
| V.3.B. Détermination des rendements expérimentaux et réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique | 207 |
| V.3.C. Caractéristiques physico-chimiques..... | 211 |
| V.4. Conclusion | 217 |
| V.5. Références..... | 218 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 220 |
| | |
| Conclusion générale..... | 222 |
| Perspectives..... | 224 |
| | |
| ANNEXES | 223 |

TABLES DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Estimation de la part des énergies renouvelables par rapport à la consommation énergétique globale en 2016 (<i>Renewable Energy Policy Network for the 21st Century</i>) | 3 |
| Figure 2 : Consommation énergétique totale par secteur en 2015 (<i>Renewable Energy Policy Network for the 21st Century</i>)..... | 4 |
| | |
| Figure I.1 : Représentation schématique de la cellulose | 16 |
| Figure I.2 : Structures cycliques des sucres présents dans les hémicelluloses | 17 |
| Figure I.3 : Structure générale d'hémicellulose montrant les différentes liaisons possibles (<i>Dodd and Cann (2009)</i>) | 18 |
| Figure I.4 : Précurseurs des unités monomériques phénoliques de la lignine | 18 |
| Figure I.5 : Structure supposée d'une lignine de hêtre (<i>Killops and Killops (2005)</i>)..... | 19 |
| Figure I.6 : Principaux acides phénoliques de la paille de blé (A. acide p-coumarique, B. acide férulique) | 20 |
| Figure I.7 : Schéma général de la production d'éthanol de 2 ^{ème} génération à partir de la biomasse lignocellulosique (<i>Source IFP Energies Nouvelles</i>)..... | 21 |
| Figure I.8 : Représentation schématique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (EG : endoglucanase ; CBH : Cellobiohydrolase ; BG : β -glucosidase) (<i>Huron et al. (2016)</i>) | 23 |
| Figure I.9 : Schéma des différentes configurations possibles de la biomasse lignocellulosique prétraitée pour la production d'éthanol (A. Configuration SHF ; B/ Configuration SSF ; C/ Configuration SSCF) (<i>Aresta et al. (2012)</i>) | 26 |
| Figure I.10 : Dégradation des constituants de la biomasse lignocellulosique | 36 |
| Figure I.11 : Structures chimiques principales détectées dans la pseudo-lignine (A. carbonyle, B. carboxyle, C. aromatique) | 36 |
| Figure I.12 : Mécanisme de clivage de la liaison β -0-4 aryl-ether (<i>Froass et al. (1998)</i>) Erreur ! Signet non défini. | |
| Figure I.13 : Microscopie confocale à fluorescence montrant la distribution de la lignine au sein de copeaux d'Eucalyptus non traité (A) et prétraité (B) (barre = 20 μ m) (<i>Araya et al. (2015)</i>) | 40 |
| Figure I.14 : Modèles simplifiés de Selig et al. (2007) (A) et de Donohoe et al. (2008) (B) pour la migration de la lignine durant un prétraitement à l'acide dilué | 40 |
| Figure I.15 : Schéma général d'une installation continue d'explosion vapeur (<i>Ogier et al. (1999)</i>).... | 48 |
| Figure I.16 : Modèle mécanique d'explosion vapeur de paille de maïs à différentes granulométries proposé par <i>Liu et al. (2013)</i> | 50 |
| Figure I.17 : Microscopie électronique à balayage de chanvre prétraité à 180 s-210°C (A) (barre d'échelle : 1 mm) ; à 180 s-220°C (B) (barre d'échelle : 100 μ m) et à 180 s-240°C (C) (échelle graduée : 100 μ m) (<i>Vignon et al. (1995)</i>) | 53 |

| | |
|--|-----|
| Figure I.18 : Coupe transversale de cellules de copeaux de peuplier en microscopie électronique à transmission (A. Non prétraité / B. Prétraité à 227°C durant 3 min) (Toussaint et al. (1991))..... | 53 |
| Figure I.19 : Microscopie électronique à balayage de chanvre non prétraité (A) et prétraité à forte sévérité ($F_0 = 4.45$ et $\Delta P = 32$ bar) (B) (Putnina et al. (2012))..... | 53 |
| Figure I.20 : Microstructure de la paille de blé non prétraité (A) et prétraité à 7 bar durant 15 min (B) (Maache-Rezzoug et al. (2011)) | 55 |
| Figure I.21 : Image MEB de glucose, 5-HMF, Xylose et Furfural après prétraitement à 180°C durant 24 h (Titirici et al. (2008))..... | 57 |
| Figure I.22 : Spectre infrarouge d' α -cellulose, d'holocellulose, de pseudo-lignine extraite après prétraitement d' α -cellulose et d'holocellulose A (180°C, 40 min, 0.1M H ₂ SO ₄) et B (180°C, 60 min, 0.2M H ₂ SO ₄) adapté de Hu et al. (2012b)..... | 58 |
| Figure I.23 : Proposition de voies réactionnelles pour la formation de pseudo-lignine (Hu et al. (2012b))..... | 59 |
| Figure I.24 : Rendements en glucose après hydrolyse enzymatique d'holocellulose pure et couplée à de la lignine prétraitée (EMAL DAP) et ou de la pseudo-lignine (Pseudo-L) (Hu et al. (2012b))..... | 60 |
| | |
| Figure II.1 : Photographie de l'unité de cuisson U868..... | 89 |
| Figure II.2 : Représentation schématique de l'unité autoclave Parr 4530..... | 93 |
| Figure II.3 : Photographie de l'unité pilote d'explosion à la vapeur du département de Chimie Biologie Industrielle-ULG-Gembloux | 95 |
| Figure II.4 :Schéma général du pilote d'explosion à la vapeur du département de Chimie Biologie Industrielle-ULG- Gembloux (Jacquet et al. (2012)) | 95 |
| Figure II.5 : Méthodologie de caractérisation des substrats | 97 |
| Figure II.6 : Distribution et distribution cumulée en volume (A) et en nombre (B) en fonction du diamètre des particules pour un échantillon de paille de blé prétraité à 140°C durant 60 min et 1% pds d'H ₂ SO ₄ | 104 |
| Figure II.7 : Représentation schématique de l'ATR-FTIR..... | 105 |
| Figure II.8 : Thermogramme de la cellulose Avicel PH101..... | 106 |
| Figure II.9 : Représentation schématique des méthodologies expérimentales et des techniques de caractérisations mises en œuvre durant cette thèse | 108 |
| | |
| Figure III.1 : Bilan entrée / sortie du prétraitement de cuisson acide en fonction de la masse totale (A) et en fonction de la matière sèche (B) | 119 |
| Figure III.2 : Résultats expérimentaux bruts pour les bilans matières de chacun des sucres en fonction du facteur de sévérité (A/ glucose ; B/ xylose ; C/ galactose ; D/ arabinose)..... | 121 |
| Figure III.3 : Rendements des différents sous-produits du xylane en fonction du facteur de sévérité (A/ xylose polymérique, B/ xylose oligomérique, C/ xylose monomérique, D/ furfural, E/ « humines ») | 124 |

| | |
|--|-----|
| Figure III.4 : Rendements des sous-produits de la cellulose en fonction du facteur de sévérité..... (A/ glucose polymérique, B/ glucose oligomérique, C/ glucose monomérique, D/ 5-HMF, E/ « humines ») | 126 |
| Figure III.5 : Réactivité des substrats prétraités en fonction du facteur de sévérité (en couleur, les substrats d'intérêts sélectionnés pour la suite de l'étude)..... | 128 |
| Figure III.6 : Rendements cumulés en glucose (A) et xylose (B) monomériques après prétraitement (zone claire) et après hydrolyse enzymatique (zone foncée)..... | 129 |
| Figure III.7 : Approche multi-technique de caractérisation de la biomasse lignocellulosique (<i>Passicoussset (2018)</i>) | 131 |
| Figure III.8 : Evolution du rendement massique de marc lavé en fonction du facteur de sévérité | 132 |
| Figure III.9 : Evolution de la teneur en lignine insoluble en fonction du facteur de sévérité (A) et des spectres infrarouges à transformée de Fourier correspondants(B) | 133 |
| Figure III.10 : Distribution volumique de la taille des particules en fonction du diamètre de particule (A) ; Diamètre moyen en fonction du facteur de sévérité (B) ; Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique en fonction du diamètre moyen des particules (C)..... | 134 |
| Figure III.11 : Images par microscopie électronique à balayage des substrats prétraités..... | 136 |
| Figure III.12 : Distribution du volume poreux des substrats prétraités | 137 |
| Figure III.13 : Surface spécifique en fonction du facteur de sévérité (A) ; Surface spécifique en fonction de la teneur en xylane des substrats prétraités (B) ; Surface spécifique en fonction du rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique (C)..... | 139 |
| Figure III.14 : Evolution de l'indice de cristallinité en fonction du facteur de sévérité (A) et relation entre le rendement à l'hydrolyse enzymatique et l'indice de cristallinité (B)..... | 140 |
| Figure III.15 : Résumé sur les relations morphologie/réactivité des substrats prétraités après cuisson acide | 142 |
| | |
| Figure IV.1 : Schéma de la méthodologie expérimentale mise en place pour l'étude de l'impact spécifique de la détente explosive | 152 |
| Figure IV.2 : Comparaison des unités de cuisson acide U868 et Parr sur la composition chimique des substrats prétraités (A) et sur leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique (B) | 156 |
| Figure IV.3 : Présentation des différents échantillons produits dans cette étude | 158 |
| Figure IV.4 : Composition en polysaccharides pour les substrats précuits et les substrats précuits et explosés | 160 |
| Figure IV.5 : Rendements en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique pour les substrats précuits et les substrats précuits et explosés..... | 161 |
| Figure IV.6 : Impact de la détente explosive sur de la paille native et précuite (A/ Evolution de la composition chimique des substrats en fonction de la détente appliquée ; B/ Rendement à l'hydrolyse enzymatique des substrats en fonction de la détente appliquée) | 162 |

| | |
|---|-----|
| Figure IV.7 : Evolution des rendements en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en xylane des substrats | 163 |
| Figure IV.8 : Images par microscopie électronique à balayage des substrats précuits et des substrats précuits et explosés (Grossissement de 50 ; barre = 1 mm) | 166 |
| Figure IV.9 : Présence de gouttelettes d'humines sur le substrat fortement prétraité (G-1.00,20,180) non explosé et explosé à 20 bar..... | 166 |
| Figure IV.10 : Distribution du volume poreux pour les substrats précuits et pour les substrats précuits + explosés..... | 167 |
| Figure IV.11 : Evolution de la surface spécifique en fonction des conditions opératoires de prétraitement (A) ; Evolution de la surface spécifique en fonction de la teneur en xylane (B) ; Surface spécifique en fonction du rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique (C) | 169 |
| Figure IV.12 : Image en microscopie confocale à balayage laser avec coloration à la safranine de la paille native et précuite à 140°C durant 20 min à 1%pds d'H ₂ SO ₄ et explosés à 7 et 20 bar | 173 |
| | |
| Figure V.1 : Images de microscopie électronique à balayage de la cellulose Avicel avant et après cuisson..... | 185 |
| Figure V.2 : Analyses physico-chimiques de la cellulose Avicel avant et après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)..... | 187 |
| Figure V.3 : Images de microscopie électronique à balayage pour le xylane d'épis de maïs Roth avant et après cuisson..... | 188 |
| Figure V.4 : Analyses physico-chimiques pour le xylane d'épis de maïs Roth avant et après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)..... | 189 |
| Figure V.5 :Images de microscopie électronique à balayage de la lignine Protobind avant et après cuisson..... | 190 |
| Figure V.6 : Analyses physico-chimiques de la lignine Protobind avant et après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)..... | 191 |
| Figure V.7 :Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de lignine Protobind après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément | 193 |
| Figure V.8 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de lignine Protobind après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)..... | 194 |
| Figure V.9 :Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de xylane Roth après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément | 196 |

| | |
|--|-----|
| Figure V.10 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de xylane Roth après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)..... | 197 |
| Figure V.11 :Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément | 199 |
| Figure V.12 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)..... | 200 |
| Figure V.13 :Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de cellulose Avicel, de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément..... | 203 |
| Figure V.14 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de cellulose Avicel, de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)..... | 204 |
| Figure V.15 :Représentation schématique des mécanismes de formation des humines présentes dans la fraction solide..... | 205 |
| Figure V.16 : Résultats expérimentaux bruts pour les bilans matières du glucose (A) et du xylose (B) en fonction du facteur de sévérité..... | 208 |
| Figure V.17 : Rendements des sous-produits de la cellulose et du xylane présents dans la pâte à papier en fonction du facteur de sévérité (ligne continue = tendances observées sur la paille de blé) | 209 |
| Figure V.18 : Fraction insoluble des substrats prétraités en fonction du facteur de sévérité | 210 |
| Figure V.19 : Réactivité des substrats à 72h d'hydrolyse enzymatique en fonction du facteur de sévérité | 211 |
| Figure V.20 : Les différents échantillons produits par cuisson acide de la pâte à papier blanchie | 212 |
| Figure V.21 : Images MEB de la pâte à papier brute et prétraitées aux 4 jeux de conditions opératoires (A/ -6.52 ; B/ $F_0= 1.53$; C/ $F_0 = 2.00$; D/ $F_0=2.23$; E/ $F_0=2.67$) (barre d'échelle de $20 \mu\text{m}$) | 213 |
| Figure V.22 : Spectres infrarouges du substrat natif et des substrats prétraités aux 4 jeux de conditions opératoires | 214 |
| Figure V.23 : Surface spécifique de la pâte à papier en fonction du facteur de sévérité (A), évolution de la surface spécifique en fonction de la teneur en résidu solide (B) et distribution du volume poreux des échantillons (C) | 215 |
| Figure V.24 : Spectres ATG (gauche) et dérivés (droite) des substrats natif et prétraités | 216 |

TABLES DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau I.1 : Teneur en cellulose, hémicelluloses et lignine de diverses biomasses lignocellulosiques (Godin <i>et al.</i> (2010))..... | 20 |
| Tableau I.2 :Caractéristiques des enzymes présentes dans les cocktails enzymatiques pour l’hydrolyse de la biomasse lignocellulosique | 24 |
| Tableau I.3 : Récapitulatif des différents types de prétraitement de la biomasse lignocellulosique | 30 |
| Tableau I.4 : Comparatif des différentes conditions opératoires optimales pour un prétraitement à l’acide dilué | 39 |
| Tableau I.5 : Influence de la taille des particules avant un prétraitement à l’acide dilué..... | 43 |
| Tableau I.6 : Evolution de l’indice de cristallinité en fonction des conditions opératoires de prétraitement..... | 46 |
| Tableau I.7 : Impact de la détente explosive sur la réactivité des substrats prétraités (* estimation manuelle)..... | 52 |
| | |
| Tableau II.1 : Caractéristiques des cocktails enzymatiques | 101 |
| Tableau III.1 : Analyse compositionnelle de la paille de blé | 116 |
| Tableau III.2 : Conditions opératoires de prétraitement..... | 118 |
| Tableau III.3 : Comparaison d’études de cuisson acide sur les bilans glucose et xylose en fonction du facteur de sévérité..... | 122 |
| | |
| Tableau IV.1 : Conditions opératoires des cuissons réalisées dans le cadre de l’étude sur la détente explosive..... | 154 |
| Tableau IV.2 : Comparaison des caractéristiques techniques et opératoires des 2 outils de cuisson utilisés durant cette thèse..... | 155 |
| Tableau IV.3 :Température finale du réacteur et temps de montée en pression pour les différentes consignes de dépressurisation | 156 |
| Tableau IV.4 : Conditions d’analyse par microscopie confocale : longueurs d’excitation et d’émission ainsi que puissance du laser d’excitation pour des images en zoom $\times 10$ | 171 |
| | |
| Tableau V.1 : Analyse compositionnelle des substrats modèles | 183 |
| Tableau V.2 : Quantités introduites de chaque substrat modèle..... | 184 |
| Tableau V.3 : Bilan glucose exprimé en masse sur la cuisson de la cellulose Avicel..... | 185 |
| Tableau V.4 : Bilan xylose exprimé en masse sur la cuisson du xylane d’épis de maïs Roth | 188 |
| Tableau V.5 : Bilan lignine exprimé en masse sur la cuisson de la lignine de paille de blé Protobind | 190 |

| | |
|--|-----|
| Tableau V.6 : Bilan du mélange de cellulose Avicel + lignine Protobind exprimé en masse | 192 |
| Tableau V.7 : Bilan du mélange de cellulose Avicel + xylane Roth exprimé en masse réelle | 195 |
| Tableau V.8 : Bilan du mélange de lignine Protobind + xylane Roth exprimé en masse réelle | 198 |
| Tableau V.9 : Bilan du mélange de lignine Protobind + xylane Roth + cellulose Avicel exprimé en masse réelle | 201 |
| Tableau V.10 : Analyse compositionnelle de la pâte à papier..... | 206 |
| Tableau V.11 : Bilans massiques des pâtes à papier prétraitées..... | 210 |

INTRODUCTION

Contexte

Contexte énergétique actuel

Le développement exponentiel des activités humaines depuis la première révolution industrielle au XIX^{ème} siècle conduit aujourd'hui l'homme à une prise de conscience planétaire quant à son impact sur le changement climatique et sur la raréfaction des ressources naturelles. Malgré cela, les besoins en termes de développement économique continuent à requérir toujours plus d'énergie (croissance de la demande énergétique mondiale estimée à +37 % d'ici 2040 (Agence Internationale de l'Energie (AIE)). Ces multiples facteurs socio-économiques nécessitent donc de renouveler l'offre énergétique, actuellement basée majoritairement sur le pétrole, en le substituant par un mix énergétique plus efficace et plus décarboné.

Ce mix énergétique s'inscrit directement dans le concept de transition énergétique développé dès 1980 en Allemagne (*Krause et al. (1980)*). Mais, malgré un constat vieux de 40 ans, la consommation mondiale en énergie est encore principalement basée sur l'utilisation de ressources fossiles pour 79.5 % contre seulement 18.3 % pour les énergies renouvelables et 2.2 % pour l'énergie nucléaire (Figure 1).

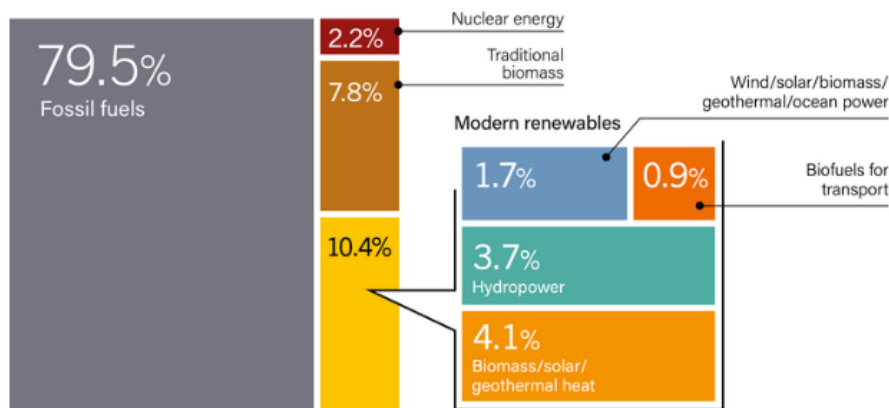


Figure 1 : Estimation de la part des énergies renouvelables par rapport à la consommation énergétique globale en 2016 (*Renewable Energy Policy Network for the 21st Century*)

En s'intéressant à la consommation énergétique par secteur, il est possible de constater que la part du chauffage et de la climatisation représente 48% de la consommation énergétique globale, contre 32 % et 20 % pour le transport et la production d'électricité respectivement (Figure 2). Plus spécifiquement, dans le domaine particulier du transport, la part d'énergie renouvelable ne représente que 10 % de l'énergie consommée, le complément étant assuré par le pétrole et, dans une moindre mesure, le gaz naturel. Cependant, cet état de fait pourrait être modifié dans les prochaines années grâce au développement accéléré des véhicules électriques et des biocarburants. Par exemple, l'AIE considère les biocarburants comme une des sources possibles d'énergie qui pourrait diminuer les émissions de gaz à effet de serre (dioxyde de carbone) et réduire la dépendance aux carburants fossiles. Ainsi la production de biocarburants dans le domaine du transport pourrait passer de

55 Mtep¹ aujourd'hui à 750 Mtep d'ici 2050, soit une évolution de leur part dans la demande globale en énergie de 2.8 % à 27.0 %.

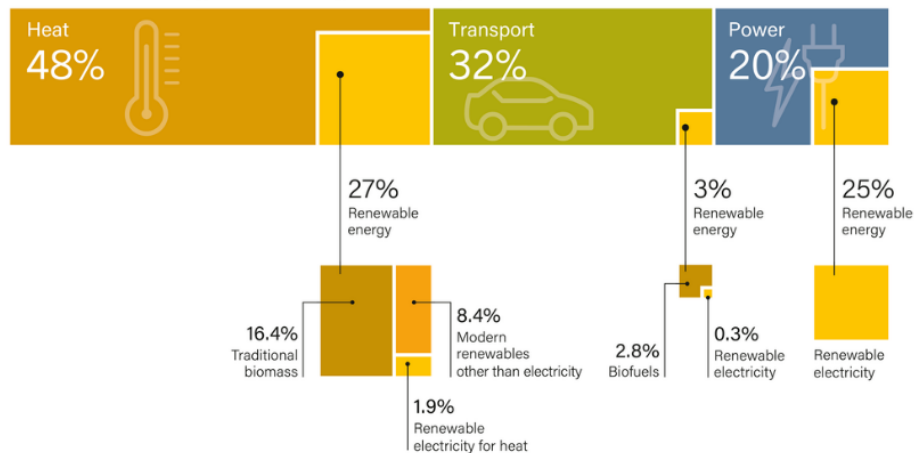


Figure 2 : Consommation énergétique totale par secteur en 2015 (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century)

C'est pour toutes ces raisons que de nombreux pays ont aujourd'hui initié des politiques très offensives sur le marché des biocarburants, aujourd'hui en pleine expansion. Pour ce faire, ces derniers s'appuient sur des incitations fiscales et/ou des obligations d'incorporation afin de développer leurs propres marchés locaux. En 10 ans, les investissements pour l'énergie renouvelable et les biocarburants ont ainsi été multipliés par 6 dans le monde. Actuellement, 144 pays, contre seulement 44 en 2005, ont montré leur implication active en mettant en place des objectifs et des politiques claires sur le sujet. Par exemple, la directive européenne 2009/28/CE impose aujourd'hui à ses Etats membres d'incorporer 10 % vol de biocarburants dans leurs carburants routiers pour 2020 (*Parlement Européen et du Conseil, (2009)*). Cette directive s'intègre ainsi directement dans la stratégie 20-20-20 adoptée par le Conseil Européen en 2007 qui fixe un objectif de 20 % de réduction des gaz à effet de serre et un remplacement de 20 % des carburants fossiles par des énergies renouvelables en 2020.

Focus sur les biocarburants

Selon le ministère français de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, les biocarburants couvrent l'ensemble des carburants liquides, solides ou gazeux produits à partir de la biomasse et destinés à une valorisation énergétique dans les transports. Ils peuvent être utilisés comme additifs ou comme compléments aux carburants fossiles. Actuellement il est devenu courant de classer les biocarburants selon trois générations :

1. La première génération (1G), la plus mature, utilise la partie alimentaire de certaines ressources agricoles (huile végétale, saccharose issue de canne à sucre ou de betterave sucrière, amidon provenant de céréales, etc...) pour produire des biocarburants qui sont ensuite mélangés aux carburants pétroliers traditionnels. De par leur type de ressource particulière, on parle aussi d'agrocarburants. Dans cette génération, il existe principalement le bioéthanol 1G qui est produit par fermentation des sucres et qui est incorporé dans les essences (la norme SP95-E10 en Europe autorise ainsi

¹Mégatonne équivalent pétrole

l'incorporation de bioéthanol jusqu'à 10 % vol) et le biodiesel qui est produit par transestérification des huiles végétales et qui est incorporé dans les gazoles (les gazoles européens, dits B7, peuvent ainsi intégrer jusqu'à 7 % vol de biodiesel). Ces biocarburants 1G sont fortement utilisés de par le monde, notamment aux Etats-Unis (bioéthanol à partir de maïs), au Brésil (bioéthanol à partir de canne à sucre) et en Europe (biodiesel à partir d'huile de colza). Une des principales critiques faite à cette première génération est d'utiliser la partie alimentaire des plantes et donc d'entrer en compétition avec les besoins de la planète en termes de nourriture.

2. La seconde génération (2G), en fin de développement, exploite la partie lignocellulosique des plantes, c'est-à-dire les résidus agricoles et forestiers, les pailles ou encore, dans certains cas, des cultures dédiées de plantes lignocellulosiques à haut rendement (sorgho, miscanthus, etc...). Dans cette deuxième génération, deux filières coexistent à nouveau en fonction de sa finalité d'utilisation : essence ou gazole. La filière essence est principalement basée sur un procédé biochimique qui permet de produire du bioéthanol (dit 2G) à partir des sucres obtenus par hydrolyse de la cellulose et des hémicelluloses. La filière gazole passe, quant à elle, par un procédé thermochimique (gazéification / synthèse Fisher-Tropsch / hydroisomérisation) qui permet de produire des hydrocarbures correspondant à des coupes de distillats moyens (kérosène et gazole). Ces deux approches sont encore en cours de développement même si plusieurs unités de bioéthanol 2G ont été construites récemment dans le monde. En France, ces filières de seconde génération sont principalement structurées par le projet Futurol (bioéthanol 2G) et le projet BioTFuel (biodiesel 2G) auxquels participe activement IFP Energies nouvelles.
3. La troisième génération (3G) est basée sur la conversion de biomasse algale et est toujours en phase de R&D. Ces biocarburants de dernière génération présentent des avantages significatifs par rapport à leurs homologues de 1^{ère} et 2^{ème} génération comme, par exemple, leur implantation sur des surfaces inaptes à toute forme d'agriculture. De nombreuses études montrent aussi que leurs rendements énergétiques à l'hectare seraient notablement supérieurs à ceux des plantes terrestres. Cependant, les procédés actuels de production et de conversion d'algues en carburants sont très énergivores et nécessitent beaucoup d'eau, ce qui conduit à des bilans environnementaux finalement mitigés, avec souvent des rendements énergétiques trop faibles et des coûts élevés de production (*Clark and Deswarte, (2015)*). C'est pourquoi, l'Union Européenne continue encore aujourd'hui à soutenir différents projets (ALL-GAS, BIOFAT, INTESUSAL, etc...) afin d'améliorer et d'optimiser cette génération à fort potentiel.

Focus sur le bioéthanol de seconde génération

Le bioéthanol 2G est aujourd'hui le biocarburant de seconde génération le plus avancé technologiquement. Plusieurs unités de démonstration ou d'unités de pré-industrialisation ont ainsi été construites ces dernières années comme, par exemple, l'unité BioChemTex à Crescentino, Italie (2012) ou l'unité Dupont à Nevada, Iowa (2015).

La production de bioéthanol 2G utilise de la biomasse lignocellulosique comme ressource et est basée sur une série de conversions thermochimiques et biochimiques permettant la transformation

des polysaccharides constitutifs de la lignocellulose (cellulose, hémicelluloses) en sucres fermentescibles puis en éthanol. Ce processus implique trois étapes clés : le prétraitement de la biomasse, l'hydrolyse enzymatique de la cellulose et la fermentation des sucres. Les principales différences entre les différents procédés actuellement sur le marché résident dans le prétraitement qui peut être physique (broyage, pyrolyse), chimique (prétraitement à l'acide dilué, prétraitement alcalin, procédé organosolv), physicochimique (explosion à la vapeur, AFEX, explosion au CO₂, etc...) ou biologique et dans l'intégration, plus ou moins poussée, des étapes d'hydrolyse et de fermentation.

Le rôle principal du prétraitement est d'améliorer la réactivité de la cellulose contenue dans la biomasse lignocellulosique afin d'accélérer l'étape ultérieure d'hydrolyse enzymatique. Chaque prétraitement possède ses propres caractéristiques et ses propres contraintes qui le rendent plus ou moins opérable technologiquement et viable économiquement. Par exemple, les prétraitements biologiques sont peu coûteux et respectueux de l'environnement mais les temps de séjour dans les fermenteurs sont très longs (plusieurs semaines) et une partie des sucres produits doit être utilisée comme source de carbone pour la croissance des microorganismes intervenant dans le procédé. A contrario, les prétraitements thermochimiques requièrent des températures élevées et des consommables (acides, bases, solvants, etc...) mais permettent des temps de séjour beaucoup plus courts (de quelques minutes à quelques heures). Actuellement le prétraitement le plus prometteur pour rendre le substrat le plus réactif possible à l'hydrolyse enzymatique est le prétraitement par explosion à la vapeur. En effet ce prétraitement élimine la majeure partie des hémicelluloses, ce qui améliore fortement la réactivité de la biomasse à l'hydrolyse enzymatique. Pour ce prétraitement, la température est fixée entre 160 et 260°C pour un temps de séjour dans le réacteur allant de quelques secondes à quelques minutes (30 sec à 20 min). Au niveau économique, son coût est relativement modéré. Cependant lorsque des conditions opératoires sévères sont appliquées, la récupération totale des sucres en C₅² et des sucres en C₆³ peut être diminuée à cause de leur transformation en produits de dégradation, respectivement en furfural et en 5-HMF. Ce prétraitement est aussi très efficace en présence d'acide (souvent l'acide sulfurique pour des raisons de coût et de disponibilité) qui a alors un rôle catalytique sur les réactions de dépolymérisation.

Le rôle principal de l'hydrolyse enzymatique est d'hydrolyser la cellulose pour la transformer en glucose qui pourra ensuite être fermenté. Cette opération nécessite des cocktails enzymatiques, c'est-à-dire des mélanges plus ou moins complexes de différentes enzymes permettant d'hydrolyser la cellulose (nommées cellulases) mais aussi, dans certains cas, les hémicelluloses (nommées hémicellulases). L'hydrolyse enzymatique se fait en général entre 45 et 55°C à des pH compris entre 4 et 6. Ces enzymes sont produites par différentes espèces de champignons (*Trichoderma*, *Aspergillus*, etc...) ou de bactéries (*Clostridium*, *Fibrobacter*, etc...); elles sont soit achetées chez un producteur d'enzymes (Novozymes, Dupont, DSM, etc...), soit produites sur site. L'avantage principal de la production sur site est de réduire les coûts des enzymes qui peuvent représenter jusqu'à 30% du coût de production du bioéthanol.

Le rôle principal de la fermentation est de transformer les sucres fermentescibles en éthanol par fermentation anaérobie. Elle fait le plus souvent appel à des levures de type *Saccharomyces cerevisiae* reconnues pour leur robustesse et leur capacité de résistance aux conditions industrielles. Les températures de fermentation sont comprises entre 30 et 35°C et les pH entre 4 et 5. Ces levures

² Sucres à 5 atomes de carbone, notamment le xylose et l'arabinose

³ Sucres à 6 atomes de carbone, notamment le glucose, le mannose et le galactose

fermentent naturellement le glucose mais sont incapables de fermenter simultanément les pentoses. Plusieurs entreprises ont donc travaillé pour optimiser par génie génétique ces levures industrielles et les rendre capables de fermenter aussi bien le glucose que les pentoses. Aujourd'hui, plusieurs levures MGM (micro-organismes génétiquement modifiés), capables de fermenter aussi bien les sucres C₆ que les sucres C₅, sont disponibles sur le marché comme, par exemple, les levures de la famille Cellux proposées par le groupe Lesaffre.

Objectifs de la thèse

Même si les procédés de production de bioéthanol 2G sont aujourd'hui en fin de développement et commencent à être industrialisés par plusieurs acteurs du marché comme Dupont, POET-DSM, Beta-Renewables, etc..., il existe encore de nombreux défis à relever pour améliorer leurs performances techniques et leur viabilité économique. C'est le cas notamment de l'étape de prétraitement par explosion vapeur qui est la technologie qui a été le plus souvent retenue par les industriels mais qui reste encore mal comprise au niveau des effets physico-chimiques mis en œuvre et de leur impact sur les caractéristiques de la biomasse prétraitée.

En effet, malgré de nombreux articles et revues disponibles dans la littérature sur le prétraitement par explosion à la vapeur, des recherches doivent encore être menées pour comprendre, évaluer et optimiser l'impact des conditions opératoires du procédé (temps, température, charge en acide, détente explosive, etc...) sur la composition et la structure des substrats obtenus et leur réactivité en hydrolyse enzymatique. Le travail de thèse présenté dans ce mémoire s'inscrit dans ce contexte particulier et se propose de mieux appréhender l'ensemble des phénomènes physico-chimiques ayant lieu dans un prétraitement par explosion à la vapeur en s'appuyant notamment sur une discrimination expérimentale des phénomènes chimiques (réactions de dépolymérisation) et des phénomènes physiques (détente explosive) ainsi que sur une caractérisation multi-techniques et multi-échelles de la biomasse lignocellulosique obtenue après prétraitement. L'objectif est notamment de comprendre quelles sont les principales caractéristiques de la biomasse lignocellulosique qui expliquent les différences de réactivité observées lors de l'étape de l'hydrolyse enzymatique et de voir comment le prétraitement impacte ses caractéristiques et, en conséquence, modifie sa réactivité. Le travail présenté dans ce mémoire a été décomposé en cinq chapitres qui suivent le déroulement chronologique de la méthodologie mise en œuvre durant les trois ans de thèse.

Le chapitre I présente ainsi une revue bibliographique détaillée sur les différents procédés permettant la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en éthanol ainsi que sur les techniques de caractérisation des substrats prétraités utilisées dans la littérature. Une synthèse plus approfondie des prétraitements par cuisson acide et par explosion à la vapeur est aussi fournie dans ce chapitre ainsi qu'un état de l'art sur les produits ultimes de dégradation (appelés pseudo-lignine ou humines dans la littérature) qui peuvent être rencontrés si les conditions de prétraitement sont particulièrement sévères et qui sont aujourd'hui largement reconnus comme étant des inhibiteurs pour l'hydrolyse enzymatique. L'analyse fine de cette littérature abondante a ainsi permis de considérer les paramètres clés, certains encore non élucidés voire contradictoires, qu'il est nécessaire d'intégrer à la réflexion de recherche afin de mettre en place la stratégie et les expérimentations qui ont été suivies durant la thèse.

Le chapitre II présente donc les matériels et les méthodes utilisés pour réaliser les différentes études expérimentales. Il est possible d'y trouver les informations relatives aux différentes biomasses lignocellulosiques utilisées durant la thèse ainsi que les caractéristiques des matériels employés pour réaliser les expérimentations de prétraitement et analyser les produits obtenus. Un effort tout particulier a notamment été fait sur les méthodologies de post-traitement des biomasses prétraitées afin de garantir une caractérisation la plus complète possible et permettre le bouclage des bilans matière sur les expérimentations de cuisson acide (Chapitre III) et de détente explosive (Chapitre IV).

Le chapitre III se focalise sur le prétraitement par cuisson acide, en étudiant notamment l'impact des conditions opératoires de prétraitement sur la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique. Cette étude a plusieurs objectifs qui ont été menés en parallèle. Tout d'abord, elle a

permis de mettre en place, en début de thèse, une méthodologie expérimentale complète sur paille de blé pour étudier le prétraitement par cuisson acide dans des conditions maximales de représentativité et de reproductibilité. Elle a aussi permis l'obtention d'une base de plusieurs dizaines de pailles de blé prétraitées dans des conditions de sévérité très différentes, base qui a ensuite permis de développer un modèle de prédiction sur la composition de ces dernières. Enfin, elle a permis d'isoler et d'étudier l'étape de cuisson ayant lieu au sein des réacteurs d'explosion à la vapeur en s'affranchissant de l'étape de détente explosive. Cette étude expérimentale a été réalisée dans les laboratoires d'IFPEN.

Le chapitre IV est consacré à l'étude spécifique de la détente explosive qui a lieu à la sortie du prétraitement par explosion à la vapeur. Pour ce faire, des expérimentations ont été réalisées sur un outil d'explosion vapeur batch afin d'étudier l'impact de la dépressurisation sur des substrats déjà pré-cuits en limitant au maximum les réactions de dépolymérisation durant la montée en pression. Cette étude expérimentale a été réalisée sur un outil batch disponible à l'Université de Liège-Gembloux (département de Chimie Biologie Industrielle, Agro-Bio Tech).

Le chapitre V se concentre sur des composés relativement peu étudiés dans la littérature car n'apparaissant que dans le cas de prétraitements à très forte sévérité, c'est-à-dire les humines. Ces composés, issus en partie de la polycondensation des composés de dégradation des sucres durant les prétraitements, ont un effet très négatif sur la réactivité en hydrolyse enzymatique, notamment en masquant une fraction plus ou moins importante de la cellulose aux enzymes. Une étude expérimentale a donc été mise en place en fin de thèse pour comprendre les mécanismes de formation de ces produits et leur impact sur l'hydrolyse enzymatique.

Cet ensemble d'études permet d'avoir une vision la plus complète possible sur l'impact des prétraitements par cuisson acide et par explosion à la vapeur. Ce travail est à rapprocher d'une autre thèse « Descripteurs physico-chimiques de biomasses lignocellulosiques en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in situ », réalisée en parallèle par J. Passicouset à l'IFPEN. Cette seconde thèse a pour but de compléter les résultats présentés ici en effectuant des analyses plus avancées sur les substrats prétraités afin d'améliorer la compréhension globale reliant les caractéristiques physico-chimiques à la réactivité en hydrolyse enzymatique.

Références

Clark and Deswarte (2015)

Clark J. and Deswarte F. (2015) **Introduction to chemicals from biomass.**

Krause et al. (1980)

Krause H., Bossel H. and Müller-Reißman (1980) **Energiewende wachstum und wohlstand ohne erdöl und uran.***Fischer Verlag.*

Directive 2009/28/CE

Parlement Européen et du Conseil (2009) **Directive 2009/28/CE.**

Renewable Energy Policy Network for the 21st Century Renewables (2017) Global status report: Key findingd 2017, Paris.

CHAPITRE I : ETAT DE L'ART

Résumé

Ce chapitre présente les différents procédés de seconde génération (2G) permettant la bioconversion de la biomasse lignocellulosique en éthanol ainsi que les techniques de caractérisation des substrats prétraités qui sont principalement utilisées dans la littérature. Ensuite deux études plus approfondies sur le prétraitement de cuisson acide puis sur le prétraitement par explosion à la vapeur seront exposées. Enfin la dernière partie fait état des connaissances sur les produits « ultimes » de dégradation (appelés pseudo-lignine ou humines dans la littérature) qui sont produits durant ces prétraitements à forte sévérité.

PLAN DU CHAPITRE

| | |
|--|-----------|
| I.1. Introduction..... | 15 |
| I.2. Procédé de bioconversion de la lignocellulose en éthanol..... | 16 |
| I.2.A. Composition chimique de la biomasse..... | 16 |
| I.2.A.1. La cellulose..... | 16 |
| I.2.A.2. Les hémicelluloses..... | 17 |
| I.2.A.3. La lignine..... | 18 |
| I.2.A.4. Les composés mineurs..... | 20 |
| I.2.B. Les étapes clés du procédé biologique de transformation de la lignocellulose en éthanol..... | 21 |
| I.2.B.1. Le prétraitement..... | 22 |
| I.2.B.2. L'hydrolyse enzymatique..... | 22 |
| I.2.B.3. La fermentation..... | 24 |
| I.2.B.4. Les différentes configurations..... | 25 |
| I.2.B.5. La distillation..... | 26 |
| I.2.C. Focus sur les différents types de prétraitement et leurs impacts sur les caractéristiques physico-chimiques de la biomasse..... | 26 |
| I.2.C.1. Les différentes classes de prétraitement..... | 27 |
| I.2.C.2. Principales caractéristiques physico-chimique de la biomasse impactées par le prétraitement..... | 32 |
| I.3. La cuisson acide : prétraitement à l'acide dilué..... | 35 |
| I.3.A. Généralités sur le procédé..... | 35 |
| I.3.B. Influence des conditions opératoires..... | 36 |
| I.3.B.1. Facteur de sévérité..... | 37 |
| I.3.B.2. Influence des conditions opératoires de prétraitement sur le substrat..... | 37 |
| I.3.B.3. Nature de l'acide..... | 41 |
| I.3.B.4. Influence de la granulométrie initiale du substrat..... | 42 |
| I.3.B.5. Conclusion partielle..... | 43 |
| I.3.C. Evolution des caractéristiques physiques de la biomasse après prétraitement et leur influence sur la réactivité..... | 44 |
| I.3.C.1. La surface spécifique..... | 44 |
| I.3.C.2. L'indice de cristallinité..... | 44 |
| I.3.D. Conclusion sur le prétraitement à l'acide dilué..... | 46 |
| I.4. Le prétraitement par explosion à la vapeur..... | 48 |
| I.4.A. Impact des conditions opératoires..... | 48 |
| I.4.A.1. Variations des conditions opératoires du prétraitement..... | 48 |
| I.4.A.2. Influence de la taille des particules..... | 49 |
| I.4.A.3. Influence de la teneur en humidité du substrat..... | 50 |
| I.4.A.4. Impact de la détente explosive..... | 51 |
| I.4.B. Influence des caractéristiques physiques de la biomasse après prétraitement..... | 52 |
| I.4.B.1. Impact sur la morphologie..... | 52 |
| I.4.B.2. Impact sur la surface spécifique..... | 54 |
| I.4.C. Conclusion sur le prétraitement par explosion à la vapeur..... | 55 |
| I.5. Les humines..... | 56 |
| I.5.A. Généralités..... | 56 |

| | |
|---|-----------|
| I.5.B. Caractérisation des humines | 56 |
| I.5.C. Mécanisme de formation | 58 |
| I.5.D. Impact sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique | 59 |
| I.5.E. Eviter la formation d'humines | 60 |
| I.6. Conclusion | 62 |
| I.7. Stratégie de la thèse..... | 64 |
| I.8. Références | 65 |

I.1.Introduction

Dans un contexte général de transition énergétique et d'augmentation de la demande en énergie estimée à 37 % d'ici 2040, les biocarburants sont une alternative prometteuse pour réduire les émissions de gaz à effet de serre ainsi que la dépendance aux énergies fossiles. En effet, la biomasse lignocellulosique, qui est la ressource renouvelable la plus abondante sur Terre, peut être utilisée pour la production de biocarburants et de molécules bio-sourcées. La bioconversion des substrats lignocellulosiques en sucres fermentescibles, puis en éthanol, implique trois étapes-clés : le prétraitement de la biomasse, la saccharification enzymatique et la fermentation.

Actuellement le prétraitement le plus prometteur aux niveaux économique et industriel pour rendre le substrat réactif à l'hydrolyse enzymatique est le prétraitement par explosion à la vapeur. Ce procédé, connu depuis les années 20 pour la production de bois aggloméré, a été réadapté plus récemment pour la production de biocarburants de seconde génération. Par conséquent, de nombreux articles et revues sont disponibles dans la littérature sur ce sujet. Cependant des recherches doivent encore être menées pour optimiser le procédé, notamment pour évaluer l'impact des conditions opératoires sur la réactivité en hydrolyse enzymatique des substrats prétraités. C'est pourquoi la revue bibliographique présentée ici s'intéressera principalement à la relation morphologie/réactivité de différents substrats obtenus après un prétraitement par explosion à la vapeur.

Cet état de l'art est ainsi axé selon 4 parties. En premier lieu, une description générale du procédé de production d'éthanol 2G sera présentée, en s'attachant à montrer, ses différentes étapes ainsi que les différentes configurations possibles. L'objectif sera alors de montrer l'apport des différentes opérations unitaires sur le procédé pris dans sa globalité. En second lieu, deux études plus approfondies seront apportées, l'une sur le prétraitement par cuisson acide (ou encore prétraitement à l'acide dilué) et l'autre sur le prétraitement par explosion vapeur. En effet l'un des objectifs de cette thèse est de comprendre indépendamment l'impact des deux phénomènes ayant lieu durant un prétraitement par explosion vapeur : la dégradation des hémicelluloses par traitement physico-chimique (cuisson acide) et la désintégration particulaire par traitement mécanique (détente explosive). Enfin un focus sera réalisé sur les produits ultimes de dégradation (appelé humines ou pseudo-lignine) formés durant ce type de prétraitement à forte sévérité et conduisant à une baisse significative de la réactivité en hydrolyse enzymatique des substrats prétraités.

I.2.Procédé de bioconversion de la lignocellulose en éthanol

I.2.A.Composition chimique de la biomasse

D'après l'article L211-2 du code de l'énergie, la biomasse est « la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales issues de la terre, de la mer, de la sylviculture et des industries connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers ».

La biomasse lignocellulosique est composée de trois fractions majeures (la cellulose, les hémicelluloses et la lignine) qui forment une structure tridimensionnelle complexe et résistante maintenue par des liaisons hydrogènes et covalentes. Ces trois composés représentent environ 90 % en poids de la matière sèche végétale (%pds MS) (Balat (2011)). On retrouve également d'autres fractions mineures comme les extractibles (tanins, terpènes, acides résiniques), les cendres, les sucres solubles ou encore les acides phénoliques.

I.2.A.1.La cellulose

La cellulose est la molécule organique la plus abondante sur Terre. Il s'agit d'un homopolymère linéaire dont le motif répétitif est le cellobiose. Ce dernier est constitué de deux β -D-glucopyranoses unis par une liaison glycosidique β -1, 4 (Fengel and Wegener (1989)).

Grâce à la linéarité des molécules de cellulose, ces dernières vont pouvoir se lier entre elles au niveau des groupements hydroxyles par des liaisons hydrogène pour former des microfibrilles. Les microfibrilles vont ensuite s'associer en macrofibrilles puis en fibres de cellulose (Figure I.1). L'arrangement de ces microfibrilles permet de distinguer deux zones, l'une cristalline et l'autre amorphe. Même si c'est un point fortement controversé, certains auteurs affirment que la cellulose cristalline serait plus récalcitrante à l'hydrolyse enzymatique que la cellulose amorphe (Huang (1975) ; Ladisch et al. (1983) ; Coughlan (1985) ; Walker and Wilson (1991)).

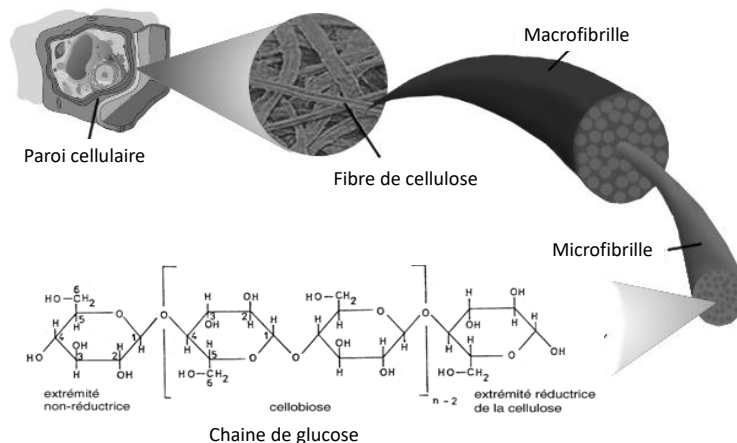


Figure I.1 : Représentation schématique de la cellulose

La cellulose étant un homopolymère constitué d'unités monomériques de glucose, il peut être défini par son degré de polymérisation moyen en nombre (\overline{DP}_n), en poids (\overline{DP}_w) ou en viscosité (\overline{DP}_v)

(Hallac and Ragauskas (2011)). Par exemple, le degré de polymérisation moyen en nombre est défini par :

$$\text{Equation I.1 : } \overline{DP}_n = \frac{M_n}{M_{W_{Glu}}} = \frac{\sum N_i \cdot M_i}{\sum N_i} / M_{W_{Glu}}$$

avec : N_i : le nombre de moles d'une fraction donnée i ayant une masse molaire M_i
 M_n : la masse moléculaire moyenne en nombre
 $M_{w, glu}$: la masse moléculaire du glucose anhydre (162 g.mol^{-1})

Il est admis qu'un degré de polymérisation moyen en poids inférieur à 30 correspond à un oligomère. Si ce degré moyen est supérieur à 30, il s'agit d'un polymère. En ce qui concerne la cellulose au sein de la biomasse native, le \overline{DP}_n peut varier en fonction de l'espèce végétale et de l'âge. A titre d'exemple, la cellulose du bois possède un degré moyen de polymérisation compris entre 6 000 et 12 000, le coton entre 10 000 et 12 000 et les algues ont un degré moyen de polymérisation supérieur à 20 000 (Zhang and Lynd (2004)).

I.2.A.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères de pentoses (D-xylose, L-arabinose) et d'hexoses (D-mannose, D-glucose et D-galactose) (Figure I.2). La proportion de ces différents sucres varie en fonction de l'espèce végétale et de l'organe étudié. Par exemple, les hémicelluloses de la paille de blé sont principalement composées d'arabinoxylanes (70 à 90 %pds des hémicelluloses) et de sucres mineurs de galactose, mannose et glucose alors que, dans les bois de résineux, les hémicelluloses sont principalement composées de galactoglucomannanes.

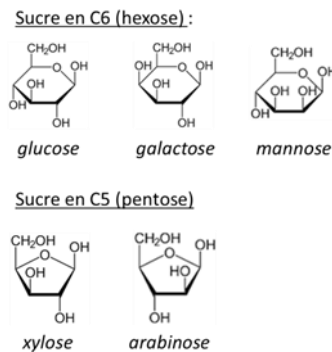


Figure I.2 : Structures cycliques des sucres présents dans les hémicelluloses

Les hémicelluloses possèdent des ramifications courtes d' homo et d'hétéropolymères liés par des liaisons β -1, 4 et occasionnellement par des liaisons β -1, 3. Les hémicelluloses se lient à la lignine par des liaisons covalentes, formant des structures appelées « complexes lignine-hydrate de carbone ». Elles peuvent également contenir des groupements de type méthyl-glucuronique et des acides féruliques (Figure I.3). Les hémicelluloses de bois ou de plantes annuelles présentent un degré moyen de polymérisation bien inférieur à celui de la cellulose (50 à 300 unités par molécule) (Gírio et al. (2010)).

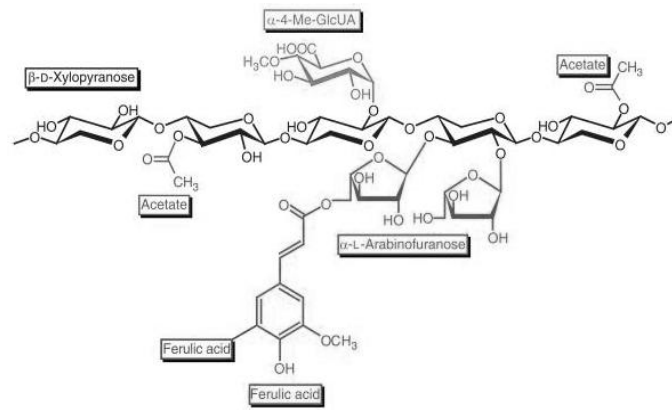


Figure I.3 : Structure générale d'hémicellulose montrant les différentes liaisons possibles (Dodd and Cann (2009))

I.2.A.3. La lignine

La lignine est le troisième polymère le plus abondant dans la nature. Il s'agit d'un hétéropolymère amorphe constitué d'unités monomériques phénoliques. On distingue trois précurseurs polyfonctionnels pour ces dernières : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Figure I.4). Ces trois unités conduisent respectivement à la formation d'unités p-hydroxyphényles (H), guaiacyles (G) et syringyles (S) (Colonna and Arrouays (2006)).

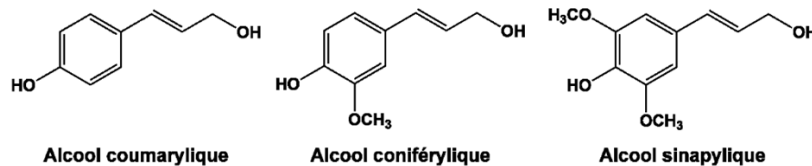


Figure I.4 : Précurseurs des unités monomériques phénoliques de la lignine

Ces monomères réagissent selon une réaction de polymérisation déshydrogénante afin de former une macromolécule tridimensionnelle contenant principalement des liaisons éther et des liaisons carbone-carbone (C-C) (Killops and Killops (2005)) (Figure I.5). La proportion de chaque monomère et la nature des liaisons intermoléculaires sont très variables, dépendent du tissu et de l'espèce végétale (Killops and Killops (2005)). Néanmoins, les liaisons de type β -O-4 entre le carbone β de la chaîne propényle et l'oxygène du phénol sont les plus courantes quelle que soit l'espèce végétale. Cependant, la composition de la lignine peut varier selon l'espèce. Ainsi, les gymnospermes⁴ possèdent principalement des unités guaiacyles (G) alors que les angiospermes dicotylédones⁵ contiennent à la fois des unités guaiacyles (G) et des unités syringyles (S). Les angiospermes monocotylédones, dont font partie les graminées, contiennent en plus des unités p-hydroxyphénoïques (Harwood (1997)).

⁴ Plante à graines, dont les ovules, puis les graines, sont portées sur des écailles plus ou moins ouvertes et non dans un fruit clos (les gymnospermes constituent un sous-branchement presque uniquement formé, de nos jours, par les conifères : pins, cyprès, genévriers, etc.)

⁵ Plante à graines dont l'ovule, fécondée par l'intermédiaire d'un tube pollinique, se transforme en un fruit clos. On distingue les monocotylédones des dicotylédones au nombre de cotylédons présents (feuille primordiale constitutive de la graine)

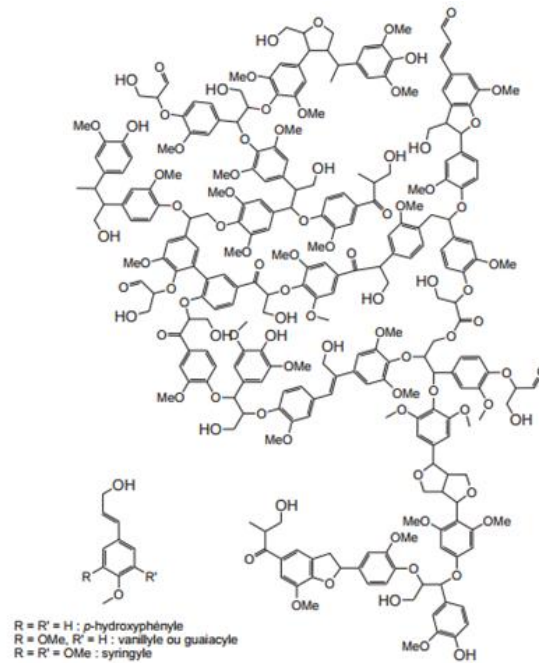


Figure I.5 : Structure supposée d'une lignine de hêtre (Killops and Killops (2005))

Dans la paille, la lignine est liée aux hémicelluloses grâce à l'acide férulique qui se fixe à la lignine par des liaisons covalentes de type éther et aux hémicelluloses par des liaisons de type ester. La lignine joue un rôle important dans l'imperméabilité cellulaire, la rigidité de la plante et constitue une barrière contre les micro-organismes et le stress oxydant.

Dans leur revue bibliographique (Tableau I.1), *Godin et al. (2010)* montrent clairement que la composition de la biomasse lignocellulosique varie fortement en fonction de l'espèce végétale, de l'âge et du tissu de la plante. Par exemple, les gymnospermes (Douglas, Epicéa) possèdent une quantité de lignine légèrement supérieure (26-28 %pds MS) aux angiospermes dicotylédones (Hêtre, Peuplier, Saule) (20-25 %pds MS). A l'inverse, les angiospermes monocotylédones (Pailles de graminées, Bagasse⁶, etc...) possèdent une quantité de lignine inférieure à 20 %pds MS. En ce qui concerne la cellulose, les gymnospermes et les angiospermes dicotylédones en possèdent davantage que les angiospermes monocotylédones, excepté pour le chanvre qui possède un taux de cellulose de 60 %pds MS. Enfin les hémicelluloses sont plus présentes chez les monocotylédones que chez les deux autres classes. En plus de varier en fonction de l'espèce végétale, la proportion de ces composés se différencie aussi en fonction de l'âge de la plante, de son environnement et aussi des zones morphologiques analysées (tiges, feuilles, etc. ...). La nature de la biomasse lignocellulosique est donc extrêmement variée et sa caractérisation revêt alors une importance toute particulière.

⁶Résidu des tiges de canne à sucre après extraction du jus

Tableau I.1 : Teneur en cellulose, hémicelluloses et lignine de diverses biomasses lignocellulosiques (Godin et al. (2010))

| Biomasse lignocellulosique | Nombre de valeurs* | Cellulose (kg·100 kg ⁻¹ MS) | Hémicelluloses (kg·100 kg ⁻¹ MS) | Lignine (kg·100 kg ⁻¹ MS) |
|---|--------------------|--|---|--------------------------------------|
| Bagasse de canne à sucre (<i>Saccharum officinarum</i> L.) (1) | 10 | 40,1 ± 6,7 | 26,3 ± 6,3 | 17,9 ± 6,8 |
| Fétuque (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.) (2) | 5 | 33,3 ± 2,7 | 30,4 ± 1,8 | 6,5 ± 2,2 |
| Maïs fibre (<i>Zea mays</i> L.) (3) | 6 | 38,0 ± 3,8 | 27,4 ± 1,2 | 7,3 ± 1,6 |
| Miscanthus (<i>Miscanthus</i> sp.) (4) | 4 | 44,0 ± 4,8 | 25,4 ± 2,2 | 20,4 ± 4,8 |
| Paille d'avoine (<i>Avena sativa</i> L.) (5) | 5 | 35,5 ± 4,6 | 24,3 ± 6,5 | 13,7 ± 4,0 |
| Paille de blé (<i>Triticum aestivum</i> L.) (6) | 27 | 36,6 ± 5,7 | 29,8 ± 7,7 | 16,9 ± 4,7 |
| Paille de maïs grain (<i>Zea mays</i> L.) (7) | 12 | 37,3 ± 5,1 | 25,4 ± 4,3 | 15,8 ± 3,6 |
| Paille d'orge (<i>Hordeum vulgare</i> L.) (8) | 17 | 40,4 ± 7,8 | 25,6 ± 5,1 | 12,7 ± 3,6 |
| Paille de riz (<i>Oryza sativa</i> L.) (9) | 32 | 35,3 ± 4,5 | 26,7 ± 4,9 | 9,8 ± 5,5 |
| Paille de seigle (<i>Secale cereale</i> L.) (10) | 3 | 37,0 ± 3,0 | 28,9 ± 1,0 | 12,7 ± 9,6 |
| Panic érigé (<i>Panicum virgatum</i> L.) (11) | 36 | 38,3 ± 3,8 | 31,2 ± 2,9 | 8,4 ± 3,9 |
| Ray-grass italien (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.) (12) | 4 | 23,1 ± 4,8 | 18,7 ± 6,3 | 4,3 ± 2,4 |
| Sorgho fibre (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) (13) | 7 | 42,3 ± 2,6 | 26,2 ± 0,6 | 8,0 ± 0,4 |
| Sorgho fourrager (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) (14) | 18 | 28,3 ± 4,6 | 22,8 ± 3,6 | 8,7 ± 3,9 |
| Chanvre (<i>Cannabis sativa</i> L.) (15) | 15 | 60,3 ± 6,2 | 16,8 ± 3,9 | 6,8 ± 3,4 |
| Kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i> L.) (16) | 6 | 53,2 ± 4,1 | 18,4 ± 1,4 | 7,9 ± 1,2 |
| Hêtre (<i>Fagus sylvatica</i> L.) (17) | 3 | 45,4 ± 1,9 | 27,9 ± 6,8 | 23,1 ± 1,3 |
| Peuplier (<i>Populus</i> sp.) (18) | 4 | 42,0 ± 2,9 | 22,0 ± 6,2 | 24,8 ± 3,8 |
| Saule (<i>Salix</i> sp.) (19) | 2 | 46,5 ± 13,5 | 18,5 ± 6,4 | 20,0 ± 1,4 |
| Douglas (<i>Pseudotsuga</i> sp.) (20) | 3 | 48,8 ± 7,6 | 21,1 ± 11,4 | 25,9 ± 2,2 |
| Épicéa (<i>Picea</i> sp.) (21) | 4 | 44,3 ± 4,2 | 26,1 ± 3,7 | 28,4 ± 0,7 |

I.2.A.4. Les composés mineurs

La biomasse lignocellulosique est composée principalement de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Ces trois composés représentent environ 90% en poids de la matière sèche végétale (Balat (2011)). En dehors de ces trois composés majeurs, la biomasse est aussi constituée de composés mineurs tels que les extractibles (tanins, terpènes, acides résiniques), les acides phénoliques, les minéraux, les protéines ou encore les sucres solubles.

Parmi les extractibles, on retrouve les tanins qui sont présents dans toutes les parties végétales. Ils possèdent une structure polyphénolique et sont classés en deux familles : les tanins hydrolysables dérivés de l'acide gallique et les tanins non hydrolysables qui sont des bases de phénol (Kpogbemabou (2011)). Les extractibles englobent également les terpènes qui sont des dérivés polymérisés de l'isoprène de formule brute C₅H₈. A titre d'exemple, les mono terpènes correspondent au pinène, au menthol et au limonène qui sont des essences odorantes. On trouve également le caoutchouc, la vitamine A ou encore le cholestérol comme molécules terpéniques (Kpogbemabou (2011)).

Les acides phénoliques sont des composés aromatiques comprenant un groupement carboxyl, une fonction phénol et une chaîne propyle insaturée. Leurs concentrations varient selon les organes de la plante, mais seront plus élevées dans les zones lignifiées. Comme vu ci-dessus, les acides phénoliques peuvent être liés à la lignine et aux hémicelluloses mais peuvent également se trouver sous forme libre dans la plante. A titre d'exemple, la paille de blé contient environ 1 %pds MS d'acides phénoliques, ces derniers étant principalement représentés par l'acide p-coumarique et l'acide férulique (Figure I.6).

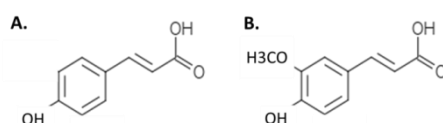


Figure I.6 : Principaux acides phénoliques de la paille de blé (A. acide p-coumarique, B. acide férulique)

Les composés inorganiques ou minéraux ont un rôle biologique important car ils interviennent dans la photosynthèse, la respiration ou encore la synthèse des protéines. On les retrouve principalement dans les feuilles. Le minéral principal est la silice mais on trouve également du potassium, du sodium, du manganèse, du phosphore et du soufre. Les minéraux représentent environ 1 à 5 %pds MS de la biomasse lignocellulosique (*De Jong and van Ommen (2015)*).

Les protéines présentes dans la biomasse lignocellulosique ne représentent, quant à elles, que 0.5 à 2 %pds MS. Il s'agit de protéines de structure et d'enzymes comme les peroxydases. Les protéines de structure sont principalement des glycoprotéines constituées d'une courte chaîne d'arabinogalactane fixée à des motifs d'hydroxyproline ou de sérine. Ces protéines peuvent être réticulées entre elles et enserrer les microfibrilles de cellulose, ce qui assure un soutien mécanique général au niveau de la paroi cellulaire.

On trouve également des sucres solubles sous forme monomérique. Dans la paille de blé, la quantité est d'environ 3 %pds MS dont les monomères majoritaires sont l'arabinose et le galactose.

Enfin, la biomasse lignocellulosique est composée à moins de 1 %pds MS, de pectine et de lipides pariétaux (*Zeitoun (2011)*).

I.2.B. Les étapes clés du procédé biologique de transformation de la lignocellulose en éthanol

La biomasse végétale est principalement composée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Dans le cadre de la conversion de la biomasse en éthanol, le prétraitement est toujours une étape indispensable. Il a pour objectif d'hydrolyser les hémicelluloses et/ou de solubiliser la lignine afin d'augmenter la réactivité de la cellulose à l'attaque enzymatique. Le procédé de production d'éthanol 2G se décompose donc en 4 étapes principales : le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique, la fermentation et la distillation (Figure I.7).

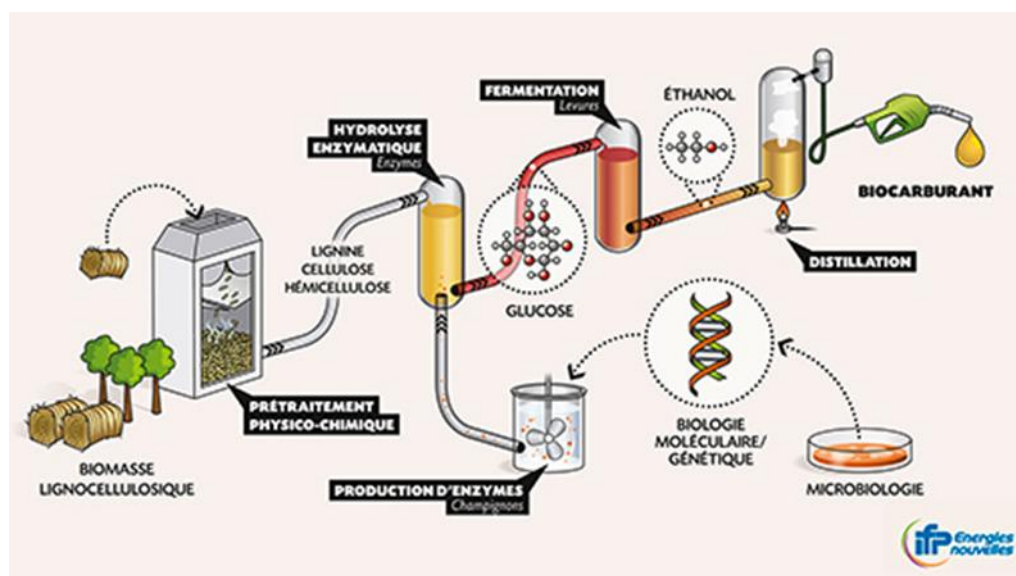


Figure I.7 : Schéma général de la production d'éthanol de 2^{ème} génération à partir de la biomasse lignocellulosique (Source IFP Energies Nouvelles)

I.2.B.1.Le prétraitement

Le but du prétraitement est de modifier la structure et la composition de la matrice lignocellulosique afin de rendre la cellulose plus accessible aux enzymes. D'une manière générale, le prétraitement peut avoir plusieurs effets comme l'augmentation de la surface accessible, la diminution de la cristallinité de la cellulose, la dépolymérisation partielle de la cellulose, la modification de la structure de la lignine ou encore la dépolymérisation et la solubilisation des hémicelluloses et/ou de la lignine. *Taherzadeh and Karimi (2008)* résumant parfaitement les caractéristiques d'un prétraitement idéal :

- Produire des fibres de cellulose réactives à l'attaque enzymatique
- Eviter la transformation de la cellulose et des hémicelluloses en produits de dégradation tels que le 5-HMF et le furfural
- Eviter la formation d'inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique et de la fermentation
- Réduire le coût en énergie (ex : broyage) et le coût des installations (ex : corrosion lors de l'utilisation d'acide, etc...)
- Consommer un minimum de produits chimiques, ces derniers devant avoir un faible coût
- Produire le moins possible d'effluents (notion de sélectivité vers les produits d'intérêt recherchés)

Pour atteindre ces objectifs, de nombreux prétraitements ont été mis au point et testés. Dans la littérature, quatre grandes classes de prétraitement coexistent : les prétraitements physiques, chimiques, physico-chimiques et biologiques (cf : I.2.C.1).

I.2.B.2.L'hydrolyse enzymatique

I.2.B.2.a.Production du cocktail enzymatique

Dans la nature, la biodégradation de la cellulose est aussi bien réalisée en aérobiose qu'en anaérobiose par des microorganismes cellulolytiques, tels que les champignons et les bactéries. Parmi les champignons cellulolytiques, *Trichoderma reesi* a été le plus étudié pour la production de cellulases à l'échelle industrielle. En effet, outre sa production importante de cellulases très actives, ce champignon produit également des hémicellulases, ce qui est un atout majeur pour la production de sucre provenant des hémicelluloses.

I.2.B.2.b.Mise en œuvre

L'étape d'hydrolyse enzymatique permet la transformation de la cellulose en glucose et s'effectue par simple contact du matériau lignocellulosique prétraité avec les enzymes. Cependant des conditions précises doivent être respectées pour optimiser le rendement en sucres fermentescibles, telles que le pH, la température et une agitation lente et régulière. Le rendement en sucres fermentescibles va également dépendre du ratio entre la quantité d'enzymes et la quantité de biomasse ainsi que du temps de réaction.

La dégradation de la cellulose est permise par l'action synergique de trois familles particulières d'enzymes. On distingue (Figure I.8 et Tableau I.2):

- Les endo-1,4- β -D-glucanases (EGs) (E.C.3.2.1.4) qui hydrolysent aléatoirement les liaisons β -1,4-glucosidiques internes de la zone amorphe de la cellulose, générant ainsi

des oligosaccharides de différentes longueurs et par conséquent de nouvelles extrémités réductrices et non réductrices. Ces enzymes facilitent l'action des cellobiohydrolases et sont responsables de la diminution du degré de polymérisation moyen de la cellulose. Elles représentent un peu moins de 20 %pds MS d'un cocktail enzymatique standard (Bayer et al. (1998)).

- Les exo-1,4- β -D-glucanases ou cellobiohydrolases (CBHs) (E.C.3.2.1.91) qui agissent de manière processive sur les extrémités des chaînes de glucose permettant ainsi la libération du cellobiose. Il en existe deux types : les CBHI qui agissent sur les extrémités réductrices et les CBHII qui agissent sur les extrémités non réductrices. Elles représentent environ 60 %pds MS du cocktail enzymatique standard (Ballerini and Alazard-Toux (2006)).
- Les β -glucosidases (BGs) (EC 3.2.1.21) hydrolysent les cellodextrines et les cellobioses en glucose (Jørgensen et al. (2007)).

Les EGs et les CBHs agissent directement sur le substrat solide après adsorption sur celui-ci tandis que les BGs agissent en phase liquide sur les cellobioses solubles.

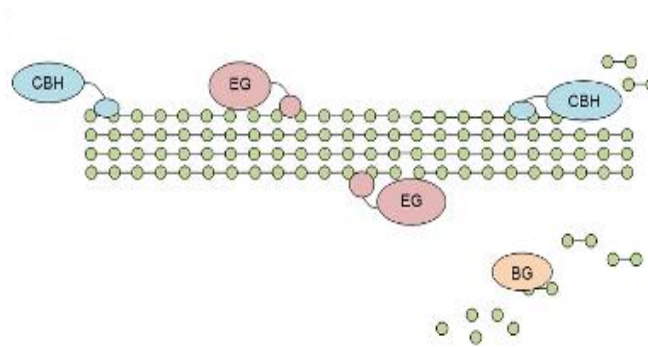


Figure I.8 : Représentation schématique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose (EG : endoglucanase ; CBH : Cellobiohydrolase ; BG : β -glucosidase) (Huron et al. (2016))

Tableau I.2 : Caractéristiques des enzymes présentes dans les cocktails enzymatiques pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique

| | Endoglucanases | Cellobiohydrolases | | β -glucosidase |
|-----------------------------|---|--|-----------------|----------------------|
| Abréviation | EG (I, II, III, IV, V) | CBH I | CBH II | BG |
| Structure | CB (site catalytique) + liaison peptidique + CBD (Cellulose Binding Domain) | | | CB |
| Adsorption | Faible | 40% réversible | 100% réversible | - |
| Mode d'action | Aléatoire sur les zones amorphes | Processive à partir des extrémités des chaînes | | Hydrolyse terminale |
| | | Réductrice | Non réductrice | |
| Produit libéré | Cellobiose + ouverture de chaînes | Cellobiose, glucose, cellotriose | | Glucose |
| Inhibiteur principal | Cellobiose | Cellobiose | | Glucose |

Actuellement un grand nombre de cocktails enzymatiques, comme Celluclast 1.5L, Cellic CTec2, Cellic CTec3 et GC220, sont disponibles dans le commerce et sont obtenus principalement à partir de *Trichoderma reesi*, d'*Aspergillus niger* et de *Bacillus subtilis*. Généralement les productions des deux dernières souches permettent de compléter le cocktail enzymatique de *Trichoderma reesi* en BGs car ce dernier est souvent limité en β -glucosidases.

I.2.B.3. La fermentation

Après l'hydrolyse de la cellulose en glucose, l'étape de fermentation permet de transformer les sucres fermentescibles en éthanol. On distingue deux types de fermentation, l'une par des levures et l'autre par des bactéries.

En fermentation par les levures, *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée en industrie. Cependant cette levure n'est pas capable de transformer les pentoses, notamment le xylose, en éthanol. D'autres levures telles que *Pichiastipitis* ou *Candida shehatae* peuvent le convertir mais leurs performances restent faibles. A l'heure actuelle, des études sont menées pour modifier le génome de *S. cerevisiae* soit par action recombinante, soit par pression sélective afin de la rendre capable de transformer le xylose en éthanol (Chu et al. (2007)). En 2012, par exemple, Aresta et al. (2012) ont réussi à produire une souche de *S. cerevisiae* recombinée qui permet la fermentation du xylose dans son intégralité.

En fermentation par les bactéries, la conversion des pentoses (sucres à 5 atomes de carbone : xylose, arabinose) en éthanol est possible grâce à certaines espèces bactériennes thermophiles (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) ou mésophiles (*Escherichia coli*).

I.2.B.4. Les différentes configurations

Différentes configurations peuvent être utilisées durant le processus de bioconversion de la biomasse lignocellulosique. En effet les étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation peuvent être réalisées soit en simultané, soit séparément. Comme le montrent *Danquah et al. (2011)*, on distingue principalement 3 types de configuration :

- L'hydrolyse et la fermentation séparées (*Separate Hydrolysis and Fermentation* = SHF) (Figure I.9 / A). Dans cette configuration, le substrat prétraité est séparé afin de récupérer la cellulose et la lignine d'un côté et un jus riche en sucres C_5 de l'autre, provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses. Le mélange cellulose + lignine est ensuite hydrolysé en glucose (C_6) dans une étape d'hydrolyse enzymatique, puis les sucres C_6 sont fermentés en éthanol dans un second réacteur. Le jus C_5 peut aussi être fermenté dans un troisième réacteur. Cette méthode permet de réaliser l'hydrolyse enzymatique et la fermentation, chacune dans leurs conditions optimales de température et de pH. De plus l'étape de fermentation est facilitée car la quantité de substrat solide après hydrolyse est diminuée. Cependant cette configuration possède deux inconvénients. Premièrement, les cellulases et les β -glucosidases sont fortement inhibées par l'accumulation de cellobiose et de glucose dans le réacteur. Deuxièmement, l'hydrolyse enzymatique peut subir à tout moment une contamination microbienne à cause de la concentration élevée en glucose car le matériel n'est généralement pas stérilisé pour des raisons de coût et de disponibilité.
- L'hydrolyse et la fermentation simultanées du glucose (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* = SSF) (Figure I.9 / B). Ici, l'hydrolyse et la fermentation du glucose se font simultanément, c'est-à-dire que le glucose libéré par l'hydrolyse enzymatique est rapidement converti en éthanol par des levures présentes dans le même réacteur. Cette configuration a été élaborée par Gauss en 1976 dans un brevet où les auteurs ont montré que le rendement en éthanol était maximisé par rapport au procédé SHF (*Gauss et al. (1976)*). Cette augmentation est permise par l'élimination rapide du glucose et du cellobiose qui sont des inhibiteurs de l'hydrolyse enzymatique. Ce procédé permet également d'utiliser une quantité inférieure d'enzymes par rapport à la SHF et d'éviter un risque de contamination grâce à la consommation rapide par les levures du glucose produit par les enzymes. Le principal inconvénient de cette technique est qu'un compromis doit être fait sur la température. En effet les optimums de température pour les enzymes et les levures sont différents. La température du réacteur de SSF est généralement autour de 32-38°C pour garantir la survie des levures. Elle est donc plus faible que la température idéale d'hydrolyse enzymatique qui est plus proche de 50°C. Cette baisse de température réduit la vitesse d'hydrolyse enzymatique qui est, tout ou en partie, compensée par l'absence de glucose inhibiteur.
- L'hydrolyse et la co-fermentation simultanées des sucres C_5 (xylose, arabinose) et C_6 (glucose, galactose, mannose) (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation* = SSCF) (Figure I.9 / C). La SSCF est une variante de la SSF dans laquelle l'hydrolyse enzymatique et la fermentation des sucres C_5 et C_6 se font dans un même réacteur. Ce procédé se fait soit en mono soit en co-culture de microorganismes, c'est pourquoi la levure *S. cerevisiae* recombinée est majoritairement utilisée dans cette configuration car elle permet la fermentation des C_5 et des C_6 en simultané (cf. § I.2.C.1.d). Ce procédé possède les mêmes avantages et inconvénients que la SSF.

Pour cette configuration également, un compromis doit être trouvé sur la température (Danquah et al. (2011)).

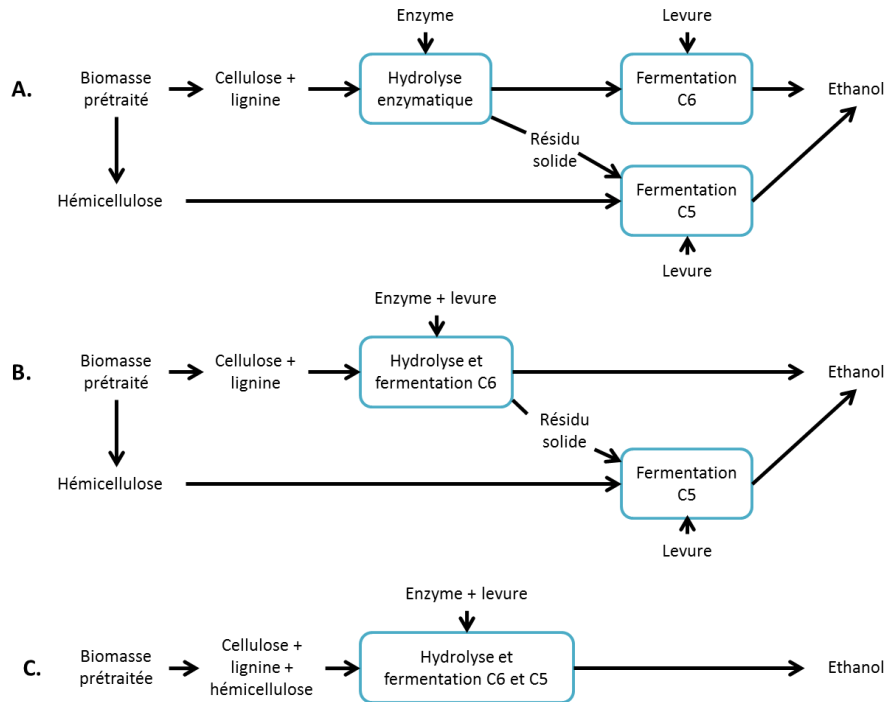


Figure 1.9 : Schéma des différentes configurations possibles de la biomasse lignocellulosique prétraitée pour la production d'éthanol (A. Configuration SHF ; B/ Configuration SSF ; C/ Configuration SSCF) (Aresta et al. (2012))

Pour l'ensemble des configurations, il existe un inconvénient global. En effet, les levures et les enzymes ne peuvent pas être réutilisées car il est difficile de les séparer du mélange réactionnel du fait de leur adsorption sur le substrat. Enfin, il est quasiment impossible de travailler à haute concentration en matière sèche car cela occasionne des difficultés de mélange et de transfert de matière et de chaleur.

I.2.B.5. La distillation

La distillation est la technique la plus couramment utilisée pour séparer et purifier les composés d'un mélange. Elle repose sur l'évaporation partielle d'un composé suivie de la condensation des vapeurs obtenues pour retrouver le composé purifié, ici l'éthanol, sous forme liquide. Le procédé utilise donc la différence de volatilité entre les constituants afin de les séparer. Il faut remarquer que le distillat obtenu n'est pas un produit pur, l'opération de vaporisation-condensation doit donc être répétée afin de concentrer davantage le produit volatil. Pour ne pas répéter cette étape, une distillation fractionnée (ou par rectification) peut être envisagée.

I.2.C. Focus sur les différents types de prétraitement et leurs impacts sur les caractéristiques physico-chimiques de la biomasse

Comme il a été détaillé précédemment, la biomasse lignocellulosique est naturellement récalcitrante aux attaques microbiennes et enzymatiques. Par conséquent, différents types de prétraitement (physique, chimique, physico-chimique ou biologique) ont été développés ces dernières décennies afin d'améliorer l'attaque de cette matrice par les enzymes. L'efficacité de chaque

prétraitement a ensuite pu être évaluée à l'aide de différentes méthodologies analytiques. Ces analyses ont alors indiquées des altérations différentes en fonction du prétraitement choisi en termes de composition chimique, de cristallinité, de taille des pores, de propriétés de surfaces, d'adsorption/désorption des enzymes ou encore de degré de polymérisation.

I.2.C.1. Les différentes classes de prétraitement

I.2.C.1.a. Le prétraitement physique

D'une manière générale, les prétraitements physiques permettent principalement de réduire la taille des particules d'un substrat et sont souvent la première étape avant de procéder à une autre forme de prétraitement. En effet, même si quelques études ont été menées sur l'optimisation et l'impact de différents types de broyeurs sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique, le coût énergétique de ces procédés est bien supérieur aux autres prétraitements décrits ci-dessous (*Barakat et al. (2013)*).

I.2.C.1.b. Le prétraitement chimique

Les prétraitements chimiques induisent des transformations de la matrice lignocellulosique via un agent chimique afin de rendre la biomasse moins récalcitrante à l'hydrolyse enzymatique. Ces procédés font intervenir soit des acides, soit des bases, soit des solvants ou des liquides ioniques à des températures moyennes (100 à 220°C).

Dans le cas du prétraitement à l'acide dilué, les hémicelluloses sont hydrolysées en monomères qui peuvent par la suite se transformer en produits de dégradation si les conditions s'avèrent trop sévères. Pour des températures douces, l'indice de cristallinité moyen de la biomasse tend aussi à augmenter à cause de l'élimination des hémicelluloses alors que pour des températures supérieures à 190°C, cet indice diminue suite à l'hydrolyse partielle de la cellulose (*Thompson et al. (1992)*). Pour des températures supérieures à 130°C, on assiste également à la redistribution de la lignine au sein des parois cellulaires (*Selig et al. (2007)*). En effet la lignine se liquéfie et, de par sa nature hydrophobe, migre au sein de la matrice cellulaire. Durant la phase de descente en température, la lignine se resolidifie à la surface ou entre deux parois sous formes de gouttelettes de tailles comprises entre 100 nm et quelques microns (*Kristensen et al. (2007)* ; *Selig et al. (2007)* ; *Donohoe et al. (2008)* ; *Sannigrahi et al. (2011)*).

Durant un prétraitement alcalin, la biomasse est mise en contact durant 30 à 60 minutes pour une température comprise entre 80 et 120°C avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH), d'hydroxyde de potassium (KOH), de chaux ou d'ammoniac (*Feldman (1985)*). Les bases permettent la rupture des liaisons esters entre les hémicelluloses et la lignine. Cette saponification permet de retirer la lignine et donc d'augmenter l'accessibilité de la cellulose. Avec ce type de prétraitement, il est souvent observé une baisse du degré de polymérisation et de la cristallinité de la cellulose ainsi qu'une augmentation de la surface accessible.

Pour les prétraitements organosolv, la biomasse est mise en contact avec un solvant organique (éthanol, méthanol, acétone, éthylène glycol et acides organiques) ou des mélanges solvants organiques/eau à 100-200°C. L'ajout d'un catalyseur acide permet de diminuer la température et/ou le temps de séjour. Ici la lignine et les hémicelluloses sont quasiment totalement dégradées, ce qui permet d'augmenter la surface accessible de la cellulose. En effet, les solvants organiques permettent l'hydrolyse des liaisons internes de la lignine ainsi que des liaisons lignine-hémicelluloses (*Zhang et al. (2016)*).

Certains prétraitements chimiques utilisent aussi des liquides ioniques (*Elgharbawy et al. (2016)*). La biomasse est alors mise en présence de ces liquides particuliers à pression ambiante et à des températures de 90 à 130°C avant d'opérer une précipitation à l'eau. Ce prétraitement n'altère pas la structure de la lignine et des hémicelluloses mais il permet de séparer la cellulose de la lignine car cette dernière est très soluble dans les liquides ioniques. L'accessibilité de la cellulose aux enzymes en est ainsi améliorée. Cependant le rendement et le coût du recyclage ne permettent pas une exploitation industrielle à l'heure d'aujourd'hui. Enfin, l'élimination du solvant par un nettoyage abondant de la biomasse prétraitée est indispensable avant son utilisation car les enzymes sont inactives dans ce type de solvant (*Badie et al. (2014)*).

1.2.C.1.c. Le prétraitement physico-chimique

Le prétraitement par explosion vapeur est l'un des principaux prétraitements physico-chimiques connus dans sa catégorie. Ce prétraitement élimine la majeure partie des hémicelluloses, ce qui améliore la réactivité enzymatique (*Mamers and Menz (1984)* ; *Excoffier et al. (1991)*). Pour ce prétraitement, la température est fixée entre 160 et 260°C pour une durée allant de quelques secondes à quelques minutes (30 sec à 20 min). Ensuite, la pression est brutalement réduite, ce qui soumet le substrat à une détente explosive. Au niveau économique, son coût est relativement modéré.

Le prétraitement par explosion à la vapeur peut aussi se faire en ajoutant un composé chimique comme le dioxyde de soufre (SO₂) ou l'acide sulfurique (H₂SO₄). L'ajout d'un acide permet en effet d'hydrolyser davantage la cellulose et les hémicelluloses tout en diminuant les conditions opératoires (< à 230°C et ≈ 10 min) (*Tengborg et al. (1998)*).

Ce prétraitement peut aussi être réalisé avec des bases, comme le prétraitement à l'ammoniac (AFEX). Dans ce cas, la biomasse est mise en contact avec de l'ammoniac liquide à des températures de 90–100°C pendant une période de 30 min environ. Le substrat subit ensuite une dépressurisation rapide. L'AFEX permet de modifier et/ou de réduire efficacement la proportion de lignine tandis que les hémicelluloses et la cellulose peuvent rester intactes. L'un des principaux avantages de ce prétraitement est qu'il induit peu d'inhibiteurs. Cependant ce prétraitement ne permet pas de s'affranchir de la lignine et le recyclage de l'ammoniac impliquerait des coûts industriels élevés (*Krishnan et al. (2010)*).

L'explosion au dioxyde de carbone supercritique est également une variante du prétraitement d'explosion à la vapeur. Dans ce cas, le solvant est non toxique et non inflammable. De plus, la séparation du CO₂ après prétraitement est aisée. Un prétraitement au CO₂ couplé à l'hydrolyse enzymatique a ainsi été testé par *Park et al. (2001)* et permet, d'après eux, un rendement de 100 % du glucose. Malgré ces avantages, l'industrialisation de ce prétraitement serait extrêmement coûteuse.

Le prétraitement à l'eau chaude est aussi connu depuis des décennies dans l'industrie papetière. Pour ce prétraitement, l'eau chaude sous haute pression pénètre la biomasse et permet d'hydrolyser les hémicelluloses et une partie de la lignine. Les principaux avantages de ce prétraitement est de ne pas requérir l'ajout de produits chimiques ni l'utilisation de matériaux anticorrosion. En effet, durant le prétraitement, les groupements acétyles portés par les hémicelluloses s'hydrolysent en acide acétique ce qui acidifie le milieu et conduit à des phénomènes d'auto-hydrolyse. De plus la surface accessible aux enzymes est augmentée. Cependant ce prétraitement demande un coût énergétique élevé pour sa mise en œuvre (haute température et pression) et les rendements en sucres fermentescibles restent relativement bas (*Bhutto et al. (2017)*).

1.2.C.1.d.Le prétraitement biologique

Les prétraitements biologiques de la biomasse lignocellulosique utilisent le potentiel ligninolytique de certains microorganismes, fongiques ou bactériens, pour réduire la récalcitrance du substrat et améliorer sa digestibilité par les enzymes hydrolytiques.

Les microorganismes, comme les moisissures blanches (*Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*) et rouges (*Myrothecium roridum*) produisent des systèmes enzymatiques ligninolytiques (oxydoréductases à fort potentiel redox) ce qui permet de dégrader la lignine et les hémicelluloses (Wan and Li (2012) ; Tiwari et al (2013)). Même si ce prétraitement est respectueux de l'environnement et qu'il est peu coûteux, le temps de prétraitement est extrêmement long et peut vite devenir rédhibitoire.

1.2.C.1.e.Conclusion sur les familles de prétraitement

Comme nous l'avons vu ci-dessus, il existe une large gamme de prétraitements possibles de la biomasse lignocellulosique pour la production de biocarburant ou de biogaz (Tableau I.3). Toutes ces méthodes permettent d'augmenter, avec plus ou moins d'efficacité, la réactivité de la biomasse à l'action enzymatique en modifiant l'indice de cristallinité, en augmentant la surface spécifique, en éliminant la lignine ou en hydrolysant les hémicelluloses. Bien que les procédés comme le prétraitement à l'acide dilué, l'AFEX, l'explosion vapeur ou le traitement à l'eau chaude aient un fort potentiel économique, il faut également considérer qu'il existe des prétraitements plus écologiques mais aussi nettement plus longs. Il est aussi très important de prendre en compte d'autres facteurs technologiques (le coût énergétique, le recyclage des solvants, la corrosion, etc...) et environnementaux (traitement des eaux usées notamment) afin de choisir soigneusement la méthode la plus adaptée.

Tableau I.3 : Récapitulatif des différents types de prétraitement de la biomasse lignocellulosique

| Type | Nom | Conditions | Avantages | Inconvénients |
|------------------|---------------------------|---|---|--|
| Physique | Broyage | Température ambiante ; énergie < 30 kW/t | Diminution du degré de polymérisation et de la cristallinité | Forte consommation d'énergie |
| | Explosion vapeur | 160-260°C durant 5-15min | Auto-hydrolyse des hémicelluloses ; transformation de la structure de la lignine ; meilleure efficacité pour les feuillus et les résidus agricoles | Rupture incomplète des complexes lignine-hydrates de carbone ; risque de formation d'inhibiteurs |
| Physico-chimique | AFEX | 90°C pendant 30 min ; 0.5 kg de NH ₃ /kg de biomasse | Augmentation de la surface accessible ; diminution de la cristallinité ; élimination de la lignine et hydrolyse des hémicelluloses ; absence de formation d'inhibiteurs | Mauvaise efficacité pour des substrats riches en lignine |
| | Explosion CO ₂ | 50°C pendant 90 min à 160 C ; 4kg de CO ₂ supercritique/kg de biomasse | Absence de formation d'inhibiteurs ; augmentation de la surface accessible | Mauvaise efficacité pour les substrats enrichis en lignine ; Absence de modification de la lignine et des hémicelluloses |
| | Ozonolyse | Température ambiante | Réduction de la teneur en lignine ; absence de production de résidus toxiques | Coûteux |
| | Oxydation humide | 148-200°C durant 30 min | Elimination efficace de la lignine ; faible formation d'inhibiteurs ; processus rapide | Coûteux |

| Type | Nom | Conditions | Avantages | Inconvénients |
|-------------------|-------------------------------|---|---|---|
| Chimique | Prétraitement à l'acide dilué | Basse teneur en solide (5-10%) en flux continu et haute température (>160°C) Haute teneur en solide (10-40%) en batch à basse température (<160°C) | Hydrolyse des hémicelluloses ; altération de la lignine ; augmentation de la porosité | Formation d'inhibiteurs ; équipement anti-corrosion indispensable, nécessité de recycler les effluents |
| | Prétraitement alcalin | Température basse ; imprégnation lente | Elimination de la lignine et dégradation des hémicelluloses ; augmentation de la surface accessible | Hydrolyse lente ; formation irréversible de sels résiduels dans la biomasse (sels de calcium et de magnésium) |
| | Prétraitement à l'ammoniac | Haute température | Elimination de la lignine ; baisse de la cristallinité | Recyclage de l'ammoniac après le prétraitement ; coûteux |
| | Organosolv | 150 à 200°C avec ou sans catalyseur | Hydrolyse des hémicelluloses ; obtention de lignine pure à forte valeur ajoutée | Coûteux (solvant et récupération); inhibition de l'hydrolyse enzymatique par les solvants |
| Biologique | - | Plusieurs champignons disponibles | Dégradation de la lignine et hydrolyse des hémicelluloses ; peu coûteux ; écologique | Hydrolyse lente ; une partie des sucres sont utilisés comme source de carbone. |

I.2.C.2.Principales caractéristiques physico-chimique de la biomasse impactées par le prétraitement

En 2008, *Sluiter et al. (2008)* ont proposé une méthodologie analytique pour déterminer la composition chimique des substrats lignocellulosiques qui actuellement fait consensus dans le domaine. Cette méthodologie consiste à une hydrolyse acide en deux étapes où le substrat est mis en contact d'acide sulfurique à 72 %pds durant 1 h à 30°C sous agitation puis le mélange est dilué pour atteindre une concentration finale en acide de 4 %pds. Les échantillons sont ensuite chauffés à 121°C durant 1 h. L'analyse de la fraction liquide permet par chromatographie liquide de connaître la concentration en chaque sucre sous leurs formes monomériques. Cette méthodologie a été utilisée et réadaptée dans le cadre de ces travaux (cf. II.4.A.1).

A l'inverse, pour décrire la cristallinité, la taille des pores, les propriétés de surface, l'adsorption/désorption des enzymes ou encore le degré de polymérisation, plusieurs techniques analytiques sont possibles avec leurs avantages et leurs inconvénients.

I.2.C.2.a.La surface spécifique

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est permise grâce l'adsorption de protéines particulières, les cellulases, sur le substrat. Plus la surface d'adsorption des cellulases est importante, meilleur est le rendement de l'hydrolyse enzymatique. Cette surface disponible aux enzymes est appelée « surface accessible » et est dépendante de la taille des enzymes, de la taille des particules de biomasse et de leur volume poreux. Une augmentation du volume des pores et une diminution de la taille des particules permettent en général d'augmenter la surface accessible globale.

En 1968, *Stone and Scallan (1968)* mettent en place une technique d'exclusion stérique afin de déterminer le volume poreux d'un substrat. Dans cette technique, le substrat est imprégné longuement afin qu'il « gonfle » puis est mis en contact avec des solutions contenant des molécules (sondes) de concentration et de taille connues. Ces molécules (dextranes⁷ de différentes tailles) se comportent comme des sphères hydrodynamiques en solution. Quand une solution de dextrane est mélangée au substrat, sa concentration diminue car une partie des molécules pénètre dans les pores accessibles.

En dehors de cette technique, il est possible de trouver plusieurs autres méthodes. Tout d'abord il existe la mesure directe de la quantité de cellulase adsorbée sur la surface mais, dans ce cas, la lignine et les hémicelluloses peuvent interférer avec l'adsorption des cellulases (*Lee et al. (1982)*). Ensuite, la méthode de Brunauer-Emmett-Teller (BET) (*Brunauer et al. (1938)*), très utilisée pour caractériser des supports minéraux poreux comme les catalyseurs, permet de mesurer la surface disponible par physisorption d'azote, mais la différence de taille entre cette dernière et les enzymes conduit à une limitation de la méthode. De plus, pour cette technique, le substrat doit être séché, ce qui va diminuer la surface accessible réelle causée par la rétractation de la biomasse. La résonance nucléaire magnétique (RMN) est aussi de plus en plus envisagée et expérimentée. Enfin une nouvelle approche permet de mesurer l'accessibilité de la cellulose aux enzymes grâce à une protéine de fusion

⁷ Polymère ramifié de glucose de masse moléculaire élevé appartenant au groupe des colloïdes

possédant le site CBM⁸ couplée à une protéine fluorescente (*Ballerini and Alazard-Toux (2006); Hong et al. (2007)*).

Beaucoup de techniques d'analyses sont donc disponibles afin de caractériser la biomasse en termes de surface spécifique et de volume poreux. Cependant chacune de ces approches souffrent de biais systémique et il n'existe pas actuellement d'approche analytique satisfaisante pour mesurer de manière fiable et précise l'accessibilité de la cellulose aux enzymes dans une biomasse.

1.2.C.2.b.L'indice de cristallinité

Comme vu précédemment, la cellulose possède une phase cristalline et une phase amorphe. Dans les zones cristallines et amorphes, les microfibrilles de cellulose s'assemblent entre elles par des liaisons hydrogène. La proportion de ces liaisons est plus importante dans les zones cristallines ce qui rendrait la cellulose cristalline moins réactive aux enzymes (*Mazza (2009)*).

Actuellement plusieurs techniques analytiques sont disponibles afin de déterminer l'indice de cristallinité de la cellulose. Cependant il n'existe toujours pas, à ce jour, de méthode normalisée qui permettent de mesurer cette propriété sans ambiguïté comme le montre *Sathitsuksano et al. (2011)* dans leur article.

La technique la plus fréquemment utilisée pour mesurer la cristallinité de la cellulose est la diffraction par rayon X (DRX). Cet indice (IC_{DRX}) est déterminé par l'équation suivante (*Segal et al. (1959)*) :

$$\text{Equation I.2 : } IC_{DRX} (\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100$$

avec : I_{002} : l'intensité du pic à $2\theta \approx 22.5^\circ$

I_{am} : l'intensité de diffusion de la région amorphe à $2\theta \approx 18.7^\circ$

Cet indice mesure la fraction relative de la cellulose cristalline au sein du substrat dans sa globalité. En conséquence, si la lignine et les hémicelluloses sont hydrolysées, cet indice va augmenter. Son utilisation peut donc permettre une étude comparative entre les différentes conditions opératoires d'un prétraitement.

L'indice de cristallinité peut également être déterminé par résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette technique permet, à l'inverse de la DRX, d'obtenir l'indice de cristallinité de la cellulose cristalline par rapport à la cellulose totale (*Zuckerstätter et al (2009)*). L'indice de cristallinité, déterminé à partir de la RMN (IC_{RMN}), est défini par :

$$\text{Equation I.3 : } IC_{RMN} (\%) = \frac{I_{89\text{ppm}}}{I_{89\text{ppm}} + I_{84\text{ppm}}} \times 100$$

avec : $I_{89\text{ppm}}$: l'intensité du pic à 89 ppm qui correspond à la part cristalline de la cellulose

$I_{84\text{ppm}}$: l'intensité du pic à 84 ppm qui correspond à la part amorphe de la cellulose

⁸ Domaine structurel et fonctionnel d'une enzyme qui facilite l'hydrolyse de la cellulose en assurant l'ancrage du site catalytique sur le substrat

1.2.C.2.c. Les autres facteurs

Actuellement d'autres facteurs physico-chimiques de la biomasse lignocellulosique, telles que la taille des particules, l'adsorption/désorption des enzymes, le degré de polymérisation ou encore la structure et le taux de lignines sont disponibles dans la littérature et sont impactés par les prétraitements. Ces paramètres pourraient donc être en lien avec la réactivité à l'hydrolyse enzymatique.

Par exemple, la taille de particule peut être étudiée par granulométrie laser. Cependant cette analyse s'appuie sur une hypothèse forte qui considère les particules comme sphériques or les substrats lignocellulosiques sont hétérogènes et d'avantage fibreux. De plus cette technique est adaptée pour des particules inférieures au millimètre ce qui limite son utilisation. Des analyses par macro-microscopie est également possible grâce à l'acquisition et le traitement d'image afin de déterminer la distribution en taille des particules, cependant ce type d'analyse est extrêmement longue.

Pour conclure, il existe rarement de méthodes analytiques normalisées qui permettent de mesurer l'ensemble de ces propriétés sans ambiguïté. Ces propriétés sont donc spécifiques pour une étude donnée.

I.3.La cuisson acide : prétraitement à l'acide dilué

Dans le cadre de la présente thèse, un des objectifs est de comprendre l'impact d'un prétraitement par explosion à la vapeur sur la composition et la morphologie de substrats lignocellulosiques et donc sur leurs réactivités à l'hydrolyse enzymatique. Théoriquement, le prétraitement par explosion à la vapeur peut se découpler en deux étapes distinctes, la phase de cuisson et la phase d'explosion, c'est pourquoi cette partie s'intéresse plus spécifiquement à l'étape de cuisson en présence d'un acide (communément appelé prétraitement à l'acide dilué).

Dans cette partie, l'influence des conditions opératoires du prétraitement à l'acide dilué sera étudiée sur le rendement en sucres monomériques et produits de dégradation après prétraitement et après hydrolyse enzymatique. L'influence du catalyseur ainsi que de la taille des particules avant prétraitement seront aussi explorées. Enfin, l'évolution de la surface spécifique et de l'indice de cristallinité après prétraitement à l'acide dilué et leurs relations avec la réactivité de substrats à l'hydrolyse enzymatique seront également approfondies.

I.3.A.Généralités sur le procédé

Le prétraitement à l'acide dilué de la biomasse lignocellulosique se fait traditionnellement par chauffage en présence d'un acide, préférentiellement l'acide sulfurique (H_2SO_4) avec une concentration allant jusqu'à 3 %pds dans la liqueur d'imprégnation. La température et le temps de séjour peuvent évoluer dans une gamme assez large en fonction du mode opératoire du procédé. Pour des températures élevées ($> 200^\circ C$) (Cara *et al.* (2008) ; Zhang *et al.* (2015)), les temps de séjour sont généralement courts (de quelques secondes à quelques minutes) et, pour des températures plus douces, les temps de séjour sont plus longs (plusieurs dizaines de minutes) (Aguilar *et al.* (2002) ; Roberto *et al.* (2003)).

La cuisson acide est connue pour faciliter l'hydrolyse des hémicelluloses, ce qui va conduire à une libération des chaînes de cellulose et, par conséquent, à une augmentation de la surface accessible aux enzymes. En revanche, l'indice de cristallinité de la cellulose serait très peu impacté (Thompson *et al.* (1992) ; Guo *et al.* (2008)). L'hydrolyse des hémicelluloses va entraîner la production de sucres monomériques qui seront solubles dans l'hydrolysats. Cependant, ces sucres sont très instables et peuvent se transformer, pour des conditions opératoires sévères, en produits de dégradation, ce qui diminuera le rendement en sucres du procédé (Behera *et al.* (2014)). De plus, ces produits de dégradation sont connus pour être des inhibiteurs de la fermentation alcoolique. Le rendement global du procédé sera donc aussi impacté à ce niveau (Mahesh *et al.* (2017)).

Plus précisément (Figure I.10), durant une cuisson acide, les sucres C_6 (glucose, galactose, mannose) peuvent être dégradés par déshydratation en 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde (5-HMF), lui-même se décomposant en acide formique et en acide lévulinique si les conditions de prétraitement sont particulièrement sévères. Les sucres C_5 (xylose ou arabinose), issus de la dépolymérisation des hémicelluloses, se dégradent quant à eux en furfural et lui-même pourra se dégrader en acide formique. De plus, les groupements acétyles présents dans les hémicelluloses sont aussi potentiellement hydrolysables, ce qui conduit à la formation d'acide acétique. Enfin, il est admis que la dégradation de la lignine peut conduire à la production de composés phénoliques (Jo Eun and Jae-Won (2018)). Il a également été prouvé que ces composés pouvaient également provenir de la décomposition des glucides (Rasmussen *et al.* (2014) ; Jonsson and Martin (2016)).

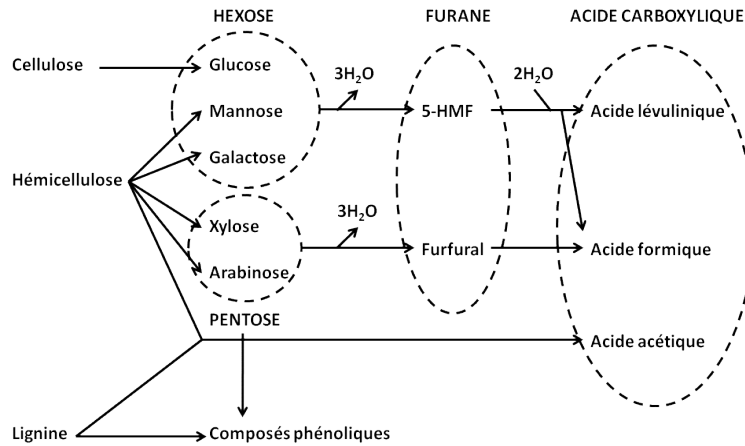


Figure I.10 : Dégradation des constituants de la biomasse lignocellulosique

Pour un prétraitement de très forte sévérité, l'ensemble des composés de dégradation cité ci-dessus peuvent encore former de nouveaux composés dits de recondensation, et les termes « pseudo-lignine » ou « humines » sont alors utilisés afin de les désigner. Les humines (ou pseudo-lignine) forment une substance noire et sont insolubles dans l'eau et en solution acide (Stevenson (1994)). Elles seraient principalement composées de structures carbonyles, carboxyliques et aromatiques (Nguyen et al. (2000) ; Negro et al. (2003) ; Donohoe et al. (2008) ; Hu et al. (2012a)) (Figure I.11) et formées grâce à la combinaison d'hydrates de carbone, de produits de dégradation et de lignine (Li et al. (2007a) ; Sannigrahi et al. (2011)). En effet, il a été démontré que la formation d'humines est possible par la réaction entre le glucose et le 5-HMF et/ou entre le 5-HMF et le HMF réhydraté (Schlöggl (2013)). Afin de mieux comprendre l'origine, la formation et l'impact de ces composés de dégradation ultimes, une étude bibliographique spécifique est disponible en partie § I.5 de ce chapitre.

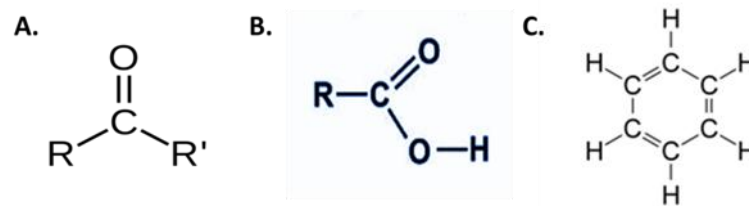


Figure I.11 : Structures chimiques principales détectées dans la pseudo-lignine (A. carbonyle, B. carboxyle, C. aromatique)

I.3.B. Influence des conditions opératoires

Comme il a été vu précédemment, la température, le temps de séjour et la teneur en acide dans le milieu réactionnel sont les trois paramètres principaux qui vont influencer le rendement en sucres dans le jus de cuisson ainsi que la composition chimique et la réactivité des substrats prétraités. Dans cette partie, l'influence de ces conditions opératoires de prétraitement sur les rendements en sucres après prétraitement et après prétraitement + hydrolyse enzymatique sera détaillée. De plus l'influence de la nature de l'acide utilisé ainsi que de la granulométrie initiale du substrat seront présentés.

I.3.B.1.Facteur de sévérité

Afin de pouvoir comparer différentes conditions opératoires entre elles, un facteur de sévérité (F_0) a été rapidement proposé dans la littérature. La première définition du facteur de sévérité (F_0) a été proposée par *Overend and Chornet (1987)* en 1987. Ce facteur prend en compte la température et le temps de séjour, ce qui permet de comparer différents traitements hydrothermaux entre eux. Ce facteur de sévérité F_0 est défini comme suit :

$$\text{Equation I.4 : } F_0 = t \cdot e^{\frac{T-T_{ref}}{14.75}}$$

avec : T : température appliquée durant le prétraitement (°C)

T_{ref} : température de référence (se situant habituellement au milieu de la plage des conditions expérimentales ou comme température de base où peu de réactions désirées se produisent)

t : temps de séjour (min)

14.75 : constante arbitraire basée sur l'énergie d'activation d'une équation cinétique d'ordre 1

Ce facteur initialement utilisé pour la production de pâte à papier a été réadapté pour les prétraitements chimiques, acides ou basiques, de la biomasse ainsi que pour le traitement par explosion à la vapeur. Dans un premier temps, *Chum et al. (1990)* ont décidé d'intégrer la concentration en catalyseur dans l'équation mais il a été vite reconnu que les acides ou les bases faibles ou fortes agissent différemment selon leur nature. C'est pourquoi, *Abatzoglou et al. (1992)* ont mis en place une nouvelle équation qui prenait en compte la concentration finale en ions H^+ à la fin du prétraitement provenant de l'excès d'acide introduit ainsi que de la dégradation de la biomasse. Ensuite *Jacquet et al. (2012)* ont proposé de prendre en compte la montée et la descente en température dans le cas où un profil de température non constant était opéré (cas des cuissons en réacteur batch par exemple). Et récemment, *Dong et al. (2017)* suggèrent d'introduire, en plus de la concentration en acide, la concentration en solvant.

Pour conclure sur ce facteur de sévérité F_0 , *Pedersen and Meyer (2010)* montrent dans une étude qu'il est impossible de prédire correctement les rendements de cuisson et d'hydrolyse de la cellulose à partir du simple facteur de sévérité car les auteurs utilisent différentes équations pour le facteur de sévérité et différentes méthodologies expérimentales pour l'hydrolyse enzymatique. De plus, l'utilisation d'une constante d'activation de 14.75 est limitée car elle ne peut pas correspondre à l'ensemble des substrats prétraités. Cependant, pour une même étude utilisant une même formule de facteur de sévérité et un même test standard d'hydrolyse enzymatique, la mise en place d'un facteur de sévérité peut permettre de discriminer les différentes conditions opératoires entre elles.

I.3.B.2.Influence des conditions opératoires de prétraitement sur le substrat

L'impact de la variation des conditions opératoires (température, temps de séjours, concentration en acide de la liqueur d'imprégnation) a été largement étudié dans la littérature afin d'optimiser le rendement en sucres monomériques, soit après le prétraitement, soit après le prétraitement + hydrolyse enzymatique.

1.3.B.2.a. Modification chimique du substrat

Cas des hémicelluloses et de la cellulose

L'étude de *Saha et al. (2005)* montre explicitement l'impact des conditions opératoires sur le rendement en sucres monomériques après prétraitement d'une paille de blé (broyée à 1.3 mm). En effet, ils étudient dans un premier temps la variation de la charge en acide (0 à 1 %pds d' H_2SO_4) pour un prétraitement à 121°C et 60 min. Dans ce cas, le meilleur rendement en sucres totaux se fait à 0.75 %pds d' H_2SO_4 , avec une production de 485 ± 22 mg de sucres totaux par gramme de matière sèche (MS) (= optimum n°1). Ensuite, les auteurs font varier la température (140, 160 et 180°C) et la charge en acide (0, 0.25 et 0.50% pds d' H_2SO_4) pour un temps de séjour de 15 min, ils constatent alors une conversion des polymères en sucres fermentescibles de 576 mg.g MS^{-1} (= optimum n°2) pour des conditions de prétraitement de 180°C, 15 min et 0.5% pds d' H_2SO_4 . Enfin, ils font varier le temps de séjour (15, 30 et 60 min) à 140°C avec une charge en acide de 0.5% pds. Ils constatent alors que le meilleur rendement en sucres totaux se fait à 30 min ($552 \pm 11 \text{ mg.g MS}^{-1}$ = optimum n°3). Pour cette étude, les auteurs concluent que les conditions optimales de prétraitement sont 140°C, 30 min et 0.5% pds d' H_2SO_4 (=optimum n°3). En effet, malgré un rendement légèrement supérieur à 180°C, 15 min et 0.5 %pds d' H_2SO_4 (optimum n°2), les conditions moins drastiques de l'optimum 3 permettent de ne pas produire de produits de dégradation tels que le furfural et le 5-HMF qui sont des inhibiteurs de la fermentation alcoolique.

L'étude décrite précédemment est représentative de la plupart des études disponibles dans la littérature à l'exception de celles de certains auteurs qui utilisent une approche quadratique (*Roberto et al. (2003)* ; *Cao et al. (2009)* ; *Sung Bong et al. (2011)*) et non empirique (*Saha et al. (2005)* ; *Rajan and Carrier (2014)*). De plus les objectifs pour chaque étude peuvent varier selon si le but est d'optimiser les rendements en glucose, les rendements en xylose ou les rendements totaux après prétraitement ou après prétraitement + hydrolyse enzymatique.

L'hydrolyse des hémicelluloses est un bon indicateur de l'efficacité d'une cuisson acide. En effet, plus les hémicelluloses sont hydrolysées, plus le taux de conversion du xylane (homopolymère de xylose, majoritairement présent dans les hémicelluloses de paille de blé) en xylose augmente et plus la cellulose sera accessible aux enzymes. Comme cela est résumé dans le Tableau I.4, l'ensemble des conditions opératoires optimales testées sur différents substrats permet d'obtenir un rendement d'hydrolyse du xylane compris entre 76 et 83 % après prétraitement optimal. Pour une température élevée (160-200°C), le temps de séjour du prétraitement sera plus faible (<10 min) (*Cara et al. (2006)* ; *Zhang et al. (2015)*). A l'inverse, pour une température plus faible (100-130°C), le temps de séjour sera plus long (>20 min) (*Aguilar et al. (2002)* ; *Roberto et al. (2003)* ; *Moutta et al. (2012)*). Enfin, une température et un temps intermédiaire permettent également d'obtenir des rendements semblables (*Jeong et al. (2010)* ; *Castro et al. (2011)* ; *Sung Bong et al. (2011)* ; *Rajan and Carrier (2014)*).

Tableau I.4 : Comparatif des différentes conditions opératoires optimales pour un prétraitement à l'acide dilué

| Référence | Substrat | Température | Temps | H ₂ SO ₄ | Rendement de l'hydrolyse du xylane |
|--------------------------------|--------------------------|-------------|-------|--------------------------------|------------------------------------|
| | | °C | min | %pds | %pds |
| <i>Sung Bong et al. (2011)</i> | Paille d'orge | 150 | 17 | 1.2 | 81 |
| <i>Roberto et al. (2003)</i> | Paille de riz | 121 | 27 | 1.6 | 77 |
| <i>Zhang et al. (2015)</i> | Bagasse de sorgho | 170 | 10 | 1.0 | 76 |
| <i>Cara et al. (2008)</i> | Olivier | 170 | 10 | 1.0 | 83 |
| <i>Aguilar et al. (2002)</i> | Bagasse de canne à sucre | 122 | 22 | 2.0 | 80 |
| <i>Moutta et al. (2012)</i> | Feuille de canne à sucre | 130 | 30 | 2.9 | 85 |
| <i>Castro et al. (2011)</i> | Paille de colza | 170 | 20 | 0.5 | 82 |
| <i>Jeong et al. (2010)</i> | Paille de colza | 152 | 21 | 1.8 | 76 |

A l'inverse, l'hydrolyse poussée des hémicelluloses conduit à l'augmentation de la teneur en furfural et 5-HMF dans l'hydrolysats de cuisson et ces derniers sont connus pour être des inhibiteurs de la fermentation. Par exemple, *Roberto et al. (2003)* et *Zhang et al. (2015)* obtiennent des concentrations en furfural et en 5-HMF inférieures à 0.13 et 0.18 g.L⁻¹ et à 0.22 et 0.73 g.L⁻¹ respectivement. En s'appuyant sur la revue de *Parajó et al. (1998)*, il est cependant possible que ces concentrations ne conduisent pas à une inhibition des levures durant l'étape de fermentation pour ces deux études. En dehors de ce point particulier, les concentrations en produits de dégradation sont supérieures dans l'étude de *Zhang et al. (2015)* que dans celle de *Roberto et al. (2003)*. Or les facteurs de sévérité sont similaires. Cette différence peut s'expliquer par la température de prétraitement, en effet plusieurs études ont démontré que la température était le paramètre le plus important quant à la formation de produits de dégradation (*Roberto et al. (2003)* ; *Neureiter et al. (2002)*).

En dehors de conditions opératoires de prétraitement, la nature même du substrat peut influencer les rendements après prétraitement. Comme le démontrent *Sun and Cheng (2005)* et *Hopkins and Hüner (2008)*, cela pourrait être dû à la différence de morphologie des substrats, à l'agencement des composés au sein de la paroi végétale et/ou à la période de récolte des espèces.

Cas de la lignine

Durant le prétraitement à l'acide dilué et pour des températures supérieures à 130°C, la lignine est également impactée (*Selig et al. (2007)*). En effet, le clivage de la liaison β -0-4 aryl-ether va entraîner la libération de groupements hydroxyles phénoliques qui va permettre une solubilisation partielle de la lignine dans le milieu réactionnel. Cependant, ces composés sont relativement instables et pourraient se repolymériser durant la phase de redescende en température (*Leschinsky et al. (2008)*).

Différents auteurs ont également montré que, pour des sévérités élevées, la lignine peut passer sous forme liquide, migrer à l'intérieur et l'extérieur de la paroi cellulaire puis se redéposer sur la membrane cellulaire (Donohoe *et al.* (2008) ; Sannigrahi *et al.* (2011) ; Kumar *et al.* (2013)). Le caractère hydrophobe de ce polymère conduit à une redéposition sous forme de gouttelettes comme le montrent Araya *et al.* (2015) dans leur étude sur du bois d'eucalyptus (Figure I.12).

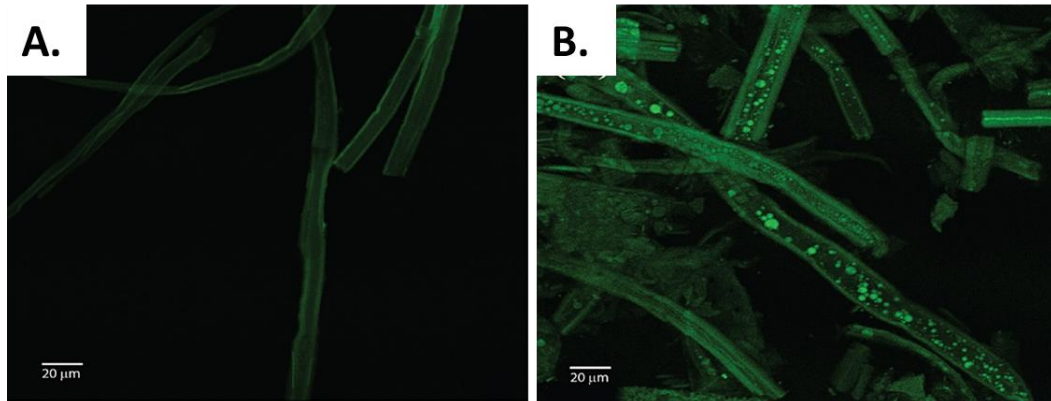


Figure I.12 : Microscopie confocale à fluorescence montrant la distribution de la lignine au sein de copeaux d'Eucalyptus non traité (A) et prétraité (B) (barre = 20 µm) (Araya *et al.* (2015))

En parallèle des observations directes par microscopie, Selig *et al.* (2007) et Donohoe *et al.* (2008) proposent des modèles simplifiés et similaires de la migration de la lignine durant un prétraitement à l'acide dilué (Figure I.13). Ils supposent que la lignine atteint un point de fusion (changement de phase) qui conduit à sa coagulation. De par sa nature hydrophobe et des forces capillaires, la lignine a le potentiel de se déplacer dans toute la matrice lignocellulosique. Durant le refroidissement, la lignine durcit et se retrouve, soit bloquée entre les différentes couches cellulaires, soit dans la lamelle moyenne et / ou dans le lumen. En plus du développement de leur modèle, Selig *et al.* (2007) ont également montré que le dépôt de gouttelettes a un effet négatif sur la réactivité de la cellulose et que leur quantité augmente avec la température.

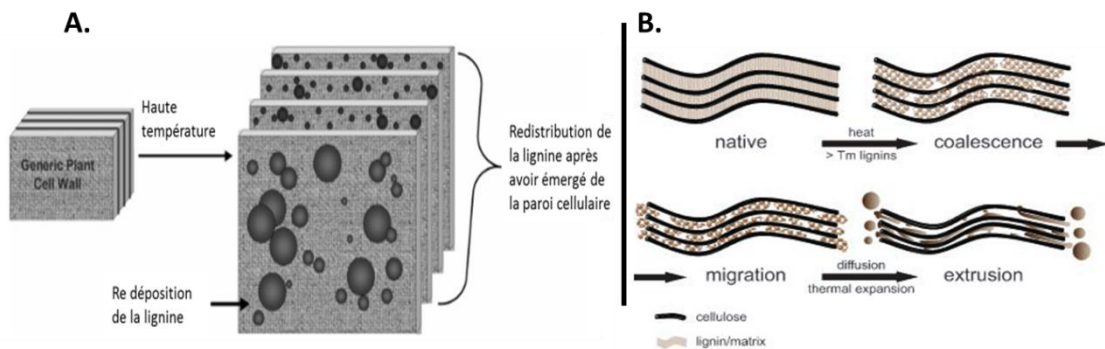


Figure I.13 : Modèles simplifiés de Selig *et al.* (2007) (A) et de Donohoe *et al.* (2008) (B) pour la migration de la lignine durant un prétraitement à l'acide dilué

1.3.B.2.b.Relation entre l'optimisation des conditions opératoires de prétraitement et les rendements en sucres après hydrolyse enzymatique

En tenant compte du rendement après prétraitement et du rendement après hydrolyse enzymatique, *Ballesteros et al. (2008)* obtiennent un rendement d'hydrolyse enzymatique maximal de 81 % pour du cardon prétraité à 200°C, 10 min, 0.1 %pds d'H₂SO₄ et un chargement de 10 %pds. Cependant sur la base de la conversion du prétraitement uniquement, le rendement maximal en xylose est obtenu avec une température inférieure de 20°C. En effet, à 180°C, la dégradation du xylose en furfural est moins importante car les conditions sont moins sévères donc le rendement en xylose est maximal. Le rendement en sucres totaux après hydrolyse enzymatique est cependant plus important à 200°C car la cellulose devient plus réactive à l'hydrolyse enzymatique. Ils concluent également que le ratio solide/liquide avant prétraitement n'influence pas le rendement à l'hydrolyse enzymatique. Cette même conclusion avait été faite par la même équipe une année auparavant sur le même substrat en faisant varier le chargement de 5 à 10 % pds MS (*Ballesteros et al. (2007)*). Pour leur étude sur des copeaux d'olivier, *Cara et al. (2008)* obtiennent un rendement en glucose après 72h d'hydrolyse enzymatique de 76.5% à 210°C, 10 min et 1.4% pds d'H₂SO₄. A nouveau, les conditions idéales pour l'optimisation du prétraitement et l'optimisation de l'ensemble prétraitement + hydrolyse enzymatique ne sont pas identiques.

1.3.B.3.Nature de l'acide

En dehors de l'étude classique de la variation des conditions opératoires principales (temps, température, charge en acide sulfurique), quelques études ont aussi été menées afin de comparer l'utilisation de différents acides durant le prétraitement par cuisson acide.

Par exemple, *Kootstra et al. (2009)* ont comparé trois acides (acide maléique, acide fumarique et acide sulfurique) à une concentration de 50 mM. Le temps de séjour était fixé à 30 min, pour un mélange réactionnel à 10 %pds MS, la température variant seule (130, 150 et 170°C). Les auteurs ont alors constaté que le rendement en glucose après hydrolyse enzymatique est optimal à 170°C quel que soit l'acide utilisé. A cette température, l'acide maléique s'avère aussi efficace que l'acide sulfurique avec des rendements en glucose de 96 % et 98 % respectivement. L'acide fumarique est quant à lui moins efficace que son isomère trans (acide maléique) car cette molécule est apolaire et donc moins miscible dans l'eau. En ce qui concerne la quantité de furfural produit à 170°C, les auteurs constatent que la quantité est doublée avec l'utilisation de l'acide sulfurique par rapport à l'acide maléique. Ils concluent alors que l'acide maléique est meilleur pour effectuer un prétraitement à l'acide dilué. Cependant il faut prendre en compte que l'acide sulfurique est un diacide plus fort que l'acide maléique car les valeurs de pKa sont respectivement de -3.0 et 1.8 pour l'acide sulfurique et de 1.8 et 6.6 pour l'acide maléique. On trouve des résultats similaires dans les études de *Qin et al. (2012)* et de *Lee et al. (2009)* qui constatent en plus que l'acide sulfurique permet d'augmenter la concentration en glucose et xylose monomérique dans l'hydrolysats par rapport aux acides organiques qui eux produisent davantage de xylose et de glucose oligomérique et moins de furfural et 5-HMF. A iso-concentration molaire, les acides organiques sont donc moins efficaces que l'acide sulfurique. *Pedersen et al. (2010)* se sont intéressés à l'impact des différents acides à iso-pH et constatent que les rendements après hydrolyse enzymatique ne sont pas identiques entre les trois acides. Les rendements en glucose et xylose monomériques ne dépendent donc pas seulement du pH (donc de l'activité des ions H⁺). Enfin *Lim et al. (2013)* constatent que les acides dicarboxyliques permettent une libération plus importante de composés phénoliques que l'acide sulfurique et que la lignine est donc davantage hydrolysée.

Pour conclure, le choix de l'acide n'est pas sans conséquence et va fortement impacter le rendement après prétraitement ou après prétraitement + hydrolyse enzymatique. Cependant même si l'utilisation de l'acide sulfurique conduit à une dégradation plus précoce du glucose et du xylose en 5-HMF et furfural respectivement, son utilisation est souvent préconisée de par son plus faible coût et son efficacité. En effet, sa concentration pourrait être optimisée simultanément avec la température et le temps de séjour afin de diminuer la sévérité de prétraitement et donc la formation de produit de dégradation.

I.3.B.4. Influence de la granulométrie initiale du substrat

L'étape de broyage peut s'avérer une étape primordiale du procédé de bioconversion de la biomasse lignocellulosique dans certains cas. Cette étape va permettre d'améliorer le transfert de masse et de chaleur dans le cas des prétraitements physico-chimiques et, par conséquent, la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique (*Zhu et al. (2009)* ; *Vidal et al. (2011)*).

Pour l'ensemble des études présentes dans Tableau I.5, l'objectif est de comprendre l'influence de la taille des particules avant prétraitement et non l'influence des conditions opératoires de prétraitement (temps de séjour, température et teneur en acide). Pour chaque étude, les conditions opératoires de test sont donc identiques et seule la granulométrie initiale du substrat a été modifiée. Les études sont contradictoires. En effet, certaines d'entre elles montrent une amélioration de la réactivité avec la diminution de la taille des particules (*Hsu et al. (1996)*). D'autres indiquent que ce paramètre n'a pas d'incidence sur la réactivité (*Springer (1985)* ; *Zeng et al. (2007)* ; *Guo et al (2008)* ; *Cesario et al. (2014)*). D'autres encore modèrent ces résultats expérimentaux en constatant une valeur limite en dessous de laquelle la réactivité n'est plus améliorée (*Singh et al. (1984)* ; *Khullar et al. (2013)*). Il est à noter que les substrats initiaux ainsi que les gammes de taille pour les particules de biomasse sont différents pour chaque étude. Cependant, il peut être conclu sans trop de risque que, pour des granulométries comprises entre le centimètre et le millimètre, les réactivités seraient identiques (pas d'effet du broyage), puis que la réactivité serait améliorée pour des tailles de l'ordre du millimètre et enfin que la réactivité stagnerait à nouveau pour des granulométries inférieures au millimètre. Il semblerait également que l'influence de la taille des particules soit intimement liée à la nature du substrat considéré.

Tableau I.5 : Influence de la taille des particules avant un prétraitement à l'acide dilué

| Référence | Substrat | Taille de particule | Impact sur la réactivité |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|--|
| <i>Guo et al. (2008)</i> | Bagasse, miscanthus, paille de riz | [50-10] et [10-5] mm | Identique |
| <i>Hsu et al. (1996)</i> | Panic érigé | 10 et 3 mm | S'améliore avec la diminution de taille |
| <i>Khullar et al. (2013)</i> | Miscanthus | 6.2 et 0.1 mm | S'améliore avec la diminution de taille, puis identique en dessous de 2 mm |
| <i>Cesario et al. (2014)</i> | Bagasse | 2.1 et 0.5 mm | Identique |
| <i>Springer (1985)</i> | Chêne | 2.5 et 0.4 mm | Identique |
| <i>Singh et al. (1984)</i> | Bagasse, paille de riz | 1.6 à 0.2 mm | S'améliore avec la diminution de taille, puis identique en dessous de 0.5 mm |
| <i>Zeng et al. (2007)</i> | Paille de maïs | 0.7 à 0.4 mm | Identique |

I.3.B.5. Conclusion partielle

Dans cette partie, il a été montré que les conditions opératoires du prétraitement vont fortement impacter le rendement en sucres monomériques totaux après prétraitement et après hydrolyse enzymatique. Tout d'abord, l'ajout d'acide va permettre, pour l'obtention d'un rendement similaire en sucres après prétraitement, d'abaisser le temps de séjour et/ou la température et donc de diminuer la transformation des sucres en produits de dégradation. De plus, les études ont montré que les conditions opératoires optimales pour la production de sucres monomériques après prétraitement et après prétraitement + hydrolyse enzymatique ne vont pas être identiques. En effet, plus la sévérité du prétraitement augmente, plus les hémicelluloses se convertissent en sucres monomériques, ce qui va rendre la cellulose plus réactive à l'hydrolyse enzymatique. Cependant, si la sévérité devient trop importante les sucres monomériques provenant des hémicelluloses vont se transformer en produits de dégradation (furfural, 5-HMF) et le rendement en xylose va diminuer. De plus, ces produits sont des inhibiteurs de la fermentation. Enfin, pour des conditions drastiques, les produits de dégradation vont se transformer en humines qui vont se déposer sur les particules solides et limiter les réactions d'hydrolyse enzymatique. Il va donc être primordial de définir l'objectif d'optimisation selon le but recherché : rendement maximal en xylose après prétraitement ou rendement total maximal après prétraitement + hydrolyse enzymatique. De plus, en dehors des conditions de prétraitement classique (temps de séjour, température et teneur en acide), la nature même de l'acide ainsi que la granulométrie initiale du substrat semblent jouer un rôle important quant à l'optimisation des rendements en sucres après prétraitement ou après prétraitement + hydrolyse enzymatique.

I.3.C. Evolution des caractéristiques physiques de la biomasse après prétraitement et leur influence sur la réactivité

I.3.C.1. La surface spécifique

La surface spécifique est un descripteur important de l'impact du prétraitement sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique (*Karimi and Taherzadeh (2016)*). Plus spécifiquement, le prétraitement à l'acide dilué va permettre d'augmenter la surface spécifique du substrat et donc d'augmenter sa réactivité à l'hydrolyse enzymatique. L'ensemble des valeurs de surface spécifique citées ci-dessous ont été obtenues sur la base de la méthode BET (cf. § I.2.C.2.a).

Tout d'abord, *Guo et al (2008)* observent que la surface spécifique du miscanthus double quand le substrat est prétraité, de $1.5 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ pour le substrat initial à $3 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ pour le substrat cuit. Au-delà de ce point, la surface spécifique continue d'augmenter alors que les hémicelluloses sont entièrement converties. Cela serait dû à l'hydrolyse progressive de la cellulose et/ou à l'hydrolyse et le réarrangement partiel de la lignine. Par la même méthode, *Kristiani et al. (2013)* observent une augmentation de la surface spécifique de 2.2 à $5.6 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ pour des feuilles de palmier ($[0.4-0.6]$ mm) non traitées et prétraitées à 2.00 %pds d' H_2SO_4 , 121°C durant 30 min. *Meng et al. (2015)* montrent également une augmentation de cette surface, pour du peuplier prétraité en présence d'acide à $120^\circ\text{C}/10$ min, $160^\circ\text{C}/10$ min et $160^\circ\text{C}/60$ min, respectivement de 2.0 , 2.3 et $5.9 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Finalement, *Dhabhai et al. (2013)* montrent que, pour de la paille de blé ($[0.2-0.5]$ mm), une augmentation de la sévérité du prétraitement conduit à une augmentation de la surface spécifique de $4.0 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ (paille native) à $7.1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ pour un prétraitement de 180°C , 7 min et 0.50 %pds d' H_2SO_4 .

En ce qui concerne l'impact des conditions opératoires de prétraitement sur l'évolution de la surface spécifique, il semble donc que, dans un premier temps, cette dernière tend à augmenter du fait de l'hydrolyse des hémicelluloses. Lorsque la conversion des hémicelluloses est totale (hydrolyse complète), cette surface continue cependant à augmenter. Ce deuxième point peut s'expliquer par l'hydrolyse progressive de la cellulose et/ou le réarrangement de la lignine. Cette surface est donc fortement fonction des modifications chimiques apportées au substrat durant le prétraitement (solubilisation des hémicelluloses, de la cellulose, réarrangement de la lignine).

Concernant le lien entre la surface accessible créée après prétraitement et l'hydrolyse enzymatique, il apparaît que l'augmentation de la surface spécifique est en corrélation directe avec l'amélioration des rendements à l'hydrolyse enzymatique (*Thompson et al. (1992)* ; *Gharpuray et al. (1983)*)

I.3.C.2. L'indice de cristallinité

Comme indiqué précédemment (§ I.2.C.2.b), la DRX et, plus récemment, la RMN du solide vont permettre de déterminer l'indice de cristallinité du substrat prétraité sur la biomasse totale et sur la cellulose respectivement. Comme pour la surface spécifique, les cuissons acides vont modifier l'indice de cristallinité. L'ensemble des indices de cristallinité a été déterminé par DRX (IC_{DRX}).

Pour l'ensemble des études présentées dans Tableau I.6 (*Thompson et al. (1992)* ; *Sung Bong et al. (2011)* ; *Dhabhai et al. (2013)* ; *Gonçalves et al. (2015)*), les conclusions sont similaires. En effet, il semblerait que l'augmentation de la sévérité du prétraitement conduit à une augmentation de l'indice de cristallinité. Cela peut s'expliquer par l'hydrolyse des hémicelluloses durant le

prétraitement. En effet, l'indice est déterminé par rapport à la biomasse totale, la quantité de cellulose est donc proportionnellement plus importante. Dans ce sens, on peut supposer que, pour des conditions sévères de prétraitement, l'indice de cristallinité continue d'augmenter de par l'hydrolyse de la cellulose amorphe.

En ce qui concerne le lien entre l' IC_{DRX} et la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique, les tendances ne sont pas évidentes. En effet, lorsque le rendement à l'hydrolyse enzymatique est déterminé, les études montrent une augmentation de la réactivité avec l'augmentation de l'indice de cristallinité (*Thompson et al. (1992)*). Cependant, comme le montre *Sung Bong et al. (2011)*, il n'existe pas de lien direct entre l' IC_{DRX} et la réactivité (régression linéaire non significative). De plus, comme vu précédemment, l' IC_{DRX} est défini à partir de la biomasse totale et non de la cellulose. L'utilisation de ce paramètre seul ne semble donc pas pertinente quant à la compréhension des relations qui existent entre le prétraitement et la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique.

Pour conclure, l' IC_{DRX} semble être un bon indicateur de l'impact des conditions opératoires de prétraitement sur la biomasse lignocellulosique mais pas un bon descripteur en lien avec la réactivité.

Tableau I.6 : Evolution de l'indice de cristallinité en fonction des conditions opératoires de prétraitement

| Référence | Substrat | Conditions opératoires | IC _{DRX} (Biomasse totale) | Réactivité |
|--|-------------------------|---|-------------------------------------|--|
| <i>Gonçalves et al. (2015)</i> | Fibre de noix de coco | Non traité | 29.3 | Non fourni |
| | | 200°C-50 min | 43.5 | |
| <i>Thompson et al. (1992)</i> | Mélange de bois feuillu | Non traité | 71.6 | 14.7 % |
| | | 240°C-8.8 s | 78.1 | 52.2 % |
| | | 260°C-9.4 s | 85.2 | 67.5 % |
| | | 280°C-12.7 s | 85.8 | 70.6 % |
| | | 180°C-8.3 s-1 %pds H ₂ SO ₄ | 78.9 | 43.8 % |
| | | 200°C-8.4 s-1 %pds H ₂ SO ₄ | 82.0 | 92.1 % |
| 220°C-8.5 s-1%pds H ₂ SO ₄ | 82.3 | 97.8 % | | |
| <i>Sung Bong et al. (2011)</i> | Paille d'orge | Non traité | 37.6 | Régression non linéaire mais augmentation de la réactivité |
| | | 150°C-16.9 min-1.16 %pds H ₂ SO ₄ | 57.4 | |
| <i>Dhabhai et al. (2013)</i> | Paille de blé | Non traité | 60.1 | Non fourni |
| | | 120°C-120 min-2 %pds H ₂ SO ₄ | 66.7 | |
| <i>Li et al. (2007a)</i> | Panic érigé | Non traité | 26.2 | 2.7 % |
| | | 160°C-20min-1.2 %pds H ₂ SO ₄ | 39.2 | 47.6 % |

I.3.D. Conclusion sur le prétraitement à l'acide dilué

Le prétraitement à l'acide dilué et l'application de différents jeux de conditions opératoires (température, temps de séjours, nature et teneur en acide, granulométrie initiale du substrat) conduisent à une modification compositionnelle et structurelle du substrat initial. Ces modifications peuvent être qualifiées grâce à des descripteurs comme l'analyse chimique, l'indice de cristallinité ou encore la surface spécifique. Cependant, la relation entre ces descripteurs et la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique ne semble pas claire. En effet, comme vu précédemment, les descripteurs utilisés sont étudiés indépendamment les uns des autres. Il serait donc pertinent d'analyser l'ensemble

de ces paramètres en simultané. C'est le cas de certaines études, comme *Thompson et al. (1992)* et *Gharpuray et al. (1983)* qui étudient l'interaction entre la surface spécifique, l'indice de cristalline et le ratio cellulose / lignine en simultané. Dans ces deux études, les auteurs démontrent que la surface spécifique est le descripteur le plus pertinent afin d'évaluer la réactivité du substrat. Avec le même objectif, *Chai et al. (2018)* ont analysé la relation entre 13 facteurs de description, englobant les variations compositionnelles, les propriétés de surface du substrat, la cristallinité de la cellulose, la porosité de la biomasse et les caractéristiques structurelles de la lignine, et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Leurs résultats ont montrés que la teneur en lignine, la teneur en cellulose et le rapport O/C affectaient principalement l'hydrolyse enzymatique.

Pour conclure, il semblerait que le prétraitement à l'acide dilué conduit dans un premier temps à l'hydrolyse des hémicelluloses, cette hydrolyse permet d'augmenter la surface de cellulose accessible aux enzymes. Le taux d'hémicellulose et la surface spécifique seraient donc en lien direct avec l'hydrolyse enzymatique. Pour des conditions de prétraitement plus sévère, la lignine subit des modifications et une relocalisation sous formes de gouttelettes à l'intérieur et sur la matrice lignocellulosique. Le réarrangement de la lignine semble être un facteur limitant de l'hydrolyse enzymatique. Enfin, la taille des particules avant prétraitement n'apparaît pas comme un descripteur important quant à la réactivité du substrat après prétraitement. Enfin il a été montré qu'une approche multi-techniques et multi-échelles paraît être pertinente afin de prendre en compte l'influence de l'ensemble des descripteurs et leurs relations sur la réactivité.

I.4. Le prétraitement par explosion à la vapeur

Le prétraitement par explosion à la vapeur peut se réaliser soit en discontinu soit en continu. L'outil batch d'explosion à la vapeur, inventé par W.H Masonen 1926 (brevet américain : US-A-1 655 618), est composé d'un générateur de vapeur qui alimente un réacteur pour le mettre en pression. Ce dernier est ensuite soumis à une dépressurisation brutale. Lors de la dépressurisation, le substrat prétraité est expulsé du réacteur et récupéré dans un éclateur (*Jacquet et al. (2012)*). Le procédé Stake, inventé par *Bender (1979)*, est quant à lui un outil d'explosion à la vapeur en continu. La biomasse permet de rendre hermétique l'entrée du système grâce à l'utilisation d'une vis sans fin conique qui comprime la biomasse au niveau de l'entrée du digesteur, créant un bouchon et empêchant la vapeur de ressortir. Par la suite, la biomasse introduite dans le digesteur subit l'étape de vapocraquage et est conduite par une seconde vis sans fin au niveau de la zone de décharge où se déroulera la détente explosive (Figure I.14).

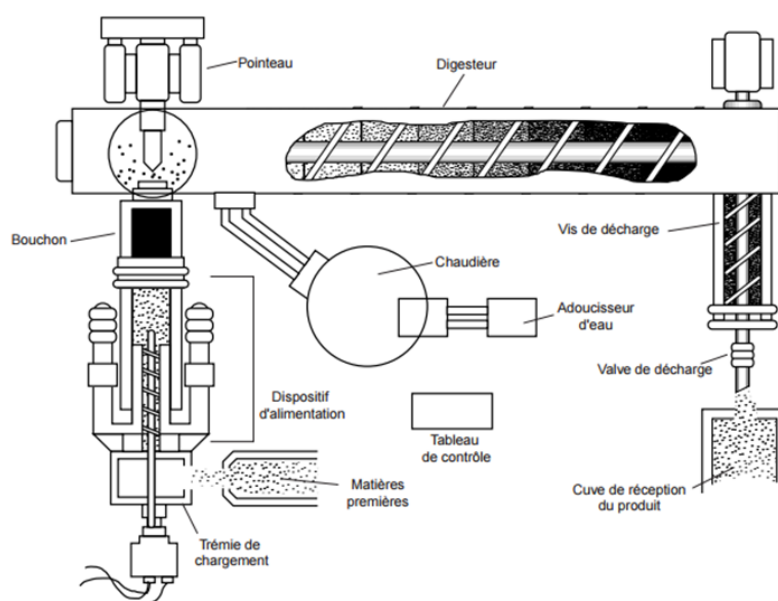


Figure I.14 : Schéma général d'une installation continue d'explosion vapeur (*Ogier et al. (1999)*)

Comme pour le prétraitement à l'acide dilué, cette technologie de prétraitement a largement été étudiée sur différents types de biomasse comme le bois d'olivier (*Cara et al. (2006)* ; *Barbanera et al. (2015)*), la paille de blé (*Ballesteros et al. (2006)*), l'eucalyptus (*Martín-Sampedro et al. (2012)*), la tige de tournesol (*Vaithanomsat et al. (2009)*), le pin (*Chacha et al. (2011)*), la paille de seigle (*García-Aparicio et al. (2006)*), l'épinette (*Pielhop et al. (2016)*) ou encore le peuplier (*Brownell et al. (1986)*). Cependant, même si ce prétraitement est souvent reconnu comme l'option la plus rentable pour le bois de résineux, les résidus agricoles et la biomasse herbacée, il semble moins efficace pour les bois de feuillus (*Prasad et al. (2007)*).

I.4.A. Impact des conditions opératoires

I.4.A.1. Variations des conditions opératoires du prétraitement

Comme pour le prétraitement à l'acide dilué, les conditions opératoires principales qui impactent fortement le rendement en sucres après prétraitement et après hydrolyse enzymatique sont le

temps de séjour, la dose d'acide et la température. Cependant, la détente explosive, donc la pression, est aussi à prendre en compte et est directement liée à la pression de la vapeur d'eau saturante.

Comme pour le prétraitement à l'acide dilué, *Cara et al. (2006)* montrent que l'ajout d'acide durant le prétraitement par explosion à la vapeur permet d'augmenter la solubilisation des pentoses provenant des hémicelluloses tout en diminuant la température et le temps de séjour. De plus, pour des copeaux d'olivier prétraité à 230°C, le rendement en glucose après hydrolyse enzymatique est meilleur en présence d'acide avec un rendement de 69.9 %pds contre 53.1 %pds en absence d'acide. Cette même observation avait déjà été faite par *Brownell et al. (1986)* qui constatent également que cet ajout permet de diminuer la production d'inhibiteurs car la température sera abaissée.

Comme les auteurs précédents, *Varga et al. (2004)* constatent que l'ajout d'acide a un effet positif sur le rendement en pentoses après prétraitement. En effet, à 210°C, 5 min et en absence d'acide, le rendement de l'hydrolyse des hémicelluloses n'est que de 20 %pds alors qu'avec l'ajout de 2.00 %pds d'H₂SO₄, les hémicelluloses sont hydrolysées à 97 %. Une diminution de ce rendement à 85 % est également observée quand la température est abaissée de 20°C. *Barbanera et al. (2015)* observent un phénomène similaire en ce qui concerne le taux de récupération des hémicelluloses dans la partie solide de bois d'olivier qui diminue avec l'augmentation du facteur de sévérité. Ils constatent également une augmentation de la quantité d'acide acétique de 0.32 à 0.70 g.L⁻¹ et d'acide formique de 1.08 à 1.72 g.L⁻¹ pour respectivement un facteur de sévérité de 3.8 et 4.7. De plus, le rendement après hydrolyse enzymatique passe de 50.2 % pds à 85.8 %pds, respectivement pour un facteur de sévérité de 3.83 et 4.71. Même si peu d'études portent sur ce sujet, *García-Aparicio et al. (2006)* montrent que, pour de la paille de seigle prétraitée par explosion vapeur en absence d'acide, les produits de dégradation comme le furfural et le 5-HMF n'ont pas un effet significatif sur l'hydrolyse enzymatique à l'inverse des sucres monomériques comme le glucose et le xylose.

Enfin, dans leur étude sur des résidus d'olivier (<10 mm), *Cara et al. (2006)* observent une diminution de la masse sèche de substrat récupérée après prétraitement. En effet, avec pour un temps de séjour fixe de 5 min, la quantité de substrat récupéré passe de 54.2 à 40.4 %pds MS pour une température de consigne de 190°C et 240°C respectivement. Cette diminution de la quantité de solide récupérée, est directement liée à l'hydrolyse du substrat. En effet, la teneur en relatif de la cellulose (dans la fraction solide) augmente puis une diminue. Et dans la fraction liquide, la quantité de glucose libre augmente alors que les sucres monomériques provenant des hémicelluloses augmentent dans un premier temps puis diminuent, ceci étant dû à la transformation de ces sucres en produits de dégradation.

Pour le prétraitement par explosion à la vapeur, les conclusions sont similaires à celles du prétraitement à l'acide dilué. En effet, le temps de séjour, la température et la teneur en acide vont influencer la composition chimique des substrats prétraités ainsi que la composition de l'hydrolysate. Ces conditions opératoires devront être adaptées en fonction du but recherché, c'est-à-dire soit l'optimisation du rendement en sucre après prétraitement, soit après prétraitement et hydrolyse enzymatique. L'une des variables supplémentaires à prendre en compte dans le prétraitement à l'explosion à la vapeur est la pression et c'est pourquoi la partie suivante s'intéressera plus spécifiquement à l'impact de la détente explosive.

I.4.A.2. Influence de la taille des particules

Au cours du prétraitement par explosion à la vapeur, des transferts de chaleur ont lieu au sein de la biomasse broyée. Il serait donc pertinent de réduire la taille des particules avant le prétraitement

afin d'éviter une trop forte cuisson de la partie externe et une trop faible cuisson de la partie interne des particules causées par des profils de température différents (*Brownell et al. (1986)*). Normalement, plus les particules sont petites et plus les risques de limitations diffusionnelles sont limités. Cette hypothèse a été étudiée par *Negro et al. (2003)* qui constatent une sensibilité plus importante au changement de température d'un lot 2-5 mm que d'un lot 8-12 mm de pin maritime. La réduction de taille ayant un coût important, il est donc nécessaire de comprendre l'impact de ce paramètre et de l'optimiser en conséquence.

En réalité, les études réalisées montrent des résultats contradictoires sur l'impact après prétraitement + hydrolyse enzymatique de la taille des particules avant prétraitement. Par exemple, *Ballesteros et al. (2002)*, *Cullis et al. (2004)* et *Monavari et al. (2009)* concluent que si la taille initiale des particules diminue, meilleur sera le rendement après hydrolyse enzymatique. A l'inverse, *Liu et al. (2013)* observent le phénomène inverse pour de la paille de maïs (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 et 2.5 cm) subissant un prétraitement par explosion à la vapeur à 200°C durant 5 min. Ils supposent que, durant la phase de vapocraquage, la vapeur diffuse mieux entre les grandes particules ce qui facilite le transfert de chaleur. Leur idée s'appuie sur le fait que la masse volumique apparente du lot broyé à 2 cm est de 39.1 g.L⁻¹ alors que le lot à 0.5 cm a une densité de 126 g.L⁻¹ (Figure I.15). De plus, ils considèrent que le tassement dû à l'engorgement des particules fines au sein du réacteur batch conduit à un mauvais éclatement du solide durant la détente explosive et donc à une mauvaise réactivité. Enfin certains comme *Vaithanomsat et al. (2009)* n'observent pas d'effet spécifique de la taille des particules initiales sur le rendement à l'hydrolyse enzymatique.

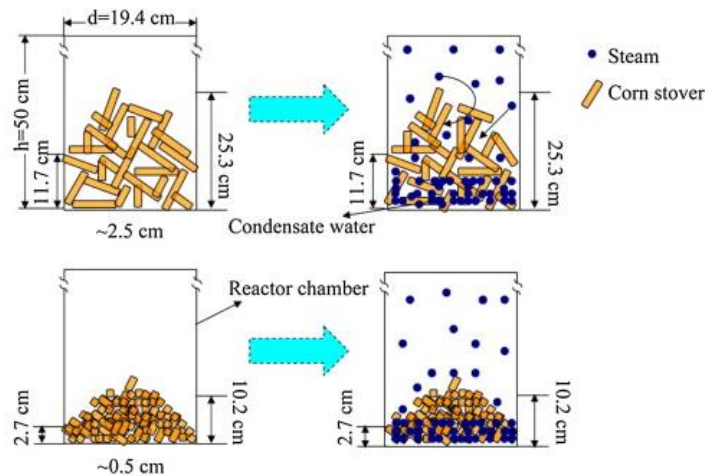


Figure I.15 : Modèle mécanique d'explosion vapeur de paille de maïs à différentes granulométries proposé par *Liu et al. (2013)*

I.4.A.3. Influence de la teneur en humidité du substrat

En dehors de l'étude des conditions opératoires classiques, certains auteurs se sont intéressés à l'impact de la teneur en humidité du substrat avant son prétraitement. Dans son étude sur du bois, *Brownell et al. (1986)* observent que le substrat après prétraitement est plus homogène lorsque son humidité initiale est faible. Ils attribuent ce phénomène à une pénétration rapide de la vapeur à l'intérieur des particules de bois. Cependant, aucun rendement après prétraitement ou après hydrolyse enzymatique n'est fourni donc aucune conclusion quantitative ne peut en être tirée. A l'inverse, *Alvira et al. (2016)* étudient l'impact de l'humidité de la paille de blé (2-10 mm) à 6 et 60 %pds pour des conditions opératoires identiques (180°C et 25 min). Ils constatent que la composition en xylane du

substrat, avec ou sans imprégnation, n'est pas impactée avec respectivement une concentration de 15.6 et 13.1 %pds. A l'inverse, ils observent une différence au niveau du rendement après hydrolyse enzymatique avec respectivement un taux de glucose de 65.9 et 73.5 %pds pour la biomasse non imprégnée et imprégnée. Ils supposent donc qu'une humidité plus importante contribue à renforcer l'effet mécanique de la détente explosive. Cependant, comme le temps de séjour est relativement long, l'eau liée au substrat peut se vaporiser et donc intensifier l'effet de l'éclatement mécanique. Des essais avec des temps plus courts auraient été pertinents pour mieux appréhender ce phénomène.

I.4.A.4. Impact de la détente explosive

A notre connaissance, seulement deux groupes d'auteurs (*Brownell et al. (1986)* ; *Pielhop et al. (2016)*) ont étudié spécifiquement l'impact de la détente explosive sur la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique. Dans ces deux études, les expérimentations ont été réalisées dans des outils batch, la première en utilisant un bois de peuplier, l'autre de l'épicéa. Afin d'étudier l'impact spécifique de la détente explosive, les deux études ont réalisés, après l'étape d'auto-hydrolyse, une dépressurisation lente du réacteur afin d'arriver à la consigne de test puis la détente a été appliquée. Comme le montre le Tableau I.7, les résultats sont contradictoires entre les 2 équipes. En effet, *Brownell et al. (1986)* estiment que la détente explosive n'a pas d'effet sur la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique, alors que *Pielhop et al. (2016)* observent une amélioration de la réactivité d'environ 50%pds entre une détente à 2.5 et 30 bar.

Il est suggéré par *Pielhop et al. (2016)* que l'absence d'amélioration de la réactivité dans l'étude de *Brownell et al. (1986)* soit due à la nature du substrat (bois de feuillu). En effet, les bois de feuillus sont moins sensibles au prétraitement par explosion à la vapeur car cette biomasse possède peu de groupements acétyles (*Prasad et al. (2007)*). L'auto-hydrolyse, accélérée par la présence de groupements acétyles dans la biomasse et sa transformation en acide acétique, est donc moins sévère. Il est donc possible que la phase d'auto-hydrolyse soit trop courte et que l'effet de la détente ne soit pas visible. Une autre possibilité est la taille des particules car les copeaux d'épicéa sont 10 fois plus gros que les particules de peuplier. La détente explosive n'a peut-être pas eu d'effet sur le peuplier broyé à 3.2 mm. En effet, *Liu et al. (2013)* supposent que la vapeur diffuse mieux entre les grandes particules ce qui facilite le transfert de chaleur et donc l'effet de la détente explosive (cf. I.4.A.2).

Ensuite, dans les deux études, le temps de prétraitement est fixé à 2.5 et 10 min pour l'étude de *Brownell et al. (1986)* et *Pielhop et al. (2016)* respectivement. Cependant, une dépressurisation lente doit être réalisée afin d'arriver à la consigne de détente or ce temps de dépressurisation n'est pas connu. Le temps réel va être d'autant plus long que la consigne de pression avant détente est faible. Donc, en ce qui concerne l'étude de *Pielhop et al. (2016)*, même si la réactivité est bien améliorée, il est difficile de savoir si cette amélioration provient de l'augmentation du temps d'auto-hydrolyse (et donc de l'hydrolyse des hémicelluloses) ou bien de l'impact de la détente seule.

Enfin, en ce qui concerne l'étude de *Brownell et al. (1986)*, la réactivité à l'hydrolyse enzymatique est exprimée en gramme de glucose par millilitre. Or, la teneur en cellulose de chaque substrat n'est pas connue. Les résultats sont donc exprimés à partir de la masse totale de substrat introduit. Or, avec le temps de dépressurisation nécessaire afin d'atteindre les consignes de 6.9 et 3.4 bar, il est possible que la composition chimique des substrats soit différente ce qui influencera le rendement en glucose. Il est donc délicat d'affirmer que la réactivité n'évolue pas avec l'application de différentes détentes.

Tableau I.7 : Impact de la détente explosive sur la réactivité des substrats prétraités

| Référence | Substrat | Conditions opératoires | Réactivité |
|-------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| <i>Brownell et al. (1986)</i> | Peuplier (3.2 mm) | 240°C - 2.5 min - 32 bar | 16.2 mg de glucose/mL ^a |
| | | 240°C - 2.5 min - 6.9 bar | 15.4 mg de glucose /mL ^a |
| | | 240°C - 2.5 min - 3.4 bar | 15.6 mg de glucose /mL ^a |
| <i>Pielhop et al. (2016)</i> | Epicéa (30 mm) | 230°C-10min – 30 bar | 87 %pds ^b |
| | | 230°C - 10min – 25 bar | 90 %pds ^b |
| | | 230°C-10min – 20 bar | 90 %pds ^b |
| | | 230°C-10min – 15 bar | 82 %pds ^b |
| | | 230°C-10min – 10 bar | 75 %pds ^b |
| | | 230°C-10min – 7.5 bar | 70 %pds ^b |
| | | 230°C-10min – 5.0 bar | 55 %pds ^b |
| | | 230°C-10min – 2.5 bar | 55 %pds ^b |

^a Résultat d'hydrolyse enzymatique à 44h, menée à 45°C, pH 4.7, 150 tr.min⁻¹, concentration initial du substrat à 50 mg.mL⁻¹ et des enzymes provenant de *Trichoderma harzianum* E58

^b Résultat d'hydrolyse enzymatique à 120h, menée à 50°C, pH 5, 210 tr.min⁻¹, concentration en cellulose initiale à 1 %pds, 60 FPU.g⁻¹ cellulose d'Accellerase 1500

Pour conclure, l'impact de la détente explosive a été peu étudié, probablement à cause de la difficulté méthodologique à étudier spécifiquement ce phénomène. En effet, il est possible de considérer deux phases dans le prétraitement d'explosion à la vapeur : d'une part l'auto-hydrolyse (absence d'acide) ou la cuisson acide (présence d'acide) et d'autre part la détente explosive. Or, ces deux phases sont intimement liées de par la vapeur d'eau saturante. C'est pourquoi la méthodologie appliquée par les deux groupes d'auteurs est discutable car en appliquant une dépressurisation lente afin d'arriver à la consigne de détente, le temps de dépressurisation n'est pas pris en compte. Or, des réactions auto-hydrolyse peuvent avoir lieu et influencer la réactivité des substrats.

I.4.B. Influence des caractéristiques physiques de la biomasse après prétraitement

I.4.B.1. Impact sur la morphologie

A l'échelle macroscopique, *Vignon et al. (1995)* montrent par microscopie électronique à balayage que, durant un prétraitement par explosion à la vapeur, la température impacte la morphologie des particules de chanvre. En effet, à partir de 220°C, ils observent une déstructuration des tissus puis à 240°C un défibrage complet et une réduction de la taille des particules (Figure I.16).

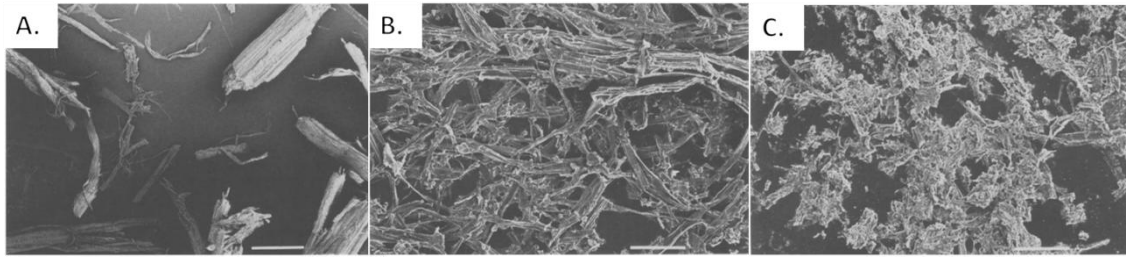


Figure I.16 : Microscopie électronique à balayage de chanvre prétraité à 180 s-210°C (A) (barre d'échelle : 1 mm) ; à 180 s-220°C (B) (barre d'échelle : 100μm) et à 180 s-240°C (C) (échelle graduée : 100μm) (Vignon et al. (1995))

A l'échelle microscopique, Tanahashi (1990), Michalowicz et al. (1991) et Toussaint et al. (1991) constatent que, pour des copeaux de peuplier non prétraités ou pré-cuits mais ayant subi une dépressurisation lente, la lamelle moyenne est liée à la paroi primaire de la cellule végétale et les trois couches de la paroi secondaire sont bien visibles (Figure I.17 / A). Avec une augmentation de la température, la lamelle moyenne se sépare de la paroi primaire et la couche S2 de la paroi secondaire semble se dégrader. Ils observent également des contrastes plus foncés au niveau de la paroi secondaire qui correspondrait à de la lignine. Enfin des stratifications de la paroi secondaire apparaissent ce qui serait dû aux forces de cisaillement induites par la décompression brutale (Figure I.17 / B).

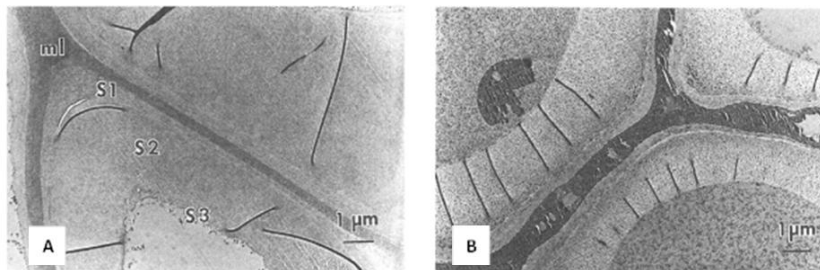


Figure I.17: Coupe transversale de cellules de copeaux de peuplier en microscopie électronique à transmission (A. Non prétraité / B. Prétraité à 227°C durant 3 min) (Toussaint et al. (1991))

Comme pour le prétraitement à l'acide dilué, la présence de gouttelettes de lignine sur la surface du substrat prétraité à forte sévérité a également été observée (Figure I.18) (Vignon et al. (1995) ; Wang et al. (2009) ; Putnina et al. (2012) ; Liu et al. (2013) ; Pielhop et al. (2016)).

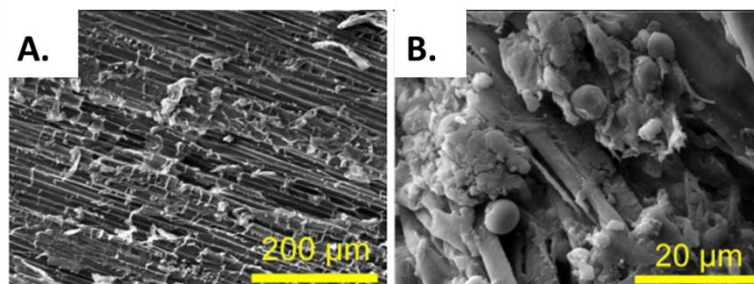


Figure I.18: Microscopie électronique à balayage de chanvre non prétraité (A) et prétraité à forte sévérité ($F_0 = 4.45$ et $\Delta P = 32$ bar) (B) (Putnina et al. (2012))

I.4.B.2. Impact sur la surface spécifique

Dans le paragraphe précédent, il a été montré que la morphologie du substrat prétraité est fortement impactée par les conditions opératoires du prétraitement par explosion à la vapeur. Ce changement de morphologie va donc impacter la surface spécifique du substrat et la surface accessible aux enzymes

C'est ce que montrent *Maache-Rezzoug et al. (2015)* qui constatent, par la méthode BET, une augmentation de la surface de 0.8 à 1.7 m².g⁻¹ respectivement pour de la paille native et de la paille prétraitée à 165°C, 40 min et 2.20 %pds d'H₂SO₄. Ces données sont en accord avec leurs observations microscopiques disponibles dans un article précédent (*Maache-Rezzoug et al. (2011)*). En effet, les images montrent que la paille non traitée possède des zones compactes et des alvéoles ellipsoïdales d'environ 58.2 µm en moyenne. A l'inverse, pour un prétraitement à 7 baret 15 min, la structure s'élargit et la circonférence moyenne des alvéoles passe à 92 µm (Figure I.19). Ils considèrent que cette augmentation de taille est due à la mise en place d'un second état d'équilibre après la mise en pression qui conduirait à la vaporisation instantanée de l'eau libre interne des cellules végétales. Ce serait cette seconde étape qui perturberait la structure de la biomasse et entraînerait l'augmentation de la taille des pores et donc de la surface spécifique. Cependant, *Liu et al. (2013)* observent que l'évolution de la surface spécifique disponibles aux enzymes n'est pas significative pour des conditions opératoires identiques mais des granulométries différentes : 2.4 et 2.1 m².g⁻¹ respectivement pour de la paille à 2.5 et 0.5 cm.

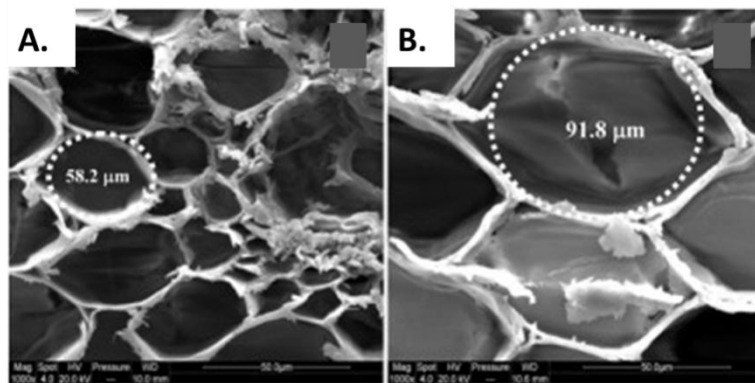


Figure I.19 : Microstructure de la paille de blé non prétraité (A) et prétraité à 7 bar durant 15 min (B) (Maache-Rezzoug et al. (2011))

I.4.C.Conclusion sur le prétraitement par explosion à la vapeur

Comme pour le prétraitement à l'acide dilué, les conditions opératoires de base (temps de séjour, température, dose d'acide) ont un impact sévère sur les performances et peuvent être traduites sous la forme d'un facteur de sévérité englobant l'ensemble de ces effets. Il est cependant très difficile de comparer les études entre elles car le facteur de sévérité n'est pas standardisé. A l'inverse du prétraitement à l'acide dilué, le rôle de la diminution de la taille des particules ne semble pas avoir un effet bénéfique durant le prétraitement par explosion à la vapeur. Une hypothèse avancée est que des particules de grande taille permettraient un espacement plus important entre elles ce qui conduirait à une meilleure diffusion de la vapeur au sein de la biomasse et donc à une meilleure hydrolyse des hémicelluloses. De plus, les études menées sur l'impact de l'humidité de la biomasse initiale sont contradictoires. Enfin l'impact de la détente explosive seule a été très peu étudié. A notre connaissance, seulement deux articles l'ont spécifiquement étudié et les résultats obtenus sont contradictoires entre eux. Il semblerait que les conclusions dépendent fortement de l'avancement de l'hydrolyse des hémicelluloses et/ou des substrats étudiés.

Plus spécifiquement, en ce qui concerne le lien entre l'influence des conditions opératoires et des paramètres physico-chimiques sur la réactivité des substrats, les conclusions sont identiques à la partie précédente traitant du prétraitement à l'acide dilué. Autrement dit, l'augmentation de la sévérité de prétraitement permet l'hydrolyse des hémicelluloses, cette hydrolyse conduisant à l'augmentation de la surface spécifique et par conséquent à l'amélioration de la réactivité des substrats. Enfin, comme pour le prétraitement à l'acide dilué, l'indice de cristallinité ne semble pas être un descripteur pertinent de l'impact du prétraitement sur l'hydrolyse enzymatique.

I.5. Les humines

I.5.A. Généralités

Le prétraitement à l'acide dilué (et, par extension, le prétraitement par explosion à la vapeur) permet la solubilisation des hémicelluloses entraînant l'amélioration de la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique. Pour des températures supérieures à 130°C, ce prétraitement s'accompagne aussi de la solubilisation d'une partie de la lignine (*Leschinsky et al. (2008)*). De par sa nature hydrophobe, cette dernière peut alors migrer à l'intérieur de la matrice lignocellulosique et se recondenser sous formes de gouttelettes à la surface du substrat durant la phase de refroidissement du prétraitement (*Selig et al. (2007)*). Ce phénomène pourrait potentiellement bloquer l'accès de la cellulose aux enzymes. Le prétraitement à l'acide dilué ne conduit donc pas à une délignification du substrat mais à un réarrangement de la lignine au sein de la matrice. De plus, plusieurs études ont montré que, pour des conditions drastiques de prétraitement, la teneur en lignine Klason (fraction insoluble dans l'eau et l'acide) avait tendance à augmenter (*Donohoe et al. (2008)* ; *Sievers et al. (2009)* ; *Sannigrahi et al. (2011)*). Dans un premier temps, cette fraction a été nommée « pseudo-lignine » car ses fonctions chimiques, détectées par FTIR, étaient semblables à celles de la lignine.

Par la suite, différentes études ont montré que ce phénomène pouvait s'expliquer par la polymérisation des produits de dégradation des polysaccharides (furfural et 5-HMF) et/ou leur polymérisation avec la lignine (*Li et al. (2005)* ; *Li et al. (2007b)*). Ensuite, il a été démontré que ce composé pouvait être généré à partir de cellulose ou d'hémicelluloses, sans contribution significative de la lignine pendant le prétraitement à l'acide dilué (*Sannigrahi et al. (2011)* ; *Meng and Ragauskas (2017)*). C'est pourquoi le terme « humine » a également fait son apparition.

Finalement, le terme « carbone hydrothermal » (HTC) peut être aussi trouvé dans certaines études. Dans ce cas, l'objectif principal est la production de nanoparticules à partir de substrats modèle comme la cellulose, le xylane, le glucose, le xylose, leurs produits de dégradation ou encore le fructose (*Sun and Li (2004)* ; *Titirici et al. (2008)* ; *Yemis and Mazza (2011)*). Même si ces études ne sont pas directement en lien avec la production d'éthanol 2G, elles permettent d'apporter des informations complémentaires sur les mécanismes réactionnels de formation des humines et également sur leurs caractéristiques physico-chimiques.

I.5.B. Caractérisation des humines

Comme pour la caractérisation des substrats prétraités, différentes techniques analytiques ont été utilisées afin de caractériser les humines, telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), la spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier (FTIR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore la GPC (chromatographie par perméation de gel).

Par exemple, la MEB peut permettre de révéler des particules sphériques avec une large distribution de diamètre provenant du prétraitement à l'acide dilué d'un substrat modèle comme la cellulose, le xylane, le glucose, le xylose, un de leurs produits de dégradation (5-HMF et furfural) et le fructose (*Girisuta et al. (2006)* ; *Girisuta et al. (2007)* ; *Patil and Lund (2011)* ; *Van Zandvoort et al. (2013)*). Entre autres, *Yao et al. (2007)* ont ainsi observé que les sphères présentaient des morphologies différentes lorsqu'elles étaient formées à partir du glucose (surfaces bosselées) ou à partir du fructose (surface lisse), tandis que *Titirici et al. (2008)* ont noté que les humines dérivées du glucose et du 5-HMF étaient similaires (interconnexion entre les particules de taille comprise entre

200 et 1000 nm) mais distinctes des humines dérivées du xylose et du furfural (particules dispersées et taille comprise entre 100 et 3000 nm) (Figure I.20).
Figure I.20

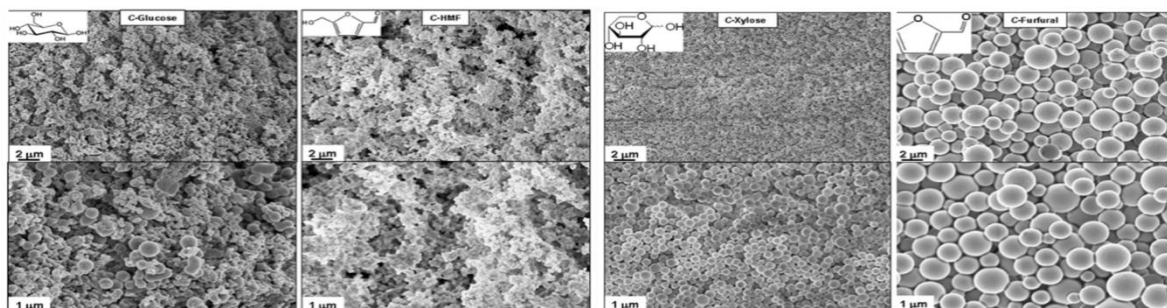


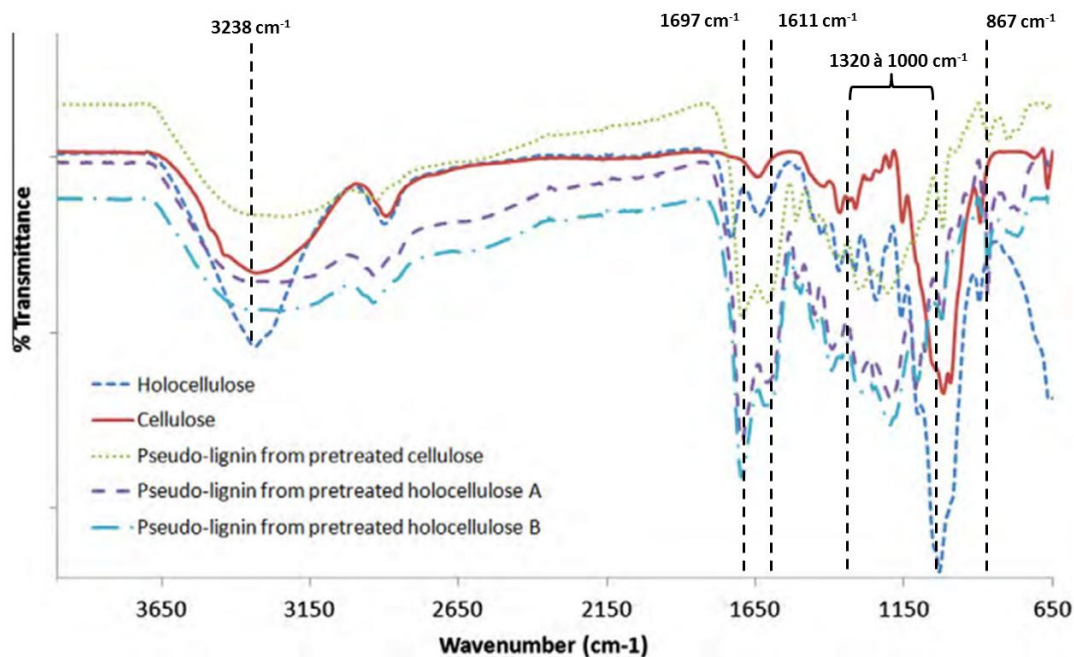
Figure I.20 : Images MEB de glucose, 5-HMF, xylose et furfural après prétraitement à 180°C durant 24 h (Titirici et al. (2008))

En utilisant la GPC, *Hu et al. (2012b)* et *Ma et al. (2015)* se sont quant à eux intéressés aux poids moléculaires des humines formées à partir d'holocellulose⁹ et d' α -cellulose. D'une manière générale, le poids moléculaire des humines, quel que soit le substrat initial, est plus faible que celui de la lignine. Par exemple, le poids moléculaire moyen de lignine de peuplier est de 10 002 g.mol⁻¹ tandis que celui des humines dérivées de l'holocellulose de peuplier est de 5 050 g.mol⁻¹ (*Kim et al. (2011)* ; *Hu et al. (2012b)*). Il semblerait également que l'augmentation de la sévérité de prétraitement n'impacte pas le poids moléculaire des humines formées (*Kumar et al. (2013)*) mais uniquement leur quantité. Enfin le poids moléculaire des humines dérivées d'holocellulose est plus important que celui des humines dérivées de l' α -cellulose (*Hu et al. (2012b)*).

En termes de composition chimique, l'analyse élémentaire des humines fournit généralement des fractions massiques de 55-65 % pour le carbone, de 4-5 % pour l'hydrogène et de 30-40 % pour l'oxygène (*Baugh and McCarty (1988)* ; *Luijckx et al. (1993)* ; *Girisuta et al. (2006)* ; *Girisuta et al. (2007)*). En dehors des analyses élémentaires, certains auteurs ont utilisé la FTIR, la spectroscopie Raman, la spectroscopie de photoélectrons X (XPS) ou encore la RMN du ¹³C afin de distinguer les différents groupes fonctionnels constitutifs des humines. Quelle que soit la technique utilisée, l'ensemble des auteurs conclut que les humines sont constituées de structures carbonyles, carboxyles, aromatiques et aliphatiques (*Sun and Li (2004)* ; *Yao et al. (2007)* ; *Titirici et al. (2008)* ; *Patil and Lund (2011)* ; *Hu et al. (2012b)*) (Figure I.21).

Pour conclure, les humines peuvent être détectées et caractérisées par différentes techniques analytiques tels que l'analyse élémentaire, la FTIR, la GPC, le MEB.... Ces différentes analyses permettent d'obtenir des informations sur leurs morphologies, leurs compositions chimiques ou encore leurs poids moléculaires. Cependant, il y a peu d'information sur leur caractérisation complète et des recherches supplémentaires devront donc être réalisées.

⁹Mélange de cellulose et d'hémicelluloses provenant du bois

**Attributions :**

- 3238 cm^{-1} : liaison H (hydrogène)
- 1697 et 1611 cm^{-1} : liaison C = O (carbonyle et carboxylique) conjugué à un anneau aromatique
- 1320 à 1000 cm^{-1} : liaison C-O (alcool, éthers ou acide carboxylique)
- 867 cm^{-1} : C-H aromatique

Figure I.21 : Spectre infrarouge d' α -cellulose, d'holocellulose, de pseudo-lignine extraite après prétraitement d' α -cellulose et d'holocellulose A (180°C, 40 min, 0.1M H_2SO_4) et B (180°C, 60 min, 0.2M H_2SO_4) adapté de Hu et al. (2012b)

I.5.C.Mécanisme de formation

En raison de la complexité de la biomasse lignocellulose, les mécanismes de formation des humines durant le prétraitement à l'acide dilué (et par extension durant le prétraitement par explosion à la vapeur) sont encore mal compris et nécessitent une analyse plus poussée de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Comme vu précédemment (cf. § I.3.A.), avec l'augmentation de la sévérité de prétraitement, la déshydratation du glucose et du xylose conduit respectivement à la formation de 5-HMF et de furfural. Par la suite, le 5-HMF et le furfural peuvent se réhydrater et former de l'acide formique, de l'acide lévulinique et de l'acide formique. Il est alors suspecté que l'ensemble de ces composés puissent se convertir en des composés aromatiques qui seraient alors des intermédiaires clés dans la formation des humines. Cependant, Van Zandvoort et al. (2013) ont démontré que l'acide lévulinique ne rentrait pas en compte dans la formation des humines.

De plus, il a été montré que les humines étaient composées de structures aromatiques (Nguyen et al. (2000); Negro et al. (2003); Hu et al. (2012b)) et certains intermédiaires-clés ont pu être découvert comme un dérivé benzénique, nommé 3,8-dihydroxy-2-méthylchromone (DMC), qui est un produit majeur de la dégradation du xylose (Popoff and Theander (1972); Hu et al. (2012a)) ou encore le 1,2,4-benzénetriol (BTO) qui peut être formé durant un prétraitement hydrothermal du glucose par réarrangement du 5-HMF (Luijckx et al. (1993)) (Figure I.22). La production d'humines

impliquerait aussi des réactions de polycondensation et/ou de polymérisation car le BTO peut réagir rapidement avec le 5-HMF et/ou le furfural par substitution électrophile aromatique pour produire un polymère tridimensionnel en présence d'un catalyseur acide. Enfin, en présence d'oxygène, la polymérisation du BTO pourrait également être possible et formerait une structure de type poly-phénylène ou poly-aromatique (Yamamoto *et al.* (1990)).

Même si des voies réactionnelles conduisant à la formation des humines ont ainsi été identifiées dans la littérature, il semble aujourd'hui judicieux de poursuivre ces recherches afin de mieux comprendre les mécanismes de formation des humines. En effet, il est possible que d'autres intermédiaires de réactions entrent en compte dans la formation de ces dernières.

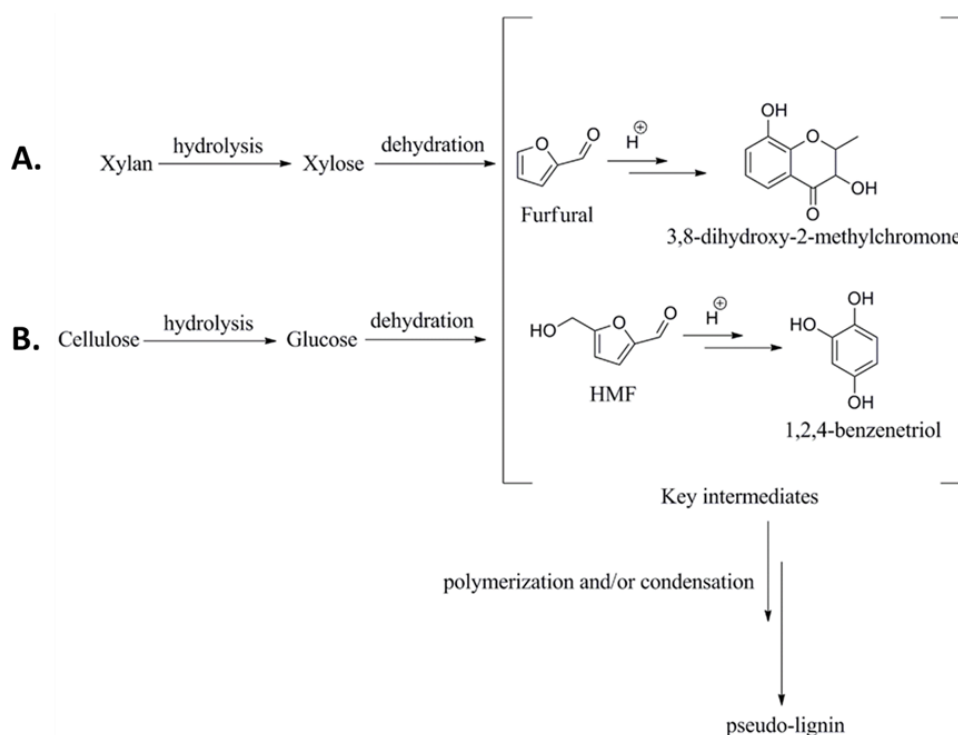


Figure I.22 : Proposition de voies réactionnelles pour la formation de pseudo-lignine (Hu *et al.* (2012b))

I.5.D.Impact sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique

Il a été supposé que la pseudo-lignine redéposée à la surface du substrat pouvait bloquer l'accès des enzymes à la cellulose et donc diminuer l'efficacité enzymatique (Yang and Wyman (2006) ; Donohoe *et al.* (2008)). Dans ce sens, Hu *et al.* (2012b) ont rapporté que la pseudo-lignine induisait une diminution de la conversion de la cellulose Avicel. En effet, avec l'augmentation de la sévérité de prétraitement, la quantité de pseudo-lignine est passée de 0,0 % à 65,0 % pds alors que le rendement en glucose à l'hydrolyse enzymatique est passé de 60,0 % à 38,0 % respectivement. Sur cette base, Zhuang *et al.* (2017) ont supposé que les enzymes pouvaient se lier de façon non productive et permanente à la pseudo-lignine ce qui a pour effet de réduire l'efficacité enzymatique. Ce point a d'ailleurs été confirmé très récemment par Juan *et al.* (2018).

Plus spécifiquement, *Hu et al. (2012a)*, *Hu et al. (2012b)* ont étudié l'impact de l'addition de lignine et/ou de pseudo-lignine sur l'hydrolyse enzymatique d'holocellulose de peuplier (Figure I.23). Pour ce faire, l'holocellulose et la lignine ont été respectivement prétraitées à l'acide dilué afin de produire de la pseudo-lignine (Pseudo-L) et de la lignine prétraitée (EMAL-DAP). Les résidus solides formés ont été lavés puis solubilisés dans du p-dioxane. De l'holocellulose native a ensuite été incorporée au mélange afin que la pseudo-lignine et la lignine prétraitée se déposent sur le substrat. Après filtration, le solide a été lavé et lyophilisé. Pour s'assurer que la pseudo-lignine et la lignine prétraitée étaient bien incorporées à l'holocellulose sous forme de gouttelettes, des clichés MEB ont été réalisés. Après 24h d'hydrolyse enzymatique, à isoconcentration en cellulose, les auteurs ont constaté que la pseudo-lignine et la lignine prétraitée avaient un impact négatif sur le rendement en glucose. Cependant, cet impact est plus important pour la pseudo-lignine que pour la lignine prétraitée. De plus, ils ont constaté que l'inhibition par la pseudo-lignine est d'autant plus importante que sa teneur dans le mélange augmente ; à l'inverse, cela n'est pas vrai pour la lignine prétraitée. Cependant, lorsque le temps d'hydrolyse augmente (par exemple à 48h), ils ont observé que le rendement pour l'holocellulose et l'holocellulose + lignine prétraitée étaient similaires. L'ajout de lignine prétraitée n'a donc plus d'effet sur l'inhibition de la réactivité pour des temps longs d'hydrolyse et cette observation est en accord avec d'autres études (*Meunier-Goddik and Penner (1999)* ; *Jeoh et al. (2007)* ; *Kumar and Wyman (2009a)*). Ces deux études de *Hu et al. (2012a)*, *(2012b)* confirment donc que la pseudo-lignine est plus préjudiciable à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose que la lignine prétraitée à l'acide dilué. C'est pourquoi limiter la formation de ces composés pourrait être un défi majeur afin d'optimiser les prétraitements à l'acide dilué ou par explosion à la vapeur.

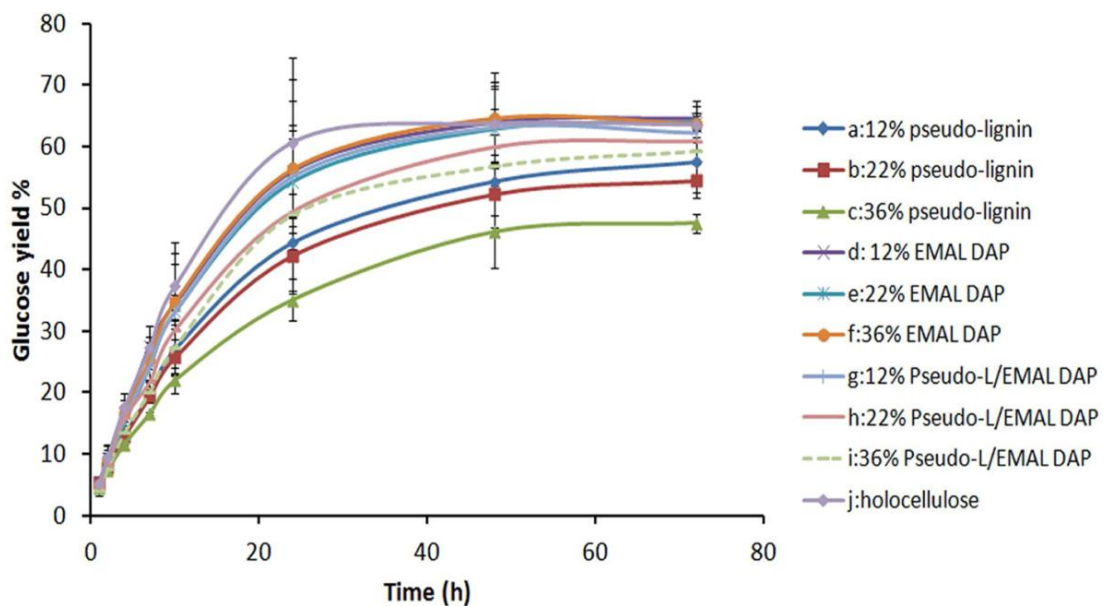


Figure I.23 : Rendements en glucose après hydrolyse enzymatique d'holocellulose pure et couplée à de la lignine prétraitée (EMAL DAP) et ou de la pseudo-lignine (Pseudo-L) (Hu et al. (2012b))

I.5.E. Eviter la formation d'humines

Comme la pseudo-lignine ne se forme que pour des conditions drastiques de prétraitement, réduire la sévérité du prétraitement est un moyen évident de réduire ou d'éviter la formation d'humines. Cependant, à mesure que la sévérité diminue, la conversion des substrats en hydrolyse

enzymatique diminue en raison de la récalcitrance de la matrice lignocellulosique. Pour pallier à ce désagrément, le prétraitement à l'acide dilué en continu a récemment démontré son efficacité grâce à l'élimination dans la phase aqueuse de la lignine soluble, mais également d'environ 15 % pds de la lignine insoluble initiale, et des sucres sous formes oligomériques et monomériques ce qui limite la formation de produit de dégradation (Yan *et al.* (2014)).

D'autres études se sont portées sur l'ajout de surfactants dans le milieu réactionnel, tels que le Tween-80, l'acide dodécylbenzène sulfonique, le polyéthylène glycol (PEG) et le diméthylsulfoxyde (DMSO). D'une manière générale, ces études ont montré l'efficacité de ces composés chimiques pour éviter la formation de pseudo-lignine et donc limiter l'inhibition des enzymes due à la présence de cette dernière (Román-Leshkov *et al.* (2006) ; Kumar and Wyman (2009b) ; Qing *et al.* (2010) ; Satyanagalakshmi *et al.* (2011)).

Enfin, Hu (2014) ont étudié l'impact de la composition du ciel gazeux, en faisant varier les proportions d'oxygène et de diazote, sur la formation d'humine dans le milieu réactionnel. Ils ont alors montré que l'apport d'oxygène facilitait davantage la production de pseudo-lignine que le diazote. Il semblerait donc qu'effectuer un prétraitement à l'acide dilué dans un environnement non oxygéné soit l'une des alternatives possibles pour limiter la formation d'humines.

I.6.Conclusion

Un des prétraitements les plus couramment utilisé pour la transformation de la biomasse lignocellulosique en éthanol 2G est le prétraitement par explosion à la vapeur (*Liu et al. (2013) ; Yuzhi et al. (2013)*). Cette opération primordiale pour le procédé peut être décomposée en deux phases distinctes : une étape d'hydrolyse s'apparentant à une cuisson acide et dont le but principal est d'hydrolyser les hémicelluloses afin de libérer la cellulose et une étape de détente explosive qui réduit la taille des particules par un effet de cisaillement mécanique.

Du fait de son importance, le prétraitement par explosion vapeur a longtemps été étudié dans la littérature ce qui est plutôt positif, mais de nombreux articles se contentent d'observer l'impact global des conditions opératoires de prétraitement sur les performances en termes de rendement en sucres, produits par la dégradation des hémicelluloses, ou en termes de réactivité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique. Les explications avancées restent limitées pour comprendre les résultats obtenus et se résument le plus souvent à fournir les conditions optimales et/ou à étudier un paramètre indépendamment des autres (nature du substrat, température, temps de séjour, taille des particules, acide utilisé, teneur en acide, etc...). Dans quelques cas, des analyses partielles réalisées sur des substrats prétraités permettent de relier les réactivités à certaines caractéristiques comme la surface accessible ou la cristallinité. Cependant, peu d'études complètes, basées sur un protocole multi-analyses, sont proposées dans la littérature.

La revue bibliographique, présentée dans ce chapitre, avait pour objectif de faire un état des lieux des connaissances actuelles dans le domaine du prétraitement par explosion à la vapeur (et du prétraitement par cuisson acide qui en est un sous-élément). Les études réalisées pour lier les propriétés des substrats prétraités à leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique ont été particulièrement mises en avant dans ce chapitre car elles correspondent au travail d'approfondissement réalisé durant cette thèse.

Concernant les prétraitements par cuisson acide, les principales informations à retenir de l'étude bibliographique sont :

- Les conditions opératoires (temps de séjour, température, dose d'acide) ont un impact significatif sur les performances et peuvent être traduites sous la forme d'un facteur de sévérité englobant l'ensemble de ces effets. Il est cependant très difficile de comparer les études entre elles car le facteur de sévérité n'est pas standardisé.
- Les conditions opératoires vont influencer la composition chimique du substrat
- Le choix de l'acide a un impact sur les performances de cuisson mais sans explication claire sur son rôle.
- La diminution de la taille des particules semble améliorer les performances à l'hydrolyse enzymatique mais jusqu'à une limite maximale évaluée à environ 1 mm.

Ces premières conclusions sont extensibles aux prétraitements par explosion à la vapeur avec les particularités suivantes :

- La diminution de la taille des particules ne semble pas avoir un effet bénéfique en prétraitement par explosion alors qu'il en avait un en prétraitement par cuisson acide. Une hypothèse avancée est que des particules de grande taille permettent un espacement plus important entre elles ce qui conduirait à une meilleure diffusion de la

vapeur au sein de la biomasse, donc à un meilleur transfert de chaleur et à une meilleure hydrolyse des hémicelluloses.

- L'impact de la détente explosive seule a été très peu étudié. A notre connaissance, seulement deux articles l'ont spécifiquement étudié et les résultats obtenus sont contradictoires entre eux. Il semblerait que les conclusions dépendent fortement de l'avancement de l'hydrolyse des hémicelluloses et/ou du substrat étudié.

Les études plus spécifiques reliant les principales propriétés des substrats prétraités à leur réactivité en hydrolyse enzymatique montrent des tendances assez claires mais les conclusions sont toujours partielles car associées à une ou deux techniques analytiques. La non-standardisation des biomasses utilisées, des conditions testées et des techniques analytiques ne permettent pas de faire de comparaisons entre les études ce qui limite rapidement les tentatives de synthèse. A l'inverse, il est possible de conclure qu'avec l'augmentation de la sévérité de prétraitement, les hémicelluloses s'hydrolysent ce qui permet d'augmenter la surface de cellulose accessible aux enzymes et ce phénomène est en corrélation avec l'analyse de la surface spécifique. Pour des conditions de prétraitement plus sévères, la lignine se modifie et migre au sein de la matrice lignocellulosique ce qui peut entraîner une baisse de la réactivité. En effet, la lignine se dépose sur la cellulose et cette dernière n'est plus disponible à l'hydrolyse enzymatique. Enfin, des humines (produits de dégradation des sucres) peuvent se créer par des réactions de polymérisation/recondensation des sucres et de leurs produits de dégradation et se fixer aux substrats prétraités. Comme pour la lignine, ces composés semblent préjudiciables à l'hydrolyse enzymatique.

La revue bibliographique montre donc clairement un manque de données expérimentales et analytiques pour améliorer la compréhension des phénomènes mis en jeu durant le prétraitement par explosion vapeur et pour clarifier les descripteurs impactant la réactivité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique.

Les efforts de la thèse devront se porter sur l'acquisition de nombreux points expérimentaux avec l'étude de tous les paramètres sensibles du prétraitement par explosion à la vapeur (sur une seule biomasse pour limiter la difficulté). Les substrats prétraités devront faire l'objet de protocoles analytiques complets afin de détecter et quantifier les descripteurs qui impactent le plus la réactivité en hydrolyse enzymatique. Un effort particulier devra être fait sur l'étude de la détente explosive en essayant de séparer au maximum les aspects de cuisson, des aspects de détente, par un protocole expérimental approprié. Enfin une meilleure compréhension de la formation, de la structure ainsi que de l'impact des humines sur la réactivité de substrats à l'hydrolyse enzymatique feront l'objet d'une étude spécifique.

I.7.Stratégie de la thèse

Afin de mieux appréhender les relations entre les caractéristiques physico-chimiques de la biomasse après prétraitement et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique, il a été choisi de découpler expérimentalement le prétraitement en une phase de cuisson acide (assimilable au prétraitement à l'acide dilué dans la littérature) et une phase de détente explosive.

Dans un premier temps, la phase de cuisson sera étudiée en faisant varier l'ensemble des conditions opératoires afin d'obtenir des substrats prétraités aux caractéristiques physico-chimiques variées. La grande variabilité des échantillons obtenus durant ce prétraitement permettra de mieux appréhender les relations existantes entre les propriétés chimiques et la réactivité à l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique. Par la suite, une caractérisation multi-technique et multi-échelle permettra de mieux comprendre ces phénomènes dans leur globalité et donc de discriminer les descripteurs pertinemment en lien avec la réactivité. La caractérisation étant primordiale pour cette étude, ce travail s'est fait en étroite relation avec la thèse de J. Passicouset effectuée dans la Direction Physique et Analyse d'IFPEN (« Descripteurs physico-chimiques de biomasses lignocellulosiques en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in situ »).

Dans un second temps, l'étude bibliographique a aussi montré que l'impact de la détente explosive seule avait été peu étudié dans le passé, même s'il est notoirement connu que l'explosion conduit à l'éclatement mécanique du substrat ce qui permet d'améliorer sa réactivité. C'est pourquoi un des autres objectifs de cette thèse sera d'étudier séparément les différents phénomènes ayant lieu au sein d'un réacteur d'explosion à la vapeur. Une étude spécifique sera ainsi réalisée pour découpler expérimentalement la partie de cuisson acide de la partie explosive et pour étudier ces deux étapes séparément. Dans cette approche, des cuissons acides ont été effectuées dans un réacteur autoclave en appliquant différentes conditions opératoires (temps de séjour, température et charge en acide) ce qui a permis d'étudier une variation de la composition des substrats prétraités et des jus de cuisson. Les substrats obtenus ont ensuite été introduits dans un outil d'explosion à la vapeur pour étudier l'impact de plusieurs niveaux de détente sur la réactivité des substrats finaux. L'objectif final de ces deux parties sera de vérifier si la bonne compréhension des phénomènes ayant lieu durant la cuisson chimique et des phénomènes ayant lieu durant la détente explosive permet bien d'appréhender le prétraitement par explosion vapeur dans son ensemble.

Enfin une étude spécifique s'axera sur les humines, produits de dégradation qui sont formés durant le prétraitement à l'acide dilué ou par explosion à la vapeur, afin de mieux comprendre leur formation, leur structure et leur impact sur la réactivité de substrat à l'hydrolyse enzymatique.

I.8.Références

- Abatzoglou et al. (1992)* Abatzoglou N., Chornet E., Belkacemi K. and Overend R.P. (1992) **Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation.** *Chemical Engineering Science* **47**: 1109–1122.
- Aguilar et al. (2002)* Aguilar R., Ramírez J., Garrote G. and Vázquez M. (2002) **Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse.** *Journal of Food Engineering* **55**: 309–318.
- Alvira et al. (2016)* Alvira P., Negro M.J., Ballesteros I., González A. and Ballesteros M. (2016) **Steam Explosion for Wheat Straw Pretreatment for Sugars Production.** *Bioethanol* **2**: 66-75.
- Araya et al. (2015)* Araya F., Troncoso E., Mendonça R.T. and Freer J. (2015) **Condensed lignin structures and re-localization achieved at high severities in autohydrolysis of Eucalyptus globulus wood and their relationship with cellulose accessibility.** *Biotechnology and bioengineering* **112**: 1783–1791.
- Aresta et al. (2012)* Aresta M., Dibenedetto A. and Dumeignil F. (2012) **Biorefinery: From biomass to chemicals and fuels.** Chapter 9 Process development and metabolic engineering for bioethanol production from lignocellulosic biomass. Gruyter, Berlin, Boston.
- Badiei et al. (2014)* Badiei M., Asim N., Jahim J.M. and Sopian K. (2014) **Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass.** *APCBEE Procedia* **9**: 170–174.
- Balat (2011)* Balat M. (2011) **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review.** *Energy Conversion and Management* **52**: 858–875.
- Ballerini and Alazard-Toux (2006)* Ballerini D. and Alazard-Toux N. (2006) **Les biocarburants : État des lieux, perspectives et enjeux du développement.** *Éditions Technip*, Paris.
- Ballesteros et al. (2008)* Ballesteros I., Ballesteros M., Manzanares P. et al. (2008) **Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production.** *Biochemical Engineering Journal* **42**: 84–91.
- Ballesteros et al. (2006)* Ballesteros I., Negro M. J., Oliva J. M. et al. (2006) **Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw.** *Applied biochemistry and biotechnology* **129**: 496–508.

- Ballesteros et al. (2002)* Ballesteros I., Oliva J., Negro M., Manzanares P. and Ballesteros M. (2002) **Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes.** *Process Biochemistry* **38**: 187–192.
- Ballesteros et al. (2007)* Ballesteros M., José Negro M., Manzanares P. et al. (2007) **Fractionation of *Cynara cardunculus* (cardo) biomass by dilute-acid pretreatment.** *Applied biochemistry and biotechnology* **137**: 239–252.
- Barakat et al. (2013)* Barakat A., de Vries H. and Rouau X. (2013) **Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: a review.** *Bioresource Technology* **134**: 362–373.
- Barbanera et al. (2015)* Barbanera M., Buratti C., Cotana F., Foschini D. and Lascaro E. (2015) **Effect of Steam Explosion Pretreatment on Sugar Production by Enzymatic Hydrolysis of Olive Tree Pruning.** *Energy Procedia* **81**: 146–154.
- Baugh and McCarty (1988)* Baugh K.D. and McCarty P.L. (1988) **Thermochemical pretreatment of lignocellulose to enhance methane fermentation: I. Monosaccharide and furfurals hydrothermal decomposition and product formation rates.** *Biotechnology and bioengineering* **31**: 50–61.
- Bayer et al. (1998)* Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R. and Shoham Y. (1998) **Cellulose, cellulases and cellulosomes.** *Current Opinion in Structural Biology* **8**: 548–557.
- Behera et al. (2014)* Behera S., Arora R., Nandhagopal N. and Kumar S. (2014) **Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **36**: 91–106.
- Bender (1979)* Bender R. (1979) **Method of treating lignocellulose materials to produce ruminant feed.** US4136207.
- Bhutto et al. (2017)* Bhutto A.W., Qureshi K., Harijan K. et al. (2017) **Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass.** *Energy* **122**: 724–745.
- Brownell et al. (1986)* Brownell H.H., Yu E.K. and Saddler J.N. (1986) **Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop.** *Biotechnology and bioengineering* **28**: 792–801.

- Brunauer et al. (1938)* Brunauer S., Emmett P.H. and Teller E. (1938) **Adsorption of Gases in Multimolecular Layers.** *Journal of the American Chemical Society* **60**: 309–319.
- Cao et al. (2009)* Cao G., Ren N., Wang A. et al. (2009) **Acid hydrolysis of corn stover for biohydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16.** *International Journal of Hydrogen Energy* **34**: 7182–7188.
- Cara et al. (2006)* Cara C., Ruiz E., Ballesteros I., Negro M.J. and Castro E. (2006) **Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification.** *Process Biochemistry* **41**: 423–429.
- Cara et al. (2008)* Cara C., Ruiz E., Oliva J.M., Sáez F. and Castro E. (2008) **Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification.** *Bioresource Technology* **99**: 1869–1876.
- Castro et al. (2011)* Castro E., Díaz M., Cara C. et al. (2011) **Dilute acid pretreatment of rapeseed straw for fermentable sugar generation.** *Bioresource Technology* **102**: 1270–1276.
- Cesario et al. (2014)* Cesario A.L.L., Costa A. and Rabelo S.R. (2014) **Effect of particule size on dilute acide pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse.** *Chemical Engineering Transactions* **37**: 409–414.
- Chacha et al. (2011)* Chacha N., Toven K., Mtui G., Katima J. and Mrema G. (2011) **Steam pretreatment of pine (*pinus patula*) wood residue for the production of reducing sugars.** *Cellulose Chem. Technol.* **45**: 495–501.
- Chai et al. (2018)* Chai L.; Liu M.; Yan X.; Cheng X.; Zhang T.; Si M.; Min X.; Shi Y. (2018) **Elucidating the Interactive Impacts of Substrate-Related Properties on Lignocellulosic Biomass Digestibility.** *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **6**: 6783–6791
- Chu et al. (2007)* Chu, B.C.H. and Lee H. (2007) **Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation.** *Biotechnology advances* **25**: 425–441.
- Chum et al. (1990)* Chum H.L., Johnson D.K., Black S.K. and Overend R.P. (1990) **Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter.** *Applied biochemistry and biotechnology* **24**: 1–14.

- Colonna and Arrouays (2006)* Colonna P. and Arrouays D. (2006) **La chimie verte**. Éditions Tec & Doc, Paris, New York.
- Coughlan (1985)* Coughlan M.P. (1985) **The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application**. *Biotech. Genetic Eng. Rev.* **3**: 39–109.
- Cullis et al. (2004)* Cullis I.F., Saddler J.N. and Mansfield S.D. (2004) **Effect of initial moisture content and chip size on the bioconversion efficiency of softwood lignocellulosics**. *Biotechnology and bioengineering* **85**: 413–421.
- Danquah et al. (2011)* Danquah M., Liu B. and Haru R. (2011) **Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass**. In *Progress in Biomass and Bioenergy Production*. Shaikat S. InTech.
- De Jong and van Ommen (2015)* De Jong W. and van Ommen J.R. (2015) **Biomass as a sustainable energy source for the future: Fundamentals of conversion processes**. Chapter II Biomass Composition, Properties, and Characterization. Wiley, Hoboken, New Jersey.
- Dhabhai et al. (2013)* Dhabhai R., Chaurasia S.P. and Dalai A.K. (2013) **Effect of pretreatment conditions on structural characteristics of wheat straw**. *Chemical Engineering Communications* **200**: 1251–1259.
- Dodd and Cann (2009)* Dodd D. and Cann I.K.O. (2009) **Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production : global change biology**. *Bioenergy* **1**: 2–17.
- Dong et al. (2017)* Dong L., Wu R., Zhao X. and Liu D. (2017) **Phenomenological modeling and evaluation of formic acid pretreatment of wheat straw with an extended combined severity factor for biomass fractionation and enzymatic saccharification to produce bioethanol**. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **81**: 140–149.
- Donohoe et al. (2008)* Donohoe B.S., Decker S.R., Tucker M.P., Himmel M.E. and Vinzant T.B. (2008) **Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment**. *Biotechnology and bioengineering* **101**: 913–925.

- Elgharbawy et al. (2016)* Elgharbawy A.A., Alam M.Z., Moniruzzaman M. and Goto M. (2016) **Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass.** *Biochemical Engineering Journal* **109**: 252–267.
- Excoffier et al. (1991)* Excoffier G., Toussaint B. and Vignon M.R. (1991) **Saccharification of steam-exploded poplar wood.** *Biotechnology and bioengineering* **38**: 1308–1317.
- Feldman (1985)* Feldman D. (1985) **Wood—chemistry, ultrastructure, reactions.** *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition* **23**: 601–602.
- Fengel and Wegener (1989)* Fengel D. and Wegener G. (1989) **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions.** *Walter de Gruyter*, Berlin, New York.
- Froass et al. (1998)* Froass P.M., Ragauskas A.J. and Jiang J. (1998) **Nuclear Magnetic Resonance Studies. 4. Analysis of Residual Lignin after Kraft Pulping.** *Industrial & Engineering Chemistry Research* **37**: 3388–3394.
- García-Aparicio et al. (2006)* García-Aparicio M.P., Ballesteros I., González A. et al. (2006) **Effect of Inhibitors Released During Steam-Explosion Pretreatment of Barley Straw on Enzymatic Hydrolysis.** *Applied biochemistry and biotechnology* **129**: 278–288.
- Gauss et al. (1976)* Gauss W.F., Suzuki S. and Takagi M. (1976) **Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments.** US 3990944 A.
- Gharpuray et al. (1983)* Gharpuray M. M.; Lee Y. H.; Fan L. T. (1983) **Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis.** *Biotechnology and bioengineering* **25**: 157–172.
- Gírio et al. (2010)* Gírio F.M., Fonseca C., Carneiro F. et al. (2010) **Hemicelluloses for fuel ethanol: A review.** *Bioresource Technology* **101**: 4775–4800.
- Girisuta et al. (2006)* Girisuta B., Janssen, L. P. B. M. and Heeres H.J. (2006) **A kinetic study on the decomposition of 5-hydroxymethylfurfural into levulinic acid.** *Green Chemistry* **8**: 701-709.
- Girisuta et al. (2007)* Girisuta B., Janssen, L. P. B. M. and Heeres H.J. (2007) **Kinetic Study on the Acid-Catalyzed Hydrolysis of**

Cellulose to Levulinic Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **46**: 1696–1708.

Godin et al. (2010)

Godin B., Ghysel F., Agneessens R. et al. (2010) **Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération.** *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* **14**: 549–560.

Gonçalves et al. (2015)

Gonçalves F.A., Ruiz H.A., Dos Santos, E.S., Teixeira J.A. and De Macedo, G.R. (2015) **Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis.** *Industrial Crops and Products* **77**: 1–12.

Guo et al (2008)

Guo G.L., Chen W.H., Chen W.H., Men L.C. and Hwang W.S. (2008) **Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production.** *Bioresource Technology* **99**: 6046–6053.

Hallac and Ragauskas (2011)

Hallac B.B. and Ragauskas A.J. (2011) **Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **5**: 215–225.

Harwood (1997)

Harwood J.L. (1997) **Plant biochemistry: Plant lipid metabolism.** Academic Press, San Diego.

Hong et al. (2007)

Hong J., Ye X. and 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 the ACS journal of surfaces and colloids* **23**: 12535–12540.

Hopkins and Hüner (2008)

Hopkins W.G. and Hüner, N.P.A. (2008) **Introduction to plant physiology,** John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.

Hsu et al. (1996)

Hsu T.A., Himmel M., Schell D., Farmer J. and Berggren M. (1996) **Design and initial operation of a high-solids, pilot-scale reactor for dilute-acid pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Applied biochemistry and biotechnology* **57**: 3–18.

Hu et al. (2012a)

Hu F, Jung S and Ragauskas A (2012a) **Impact of pseudolignin versus dilute acid-pretreated lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Sustainable chemistry and engineering* **1**: 62–65.

- Hu et al. (2012b)* Hu F., Jung S. and Ragauskas A. (2012b) **Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis.** *Bioresource Technology* **117**: 7–12.
- Hu (2014)* Hu F. (2014) **Suppression of pseudo-lignin formation under dilute acid pretreatment conditions.** *RSC Advances* **4**: 4317–4323.
- Huang (1975)* Huang A.A. (1975) **Kinetic studies on insoluble cellulose-cellulase system.** *Biotechno. Bioeng* **17**: 1421–1433.
- Huron et al. (2016)* Huron M., Hudebine D., Lopes Ferreira N. and Lachenal D. (2016) **Mechanistic modeling of enzymatic hydrolysis of cellulose integrating substrate morphology and cocktail composition.** *Biotechnology and bioengineering* **113**: 1011–1023.
- Jacquet et al. (2012)* Jacquet N., Vanderghem C., Blecker C. and Paquot M. (2012) **Impact de la steam explosion et de l'homogénéisation sur les propriétés physicochimiques et l'hydrolyse enzymatique de la cellulose: La steam explosion application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique.** *Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique*, Gembloux.
- Jacquet (2012)* Jacquet N. (2012) **Impact de la steam explosion et de l'homogénéisation sur les propriétés physico-chimiques et l'hydrolyse enzymatique de la cellulose.** Université de Gembloux.
- Jeoh et al. (2007)* Jeoh T., Ishizawa C.I., Davis M.F. et al. (2007) **Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility.** *Biotechnology and bioengineering* **98**: 112–122.
- Jeong et al. (2010)* Jeong T.S., Um B.H., Kim J.S. and Oh K.K. (2010) **Optimizing dilute-acid pretreatment of rapeseed straw for extraction of hemicellulose.** *Applied biochemistry and biotechnology* **161**: 22–33.
- Jo Eun and Jae-Won (2018)* Jo Eun K. and Jae-Won L. (2018) **Enzyme adsorption properties on dilute acid pretreated biomass by low vacuum-scanning electron microscopy and structural analysis of lignin.** *Bioresource Technology* **262**: 107–113.
- Jonsson and Martin (2016)* Jonsson L.J. and Martin C. (2016) **Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects.** *Bioresource Technology* **199**: 103–112.

- Jørgensen et al. (2007)* Jørgensen H., Kristensen J. and Felby C. (2007) **Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **1**: 119–134.
- Juan et al. (2018)* Juan H., Caoxing H., Chenhuan L. et al. (2018) **Elucidation of structure-inhibition relationship of monosaccharides derived pseudo-lignin in enzymatic hydrolysis.** *Industrial Crops and Products* **113**: 368–375.
- Karimi and Taherzadeh (2016)* Karimi K. and Taherzadeh M.J. (2016) **A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity.** *Bioresource Technology* **200**: 1008–1018.
- Khullar et al. (2013)* Khullar E., Dien B.S., Rausch K.D., Tumbleson M.E. and Singh V. (2013) **Effect of particle size on enzymatic hydrolysis of pretreated Miscanthus.** *Industrial Crops and Products* **44**: 11–17.
- Killops and Killops (2005)* Killops S.D. and Killops V.J. (2005) **Introduction to organic geochemistry.** Blackwell Pub, Malden, MA.
- Kim et al. (2011)* Kim J.Y., Shin E.J., Eom I.Y. et al. (2011) **Structural features of lignin macromolecules extracted with ionic liquid from poplar wood.** *Bioresource Technology* **102**: 9020–9025.
- Kootstra et al. (2009)* Kootstra A.M.J., Beeftink H.H., Scott E.L. and Sanders J.P. (2009) **Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw.** *Biochemical Engineering Journal* **46**: 126–131.
- Kpogbemabou (2011)* Kpogbemabou D. (2011) **Procédé de fabrication de biocarburants à partir de biomasse lignocellulosique biologiquement déstructurée.** Université de Poitiers.
- Krishnan et al. (2010)* Krishnan C., Sousa L.C., Jin M. et al. (2010) **Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol.** *Biotechnology and bioengineering* **107**: 441–450.
- Kristensen et al. (2007)* Kristensen J.B., Börjesson J., Bruun M.H., Tjerneld F. and Jørgensen H. (2007) **Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose.** *Enzyme and microbial technology* **40**: 888–895.

- Kristiani et al. (2013)* Kristiani A., Abimanyu H., Setiawan A.H., Sudiarmanto and Aulia F. (2013) **Effect of Pretreatment Process by Using Diluted Acid to Characteristic of oil Palm's Frond.** *Energy Procedia* **32**: 183–189.
- Kumar et al. (2013)* Kumar R., Hu F., Sannigrahi P. et al. (2013) **Carbohydrate derived-pseudo-lignin can retard cellulose biological conversion.** *Biotechnology and bioengineering* **110**: 737–753.
- Kumar and Wyman (2009a)* Kumar R and Wyman C. E (2009a) **Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies.** *Biotechnology progress* **25**: 807–819.
- Kumar and Wyman (2009b)* Kumar R. and Wyman C.E. (2009b) **Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies.** *Bioresource Technology* **100**: 4203–4213.
- Ladisich et al. (1983)* Ladisich M.R., Lin K.W., Voloch. M. and Tsao G.T. (1983) **Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass.** *Enzyme and microbial technology* **5**: 8–160.
- Lee et al. (2009)* Lee J.W., Rodrigues, R.C.L.B. and Jeffries T.W. (2009) **Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology.** *Bioresource Technology* **100**: 6307–6311.
- Lee et al. (1982)* Lee S.B., Shin H.S., Ryu D.D. and Mandels M. (1982) **Adsorption of cellulase on cellulose: Effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis.** *Biotechnology and bioengineering* **24**: 2137–2153.
- Leschinsky et al. (2008)* Leschinsky M., Zuckerstätter G., Weber H.K., Patt R. and Sixta H. (2008) **Effect of autohydrolysis of Eucalyptus globulus wood on lignin structure.** Part 1: Comparison of different lignin fractions formed during water prehydrolysis. *Holzforschung* **62**: R61.
- Li et al. (2007a)* Li J.B., Henriksson G. and Gellerstedt G. (2007a) **Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion.** *Bioresource Technology* **98**: 3061–3068.

- Li et al. (2007b)* Li J.B., Henriksson G. and Gellerstedt G. (2007b) **Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion.** *Bioresource Technology* **98**: 3061–3068.
- Li et al. (2005)* Li J.B., Henriksson G. and Gellerstedt G. (2005) **Carbohydrate reactions during high temperature steam treatment of aspen wood.** *Applied biochemistry and biotechnology* **125**: 175–188.
- Lim et al. (2013)* Lim W.S., Kim J.Y., Kim H.Y. et al. (2013) **Structural properties of pretreated biomass from different acid pretreatments and their effects on simultaneous saccharification and ethanol fermentation.** *Bioresource Technology* **139**: 214–219.
- Liu et al. (2013)* Liu Z.H., Qin L., Pang F. et al. (2013) **Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover.** *Industrial Crops and Products* **44**: 176–184.
- Luijckx et al. (1993)* Luijckx G, van Rantwijk F and van Bekkum H (1993) **Hydrothermal formation of 1,2,4-benzenetriol from 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and d-fructose.** *Carbohydrate research* **242**: 131–139.
- Mahesh et al. (2017)* Mahesh K. M., Kumar Kharia S., Prasad S. et al. (2017) **Furfural and 5-HMF Potent fermentation inhibitors and their removal techniques.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**: 2060–2066.
- Ma et al. (2015)* Ma X., Yang X., Zheng X. et al. (2015) **Toward a further understanding of hydrothermally pretreated holocellulose and isolated pseudo lignin.** *Cellulose* **22**: 1687–1696.
- Maache-Rezzoug et al. (2015)* Maache-Rezzoug Z., Maugard T., Qiuyu Z.J.M., Nouviaire A. and Rezzoug S.A. (2015) **Combined steam-explosion toward vacuum and dilute-acid spraying of wheat straw. Impact of severity factor on enzymatic hydrolysis.** *Renewable Energy* **78**: 516–526.
- Maache-Rezzoug et al. (2011)* Maache-Rezzoug Z., Pierre G., Nouviaire A., Maugard T. and Rezzoug S.A. (2011) **Optimizing thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology.** *Biomass and Bioenergy* **35**: 3129–3138.

- Mamers and Menz (1984)* Mamers H. and Menz D.N.J. (1984) **Explosion pretreatment of Pinus radiata woodchips for the production of fermentation substrates.** *Australian Pulp and Paper Industry Technical Association* **37**: 644–649.
- Martín-Sampedro et al. (2012)* Martín-Sampedro R., Eugenio M.E., García J.C. et al. (2012) **Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of Eucalyptus globulus.** *Biomass and Bioenergy* **42**: 97–106.
- Mazza (2009)* Mazza M (2009) **Modification chimique de la cellulose en milieu liquide ionique et CO supercritique,** Institut Nationale Polytechnique de Toulouse.
- Meng and Ragauskas (2017)* Meng X. and Ragauskas A. (2017) **Pseudo-Lignin Formation during Dilute acid Pretreatment for Cellulosic Ethanol.** *Recent Advances in Petrochemical Science* **1**, 1-5.
- Meng et al. (2015)* Meng X., Wells T., Sun Q., Huang F. and Ragauskas A. (2015) **Insights into the effect of dilute acid, hot water or alkaline pretreatment on the cellulose accessible surface area and the overall porosity of Populus.** *Green Chem* **17**: 4239–4246.
- Meunier-Goddik and Penner (1999)* Meunier-Goddik L. and Penner M.H. (1999) **Enzyme-Catalyzed Saccharification of Model Celluloses in the Presence of Lignacious Residues.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 346–351.
- Michalowicz et al. (1991)* Michalowicz G., Toussaint B. and Vignon M.R.(1991) **Ultrastructural Changes in Poplar Cell Wall during Steam Explosion Treatment.** *Holzforschung* **45**: 175–179.
- Monavari et al. (2009)* Monavari S., Galbe M. and Zacchi G. (2009) **Impact of impregnation time and chip size on sugar yield in pretreatment of softwood for ethanol production.** *Bioresource Technology* **100**: 6312–6316.
- Moutta et al. (2012)* Moutta R.O., Chandel A.K., Rodrigues, R.C.L.B. et al. (2012) **Statistical Optimization of Sugarcane Leaves Hydrolysis into Simple Sugars by Dilute Sulfuric Acid Catalyzed Process.** *Sugar Tech* **14**: 53–60.
- Negro et al. (2003)* Negro M.J., Manzanares P., Oliva J.M., Ballesteros I. and Ballesteros M. (2003) **Changes in various physical/chemical parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment.** *Biomass and Bioenergy* **25**: 301–308.

- Neureiter et al. (2002) Neureiter M.; Danner H.; Thomasser C.; Saidi B.; Braun R. (2002) **Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions** *Applied Biochemistry and Biotechnology* **98**:49–58.
- Nguyen et al. (2000) Nguyen Q.A., Tucker M.P., Keller F.A. and Eddy F.P. (2000) **Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods.** *Applied biochemistry and biotechnology* **84**: 561–576.
- Ogier et al. (1999) Ogier J., Ballerini D., Leygue J., Rigal L. and Pourquié J. (1999) **Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique.** *Oil and Gas Science and Technology* **54**: 67–94.
- Overend and Chornet (1987) Overend R. and Chornet E. (1987) **Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **321**: 523–5363.
- Parajó et al. (1998) Parajó J.C., Domínguez H. and Domínguez J.M. (1998) **Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates.** *Bioresource Technology* **66**: 25–40.
- Park et al. (2001) Park C.Y., Ryu Y.W. and Kim C. (2001) **Kinetics and rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in supercritical carbon dioxide.** *Korean Journal of Chemical Engineering* **18**: 475–478.
- Patil and Lund (2011) Patil S.K.R. and Lund C.R.F. (2011) **Formation and Growth of Humins via Aldol Addition and Condensation during Acid-Catalyzed Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural.** *Energy & Fuels* **25**: 4745–4755.
- Pedersen and Meyer (2010) Pedersen M. and Meyer A.S. (2010) **Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening.** *New biotechnology* **27**: 739–750.
- Pedersen et al. (2010) Pedersen M., Viksø-Nielsen A. and Meyer A.S. (2010) **Monosaccharide yields and lignin removal from wheat straw in response to catalyst type and pH during mild thermal pretreatment.** *Process Biochemistry* **45**: 1181–1186.
- Pielhop et al. (2016) Pielhop T., Amgarten J., von Rohr P.R. and Studer M.H. (2016) **Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility.** *Biotechnology for biofuels* **9**: 152.

- Popoff and Theander (1972)* Popoff T. and Theander O. (1972) **Formation of Aromatic Compounds from Carbohydrates.** *Carbohydrate research* **22**: 135–149.
- Prasad et al. (2007)* Prasad S., Singh A., Jain N. and Joshi H.C. (2007) **Ethanol Production from Sweet Sorghum Syrup for Utilization as Automotive Fuel in India.** *Energy & Fuels* **21**: 2415–2420.
- Putnina et al. (2012)* Putnina A, Kukle S and Gravitis J (2012) **Steam explosion as the pretreatment method of lignocellulosic biomass.** *Material Science. Textile and Clothing Technology* **7**: 80–83.
- Qin et al. (2012)* Qin L., Liu Z.H., Li B.Z., Dale B.E. and Yuan Y.J. (2012) **Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids.** *Bioresource Technology* **112**: 319–326.
- Qing et al. (2010)* Qing Q., Yang B. and Wyman C.E. (2010) **Impact of surfactants on pretreatment of corn stover.** *Bioresource Technology* **101**: 5941–5951.
- Rajan and Carrier (2014)* Rajan K. and Carrier D.J. (2014) **Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis.** *Biomass and Bioenergy* **62**: 222–227.
- Rasmussen et al. (2014)* Rasmussen H., Sørensen H.R. and Meyer A.S. (2014) **Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms.** *Carbohydrate research* **385**: 45–57.
- Roberto et al. (2003)* Roberto I.C., Mussatto S.I. and Rodrigues R.C. (2003) **Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor.** *Industrial Crops and Products* **17**: 171–176.
- Román-Leshkov et al. (2006)* Román-Leshkov Y., Chheda J.N. and Dumesic J.A. (2006) **Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose.** *Science* **312**: 1933–1937.
- Saha et al. (2005)* Saha B.C., Iten L.B., Cotta M.A. and Wu Y.V. (2005) **Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol.** *ProcessBiochemistry* **40**: 3693–3700.

- Sannigrahi et al. (2011)* Sannigrahi P., Kim D.H., Jung S. and Ragauskas A. (2011) **Pseudo-lignin and pretreatment chemistry.** *Energy Environ. Sci.* **4**: 1306–1310.
- Sathitsuksanoh et al. (2011)* Sathitsuksanoh N., Zhu Z., Wi S. and Zhang Y.H.P. (2011) **Cellulose solvent-based biomass pretreatment breaks highly ordered hydrogen bonds in cellulose fibers of switchgrass.** *Biotechnology and bioengineering* **108**: 521–529.
- Satyanagalakshmi et al. (2011)* Satyanagalakshmi K., Sindhu R., Binod P. et al. (2011) **Bioethanol production from acid pretreated water-hyacinth by separate hydrolysis and fermentation.** *Journal of Scientific and Industrial Research* **70**: 156–161.
- Schlögl (2013)* Schlögl R. (2013) **Chemical energy storage.** De Gruyter, Berlin.
- Segal et al. (1959)* Segal L., Creely J.J., Martin A.E. and 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**: 786–794.
- Selig et al. (2007)* Selig M.J., Viamajala S., Decker S.R. et al. (2007) **Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Biotechnology progress* **23**: 1333–1339.
- Sievers et al. (2009)* Sievers C., Musin I., Marzioletti T. et al. (2009) **Acid-Catalyzed Conversion of Sugars and Furfurals in an Ionic-Liquid Phase.** *ChemSusChem* **2**: 665–671.
- Singh et al. (1984)* Singh A., Das K. and Sharma D.K. (1984) **Production of xylose, furfural, fermentable sugars and ethanol from agricultural residues.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Chemical Technology* **34**: 51–61.
- Sluiter et al. (2008)* Sluiter A., Hames B., Ruiz R. et al. (2008) **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass.** *Laboratory Analytical Procedure.*
- Springer (1985)* Springer E.L. (1985) **Prehydrolysis of hardwoods with dilute sulfuric acid.** *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* **24**: 614–623.
- Stevenson (1994)* Stevenson FJ (1994) **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions,** 2nd edn. Wiley, New York.

- Stone and Scallan (1968)* Stone J. and Scallan A.M. (1968) **A structural model for the cell wall of water swollen wood pulp fibres based on their accessibility to macromolecules.** *Cellulose Chemistry and Technologie* **2**: 343–358.
- Sun and Li (2004)* Sun X. and Li Y. (2004) **Colloidal carbon spheres and their core/shell structures with noble-metal nanoparticles.** *Angewandte Chemie* **43**: 597–601.
- Sun and Cheng (2005)* Sun Y. and Cheng J.J. (2005) **Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production.** *Bioresource Technology* **96**: 1599–1606.
- Sung Bong et al. (2011)* Sung Bong K., Ja Hyun L., Kyeong K.O. et al. (2011) **Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **16**: 725–732.
- Taherzadeh and Karimi (2008)* Taherzadeh M.J. and Karimi K. (2008) **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review.** *International journal of molecular sciences* **9**: 1621–1651.
- Tanahashi (1990)* Tanahashi M. (1990) **Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood.** *Wood research bulletin of the Wood Research Institute Kyoto* **77**: 49–117.
- Tengborg et al. (1998)* Tengborg C., Stenberg K., Galbe M. et al. (1998) **Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* **70**: 3–15.
- Thompson et al. (1992)* Thompson D.N., Chen H.C. and Grethlein H.E. (1992) **Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area.** *Bioresource Technology* **39**: 155–163.
- Titirici et al. (2008)* Titirici M.M., Antonietti M. and Baccile N. (2008) **Hydrothermal carbon from biomass: A comparison of the local structure from poly- to monosaccharides and pentoses/hexoses.** *Green Chemistry* **10**: 1204–1212.
- Tiwari et al (2013)* Tiwari R., Rana S., Singh S. et al. (2013) **Biological delignification of paddy straw and Parthenium sp. using a novel micromycete Myrothecium roridum LG7 for enhanced saccharification.** *Bioresource Technology* **135**: 7–11.

- Toussaint *et al.* (1991) Toussaint B., Excoffier G. and Vignon M. R. (1991) **Effect of steam explosion treatment on the physico-chemical characteristics and enzymic hydrolysis of poplar cell wall components.** *Animal Feed Science and Technology* **32**: 235–242.
- Vaithanomsat *et al.* (2009) Vaithanomsat P., Chuichulcherm S. and Apiwatanapiwat W. (2009) **Bioethanol Production from Enzymatically Saccharified Sunflower Stalks Using Steam Explosion as Pretreatment.** *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering* **3**: 88–91.
- Van Zandvoort *et al.* (2013) Van Zandvoort I., Wang Y., Rasrendra C.B. et al. (2013) **Formation, molecular structure, and morphology of humins in biomass conversion: influence of feedstock and processing conditions.** *ChemSusChem* **6**: 1745–1758.
- Varga *et al.* (2004) Varga E., Réczey K. and Zacchi G. (2004) **Optimization of Steam Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzymatic Digestibility.** *Applied biochemistry and biotechnology* **114**: 509–524.
- Vidal *et al.* (2011) Vidal B.C., Dien B.S., Ting K.C. and Singh V. (2011) **Influence of feedstock particle size on lignocellulose conversion - a review.** *Applied biochemistry and biotechnology* **164**: 1405–1421.
- Vignon *et al.* (1995) Vignon M.R., Garcia-Jaldon C. and Dupeyre D. (1995) **Steam explosion of woody hemp chènevotte.** *International Journal of Biological Macromolecules* **17**: 395–404.
- Walker and Wilson (1991) Walker L.P. and Wilson D.B. (1991) **Enzymatic hydrolysis of cellulose An overview.** *Bioresource Technology* **36**: 3–14.
- Wan and Li (2012) Wan C. and Li Y. (2012) **Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Biotechnology advances* **30**: 1447–1457.
- Yang and Wyman (2006) Yang B. and Wyman C. (2006) **BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates.** *Biotechnology and bioengineering* **94**: 611–617.
- Wang *et al.* (2009) Wang K., Jiang J. X., Xu F. and Sun R. C. (2009) **Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (Lespedeza crytobotrya): Part 1. Characteristics of degraded cellulose.** *Polymer Degradation and Stability* **94**: 1379–1388.

- Yamamoto et al. (1990)* Yamamoto K., Asada T., Nishide H. and Tsuchida E. (1990) **The Preparation of Poly (dihydroxyphenylene) through the Electro-Oxidative Polymerization of Hydroquinone.** *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **63**: 1211–1216
- Yan et al. (2014)* Yan L., Zhang L. and Yang B. (2014) **Enhancement of total sugar and lignin yields through dissolution of poplar wood by hot water and dilute acid flowthrough pretreatment.** *Biotechnology for biofuels* **7**: 76-89.
- Yang and Wyman (2006)* Yang B. and Wyman C. (2006) **BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates.** *Biotechnology and bioengineering* **94**: 611–617.
- Yao et al. (2007)* Yao C., Shin Y., Wang L.Q. et al. (2007) **Hydrothermal Dehydration of Aqueous Fructose Solutions in a Closed System.** *The Journal of Physical Chemistry* **111**: 15141–15145.
- Yemis and Mazza (2011)* Yemis O. and Mazza G. (2011) **Acid-catalyzed conversion of xylose, xylan and straw into furfural by microwave-assisted reaction.** *Bioresource Technology* **102**: 7371–7378.
- Yuzhi et al. (2013)* Yuzhi K., Prabuddha B., Realf M.J. and Bommaris A.S. (2013) **SO₂ -catalyzed steam explosion: the effects of different severity on digestibility, accessibility, and crystallinity of lignocellulosic biomass.** *Biotechnology progress* **29**: 909–916.
- Zeitoun (2011)* Zeitoun R. (2011) **Procédés de fractionnement de la matière végétale - Application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé.** *Sciences des Agroressources*.
- Zeng et al. (2007)* Zeng M., Mosier N.S., Huang C.P., Sherman D.M. and Ladisch M.R. (2007) **Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis.** *Biotechnology and bioengineering* **97**: 265–278.
- Zhang et al. (2015)* Zhang B.Z., Zhang S.P., Zhao S.T., Xu Q.L. and Yan Y.J. (2015) **Conversion of Sweet Sorghum Bagasse Residue to Glucose by Dilute Acid Hydrolysis.** *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* **37**: 1688–1696.

- Zhang et al. (2016)* Zhang K., Pei Z. and Wang D. (2016) **Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: A review.** *Bioresource Technology* **199**: 21–33.
- Zhang and Lynd (2004)* Zhang Y.H.P. and Lynd L.R. (2004) **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** *Biotechnology and bioengineering* **88**: 797–824.
- Zhu et al. (2009)* Zhu J.Y., Wang G.S., Pan X.J. and Gleisner R. (2009) **Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification.** *Chemical Engineering Science* **64**: 474–485.
- Zhuang et al. (2017)* Zhuang J., Wang X., Xu J., Wang Z. and Qin M. (2017) **Formation and deposition of pseudo-lignin on liquid-hot-water-treated wood during cooling process.** *Wood Science and Technology* **51**: 165–174.
- Zuckerstätter et al (2009)* Zuckerstätter G., Schild G., Wollboldt P. et al. (2009) **The elucidation of cellulose supramolecular structure by ¹³C CP-MAS NMR.** *Lenzinger Berichte* **87**: 38–46.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Résumé

La revue bibliographique présentée dans le chapitre I a permis de dessiner les contours d'une approche méthodologique globale visant à approfondir la compréhension des phénomènes physico-chimiques ayant lieu au sein des outils de prétraitement par explosion vapeur et d'étudier leur impact sur la réactivité en hydrolyse enzymatique des substrats prétraités. Cette approche méthodologique requiert cependant un certain nombre d'expérimentations qui ont été réalisées soit dans un outil autoclave dans les laboratoires d'IFPEN sur le site de Lyon (étude de cuisson acide (cf. chapitre III) et étude sur les humines (cf. chapitre V)), soit dans un outil d'explosion vapeur en batch dans les laboratoires d'Agro-Bio Tech à l'université de Liège-Gembloux (cf. chapitre IV). Ces diverses expérimentations ont aussi nécessité de développer ou, dans certains cas, de valider des protocoles analytiques utiles à la caractérisation des biomasses utilisées et des substrats prétraités. Ce chapitre a donc pour but de décrire l'ensemble des matériels et des méthodologies expérimentales de prétraitement qui ont été utilisés durant la thèse. Les techniques analytiques de caractérisation étant directement liées à ces approches, la fin du chapitre est consacrée à la description des protocoles analytiques, notamment ceux utilisés pour déterminer la composition chimique des substrats et leur réactivité en hydrolyse enzymatique.

PLAN DU CHAPITRE

| | |
|---|------------|
| II.1. Introduction | 87 |
| II.2. Méthodologie expérimentale de cuisson acide..... | 88 |
| II.2.A. La cuisson acide..... | 88 |
| II.2.A.1. Description de l’outil | 88 |
| II.2.A.2. Imprégnation | 89 |
| II.2.A.3. Cuisson | 90 |
| II.2.B. Le post-traitement | 90 |
| II.2.B.1. Neutralisation de l’hydrolysate..... | 90 |
| II.2.B.2. Séparation du marc brut et du jus de cuisson..... | 91 |
| II.2.B.3. Lavage du marc brut afin de récupérer la fraction solide..... | 91 |
| II.3. Méthodologie expérimentale de détente explosive | 93 |
| II.3.A. La préparation du substrat par cuisson..... | 93 |
| II.3.A.1. Description de l’outil | 93 |
| II.3.A.2. Imprégnation et cuisson..... | 94 |
| II.3.A.3. Etapes intermédiaires | 94 |
| II.3.B. La détente explosive | 94 |
| II.3.B.1. Description de l’outil | 94 |
| II.3.B.2. Prétraitement..... | 96 |
| II.3.C. Post-traitement | 96 |
| II.4. Techniques de caractérisation des substrats lignocellulosiques | 97 |
| II.4.A. Caractérisation chimique | 97 |
| II.4.A.1. Analyse du jus | 97 |
| II.4.A.2. Hydrolyse acide du jus | 98 |
| II.4.A.3. Hydrolyse acide du marc lavé | 99 |
| II.4.A.4. Reconstitution du substrat | 100 |
| II.4.B. Caractérisation de la réactivité en hydrolyse enzymatique | 100 |
| II.4.B.1. Préparation du mélange réactionnel et démarrage du test..... | 101 |
| II.4.B.2. Suivi et arrêt du test | 101 |
| II.4.B.3. Analyses | 102 |
| II.4.C. Caractérisation avancée des marcs lavés..... | 102 |
| II.4.C.1. Préparation des échantillons | 102 |
| II.4.C.2. Caractérisations physiques et morphologiques | 103 |
| II.4.C.3. Caractérisation de la porosité : physisorption à l’azote | 104 |
| II.4.C.4. Caractérisation physico-chimique..... | 105 |
| II.5. Conclusion | 107 |
| II.6. Références | 109 |

II.1.Introduction

Afin de comprendre et prédire l'impact d'un prétraitement sur la composition et la morphologie des substrats lignocellulosiques et donc sur leur réactivité en hydrolyse enzymatique, une méthodologie expérimentale globale a d'abord été établie en préambule des études expérimentales

Ce chapitre vise donc à décrire, en premier lieu, les méthodologies de prétraitement (cuisson acide et explosion à la vapeur) qui ont permis de produire une grande variété de substrats aux caractéristiques physico-chimiques variées. Le second objectif est de préciser l'ensemble des techniques analytiques qui ont été sélectionnées pour caractériser ces substrats prétraités afin de comprendre la relation entre leur nature et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique. C'est le cas, par exemple, des techniques classiques de caractérisation de la biomasse (teneur en matière sèche, potentiel sucre par hydrolyse acide, etc...) mais aussi de techniques plus pointues comme la microscopie électronique à balayage, la physisorption d'azote, la granulométrie laser, etc... Le dernier objectif du chapitre consiste à expliciter le test d'hydrolyse enzymatique qui a été utilisé tout au long de la thèse et qui a permis de comparer la réactivité des substrats prétraités entre eux.

II.2.Méthodologie expérimentale de cuisson acide

Le prétraitement par explosion à la vapeur peut se découpler schématiquement en deux phases : une phase de vapocraquage et une phase de détente explosive. Afin d'explorer indépendamment ces deux phases, il a été choisi d'étudier dans un premier temps la phase de vapocraquage qui peut être assimilée à une cuisson acide (ou auto-hydrolyse en l'absence d'apport d'acide).

Dans le cadre de la thèse, différentes conditions opératoires de cuisson acide ont donc été appliquées sur différents substrats afin d'obtenir plusieurs échantillons ayant des caractéristiques différentes en termes de composition et/ou de réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Pour réaliser ces expérimentations, deux substrats lignocellulosiques ont été utilisés :

- une paille de blé (variété *Bermude* – blé tendre d'hiver) récoltée en 2014, dans le département de la Marne (51), prébroyée sur champ (50-100 mm) et pressée en balle avant stockage sous grange. Elle a ensuite été dépoussiérée et broyée grossièrement à 20 mm avant son envoi et utilisation à IFPEN.
- une pâte à papier blanchie fournie sous forme de pâte séchée (pâte de bois de feuillus) par le Laboratoire Génie des Procédés Papiers (LGP2, INP-Pagora, Grenoble).

De plus, dans le cadre de l'étude sur la formation des humines, trois substrats modèles ont aussi été sélectionnés afin de représenter les trois fractions majoritaires de la biomasse lignocellulosique : de la cellulose Avicel PH101 commandée chez Sigma-Aldrich, du xylane d'épis de maïs provenant de chez Roth ($\geq 95\%$ de xylooligosaccharides) et de la lignine commerciale de paille de blé, extraite par traitement alcalin, achetée auprès de Green Value SA (Protobind 1000).

II.2.A.La cuisson acide

II.2.A.1.Description de l'outil

L'unité U868, disponible à IFPEN sur le site de Lyon, est une unité pilote travaillant en batch et pouvant fonctionner à la pression maximale de 40 bar et à la température maximale de 250°C (Figure II.1). Son réacteur autoclave est constitué d'un corset métallique permettant de tenir la pression, à l'intérieur duquel se trouve une chemise amovible en hastelloy¹⁰ d'une capacité totale de 0.9 L (hauteur interne = 14.5 cm ; diamètre interne = 9 cm).

L'autoclave est chauffé puis maintenu à la température de consigne à l'aide de cartouches électriques situées dans les parois de l'autoclave (permettant de réguler la température de la phase liquide à l'aide d'un thermocouple plongé dans le mélange réactionnel) et dans la bride supérieure (permettant de réguler la température de la phase gaz à l'aide d'un thermocouple situé dans le ciel gazeux). Un manomètre permet aussi de suivre la pression dans l'autoclave. A la fin de l'expérimentation, l'autoclave est refroidi grâce à un vortex d'air passant entre la chemise et le corset métallique. Le refroidissement est régulé par le thermocouple mesurant la température de la phase

¹⁰ Superalliage contenant principalement du nickel, mais aussi plusieurs métaux comme le chrome, le magnésium, le fer et le titane. Il est extrêmement résistant à la corrosion même pour des températures de plus de 800°C.

liquide. Le milieu réactionnel est agité grâce à un agitateur mécanique ayant la forme d'une ancre. La vitesse maximale d'agitation est de 400 tr/min.

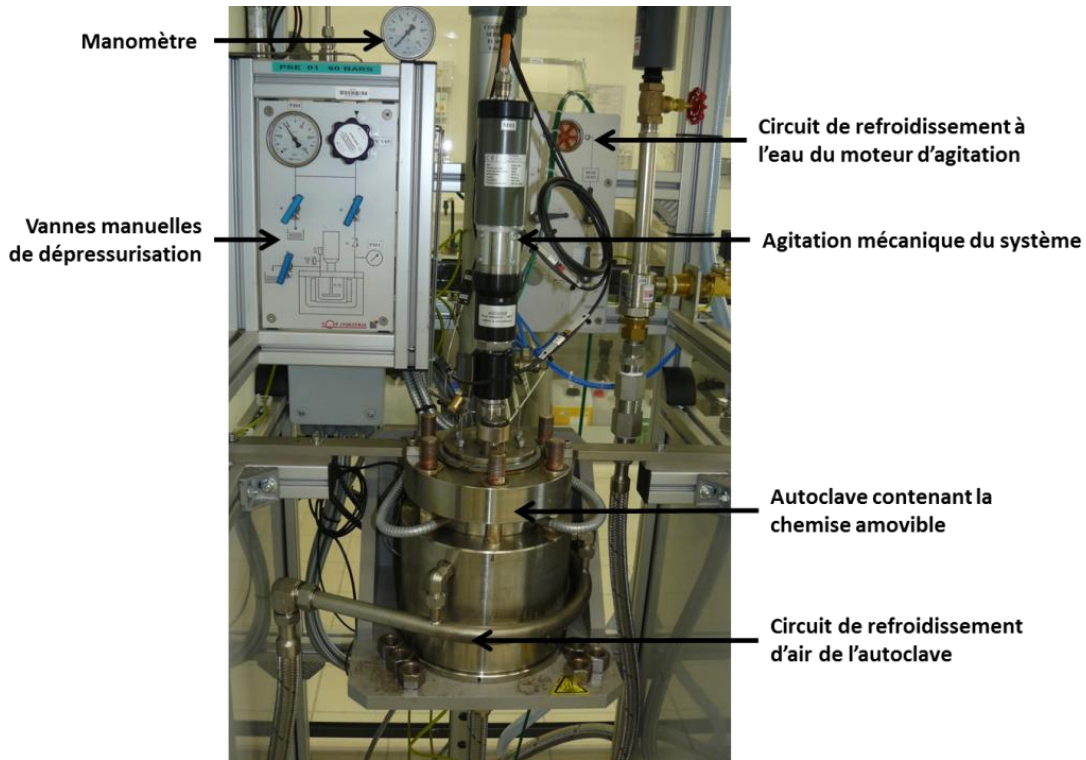


Figure II.1 : Photographie de l'unité de cuisson U868

L'outil possède également un coffret de contrôle composé d'un jeu de commandes Fuji (mise en marche de l'alimentation générale, de l'agitation et de la chauffe) et d'un écran tactile permettant d'introduire et de suivre les consignes d'essai. Les profils de température et de pression peuvent aussi être récupérés informatiquement.

II.2.A.2.Imprégnation

Les cuissons acides réalisées durant la thèse ont toutes été effectuées en présence d'acide sulfurique. Avant le démarrage de l'essai, une liqueur d'imprégnation est donc préparée à partir d'acide sulfurique à 72 %pds (LCH Chimie). La concentration de la liqueur, préparée indépendamment pour chaque essai, est vérifiée par dosage acido-basique.

Le volume total disponible dans la chemise de l'unité étant de 0.9 L, la masse maximale du mélange réactionnel est fixée à 400 g (substrat + liqueur d'imprégnation) afin de conserver un ciel gazeux et garantir une bonne homogénéisation du mélange durant la cuisson. La teneur en matière sèche du mélange est adaptée selon le substrat étudié et sera donc précisée dans chaque chapitre expérimental.

Une fois le mélange réactionnel préparé, l'ensemble est pesé exactement et le pH initial du mélange est noté. La chemise est ensuite introduite dans le corset du réacteur, l'ensemble est fermé hermétiquement et l'agitation est lancée à $100 \text{ tr} \cdot \text{min}^{-1}$ durant 15 h à température ambiante afin

d'assurer une bonne imprégnation lorsque cela se révèle nécessaire (paille de blé notamment qui nécessite plusieurs heures pour être parfaitement imbibée par la liqueur).

II.2.A.3.Cuisson

Après la phase d'imprégnation, l'agitation est augmentée à 300 tr.min⁻¹ pour garantir une bonne homogénéisation du mélange lors de l'étape de cuisson. Le système de chauffe est aussi mis en marche pour atteindre la température de consigne. Pour cette unité, la montée et la descente en température sont respectivement d'environ +12°C.min⁻¹ et -10°C.min⁻¹. Le temps de séjour est calculé comme étant la durée de cuisson à la température de consigne ; les temps de montée et de descente en température ne sont donc pas pris en compte.

L'évolution de la température et de la pression est enregistrée, ce qui permet de calculer le facteur de sévérité pour chaque essai grâce à une formule qui intègre l'ensemble du profil de température durant la cuisson (montée et descente de température comprises) :

$$\text{Equation II.1 : } F_0 = \log_{10} \left(\sum_i \Delta t \cdot e^{\frac{(T_i - T_{ref})}{14.75}} \right) - pH$$

avec : Δt : pas de temps entre l'acquisition de deux températures, équivalent à 0.08 min pour l'unité U868

T_i : température de cuisson en °C à l'instant i

T_{ref} : température de référence fixée arbitrairement à 100°C pour l'ensemble des essais

pH : pH du mélange réactionnel (considéré comme constant durant la cuisson)

A la fin de la cuisson et après refroidissement via le vortex d'air comprimé, la chemise est sortie de l'autoclave. Le poids total est à nouveau pesé et le pH est remesuré. Il est alors possible de déterminer un pourcentage massique de perte avant/après réaction par la formule suivante :

$$\text{Equation II.2 : } \text{Perte} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

avec : m_0 : masse de la chemise à vide (g)

m_1 : masse de la chemise + paille + liqueur d'imprégnation (g) avant réaction

m_2 : masse de la chemise + substrat brut prétraité + jus C5 (g) après réaction.

II.2.B.Le post-traitement

II.2.B.1.Neutralisation de l'hydrolysate

Afin de stopper complètement l'hydrolyse chimique du substrat et pour des raisons de sécurité, l'hydrolysate obtenu après cuisson est neutralisé à pH 4.8 à l'aide d'une sonde pH-métrique en introduisant de la soude 2N (NaOH 2N, Sigma Aldrich). La chemise est ensuite pesée afin de prendre en compte la quantité de soude ajoutée dans les calculs du bilan matière.

II.2.B.2.Séparation du substrat brut et du jus de cuisson

La séparation du substrat brut et du jus de cuisson a pu être réalisée par deux techniques différentes de séparation, soit par toile puis centrifugation, soit par filtration Büchner.

En ce qui concerne la séparation par centrifugation, le mélange réactionnel est filtré sur une toile qui permet de récupérer la majeure partie du substrat brut d'une part et le jus d'autre part. Le jus obtenu est ensuite utilisé pour laver la chemise et est filtré à nouveau à travers la toile. Finalement la toile contenant le substrat filtré est centrifugée à 3300 g durant 20 min. Le jus résiduel obtenu est ajouté au jus de cuisson issu de la première filtration.

La séparation du substrat brut et du jus de cuisson peut aussi être effectuée à l'aide d'une filtration Büchner. L'hydrolysate de cuisson est alors filtré sur un filtre quartz de 11 µm. Le jus obtenu sert à nouveau au lavage de la chemise puis est refiltré.

Cette étape de séparation pouvant conduire à des pertes de matière, un pourcentage de perte avant et après la séparation est calculé grâce à la formule suivante :

$$\text{Equation II.3 : Perte} = \frac{(m_3 - m_0) - (m_{\text{subs}} - m_{\text{jus}})}{(m_3 - m_4)} \times 100$$

avec : m_0 : masse de la chemise vide (g)

m_{subs} : masse de substrat prétraité récupéré (g)

m_{jus} : masse de jus de cuisson récupéré (g)

m_3 : masse de la chemise après neutralisation (g)

m_4 : masse de la chemise après la récupération de l'hydrolysate (g)

II.2.B.3.Lavage du substrat brut afin de récupérer la fraction solide

Le substrat brut est lavé afin d'éliminer les composés solubles encore présents dans son jus résiduel. Comme pour la séparation solide/liquide vue précédemment, deux techniques d'extraction ont été utilisées : soit l'extraction à l'aide d'un appareil Dionex ASE 150, soit à l'aide d'un appareil Soxhlet.

Le Dionex ASE 150 est équipé d'une cellule en zirconium de 100 mL et permet de réaliser des cycles de lavage à l'eau chaude. La cellule est remplie au $\frac{3}{4}$ avec le substrat brut. Chaque cycle comprend le remplissage de la cellule avec le solvant sous pression (eau distillée ici), l'extraction en mode statique à la température choisie (40°C), la vidange de la cellule, le rinçage de la cellule avec un volume de solvant choisi (15 et 66 % du volume de la cellule) et l'injection d'azote sous pression pour éliminer le solvant résiduel.

Le Soxhlet est une autre technique d'extraction basée sur un cycle continu d'évaporation/condensation du solvant dans le jus de lavage. Une cartouche en papier filtre est remplie au $\frac{3}{4}$ avec le substrat brut et 250 mL d'eau déionisée est introduite dans le ballon. Le ballon est ensuite chauffé à 100°C et le cycle de lavage est enclenché durant 24 heures.

Ces deux techniques permettent de laver totalement le substrat brut et de récupérer uniquement la fraction solide. Elles permettent aussi de déterminer un rendement de lavage qui va correspondre à

la différence de poids entre le substrat brut non lavé sec et le substrat lavé sec (fraction solide). A partir des masses de jus récupéré et de substrat brut ainsi que du rendement de lavage du substrat, il est possible de reconstituer un bilan massique complet de l'opération de cuisson acide.

II.3.Méthodologie expérimentale de détente explosive

La cuisson acide détaillée précédemment peut être vue comme la première étape du prétraitement par explosion à la vapeur. Une autre étude réalisée durant la thèse a consisté à étudier la détente explosive de manière indépendante. Pour cela, des échantillons de cuisson acide ont subi des détonations explosives à plusieurs échelles de pression (de 7 à 22 bar) dans un outil d'explosion batch. Le but ici était de vérifier si la bonne compréhension des phénomènes ayant lieu durant la cuisson chimique et des phénomènes ayant lieu durant la détente explosive permettait d'appréhender correctement le prétraitement par explosion vapeur dans sa globalité. En ce qui concerne l'outil d'explosion à la vapeur, il a été choisi d'expérimenter ce type d'approche à l'Université d'Agro-Bio Tech à Gembloux (Belgique) car l'IFPEN ne possède pas ce type d'outil. Cependant, deux contraintes majeures ont dû être levées. Tout d'abord, l'outil d'explosion à la vapeur disponible à Gembloux ne peut pas contenir de charges acides pour des raisons de corrosion propres à l'unité. Il est donc nécessaire de précuire le substrat lignocellulosique dans un outil distinct de cuisson avant de faire une neutralisation pour pouvoir utiliser le substrat lavé et neutralisé dans l'outil d'explosion. De plus, il est nécessaire d'alimenter l'outil d'explosion avec un minimum de 500 g sec de substrat. Or, comme il est impossible de produire une telle quantité dans l'unité U868 (40 g par batch au mieux), le choix a été fait de précuire les substrats à l'Université d'Agro-Bio Tech de Gembloux qui disposait, en plus de l'outil d'explosion, d'un outil de cuisson acide de grande taille (8 L).

II.3.A.La préparation du substrat par cuisson

II.3.A.1.Description de l'outil

L'outil de cuisson utilisé pour cette étape est un autoclave Parr de série 4530 (Figure II.2). L'autoclave est composé d'un corset chauffant en fibre de céramique dans lequel est insérée une chemise amovible en titane d'un volume de 8 L (hauteur interne = 44 cm; diamètre interne = 15.2 cm). Pour cette unité, le système de refroidissement se fait à l'aide d'un serpentín d'eau placé directement dans le milieu réactionnel. L'agitation est assurée par un agitateur composé de deux disques à 6 pales inclinées. Le premier se trouve à 30 cm de la tête du réacteur et le second se trouve à 9 cm en dessous du premier. L'autoclave est fermé hermétiquement à l'aide d'un collier qui maintient la tête du réacteur avec l'autoclave. Un moniteur de contrôle permet d'obtenir les données de température et de pression au cours du temps.

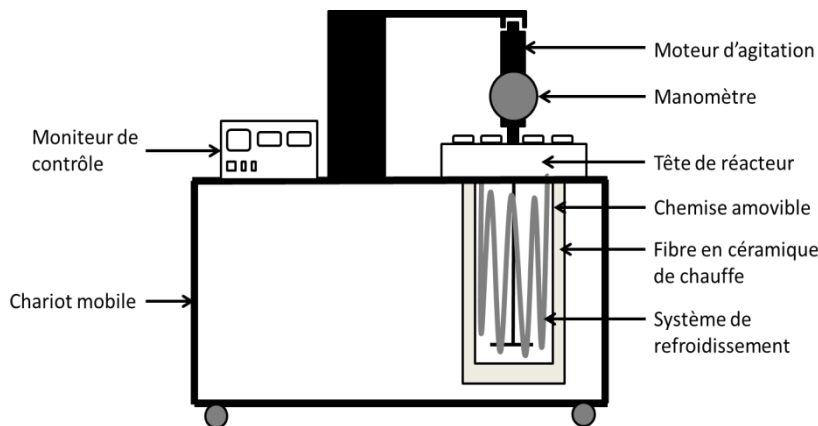


Figure II.2 : Représentation schématique de l'unité autoclave Parr 4530

II.3.A.2.Imprégnation et cuisson

Comme pour la cuisson acide sur l'unité U868 décrite précédemment, une liqueur d'imprégnation est préparée à partir d'acide sulfurique à 72 %pds (LCH Chimie). La concentration de la liqueur produite pour chaque essai est vérifiée par dosage acido-basique.

Le volume total de la chemise de l'unité étant de 8 L, la masse maximale du mélange réactionnel a été fixée à 3330 g (substrat + liqueur d'imprégnation) et le chargement en matière sèche à 7.5 %pds afin de conserver un ciel gazeux et garantir une bonne homogénéisation du mélange durant la cuisson.

Le mélange réactionnel est réalisé la veille de l'essai dans un seau, l'ensemble est pesé exactement et le pH initial du mélange est noté. Après 15 h d'imprégnation, le mélange réactionnel est introduit dans la chemise, l'unité est fermée hermétiquement, l'agitation est lancée à 300 tr.min⁻¹ et la température de prétraitement est fixée à la consigne du test. Pour cette unité, la montée et la descente en température sont respectivement d'environ +4°C.min⁻¹ et -12°C.min⁻¹. Comme pour l'unité U868, le temps de séjour est calculé à partir du moment où la température du mélange réactionnel atteint la consigne de température. L'acquisition des données au cours du temps permet cependant de définir le facteur de sévérité pour chaque essai qui tient compte aussi des montées et des descentes en température (Equation II.1).

II.3.A.3.Etapes intermédiaires

Après cuisson, le mélange réactionnel est neutralisé à pH 7 à l'aide de soude (NaOH 2N). Il est ensuite introduit dans uneessoreuse Rousselet-Robatel, à axe vertical en rotation, équipée d'une toile filtrante (50-100 µm). Sous l'effet de la force centrifuge, le jus est filtré et la toile retient les particules solides. Le solide forme alors un gâteau et le jus de cuisson est évacué par les trous du panier perforé. Le lavage du substrat se fait par l'introduction de 12 litres d'eau en 3 fois dans l'essoreuse toujours en rotation. Le liquide de rinçage traverse le gâteau solide et permet d'éliminer la majorité des composés solubles présents. Après l'étape de lavage, le système est maintenu sous rotation durant 10 min afin d'éliminer les eaux résiduelles. Le déchargement du gâteau se fait par dépotage manuel par le haut.

II.3.B.La détente explosive

II.3.B.1.Description de l'outil

La détente explosive est réalisée dans un équipement pilote conçu par le département de Chimie Biologie Industrielle-ULG-Gembloux Agro-Bio Tech (*Jacquet (2012)*) (Figure II.3).



Figure II.3 : Photographie de l'unité pilote d'explosion à la vapeur du département de Chimie Biologie Industrielle-ULG-Gembloux

Ce pilote (Figure II.4) se compose d'un générateur de vapeur (pression maximale = 60 bar), d'un réacteur de 50 litres permettant d'atteindre une pression maximale de 51 bar et d'un éclateur cyclonique où le produit explosé est séparé de la vapeur et récupéré. Une vanne d'éclatement ($\varnothing = 4$ cm) située entre le réacteur et l'éclateur permet de diminuer fortement la pression en libérant rapidement la vapeur et de donner l'effet de détente explosive.

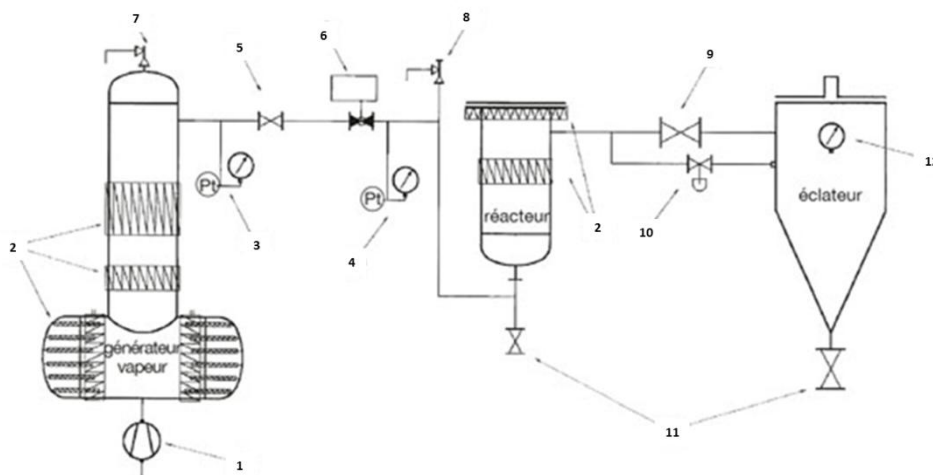


Figure II.4 : Schéma général du pilote d'explosion à la vapeur du département de Chimie Biologie Industrielle-ULG- Gembloux (Jacquet et al. (2012))

- (1. Pompe haute pression / 2. Colliers chauffants / 3. Mesure de pression et de température du générateur / 4. Mesure de pression et de température du réacteur / 5. Vanne d'isolement / 6. Vanne de mise en charge / 7. Soupape de sécurité du générateur / 8. Soupape de sécurité du réacteur / 9. Vanne d'éclatement / 10. Vanne de purge lente / 11. Vanne de récupération des produits / 12. Manomètre éclateur)

II.3.B.2.Prétraitement

Après la première étape du prétraitement (cuisson acide + lavage du substrat brut), environ 600 g de substrat précuit, neutralisé et lavé sont introduits dans le réacteur, cette quantité étant le produit de deux cuissons réalisées dans le réacteur Parr à des conditions opératoires identiques. La vanne de mise en charge est ensuite ouverte afin d'introduire la vapeur d'eau et d'atteindre la pression de consigne au sein du réacteur. Quand la pression est atteinte, la vanne de charge est fermée puis la vanne d'éclatement est ouverte afin de pratiquer la détente explosive. Le mélange contenant le substrat explosé et le condensat est récupéré à la sortie de l'éclateur. L'ensemble est ensuite stocké en chambre froide pour être post-traité.

II.3.C.Post-traitement

Comme dans le cas des cuissons acides, un post-traitement est effectué pour séparer le condensat du substrat explosé. Le mélange issu de la détente explosive est donc filtré sur Büchner avec un filtre quartz 11 µm. Le substrat brut récupéré est lavé à l'aide de l'outil Dionex ASE 150.

II.4. Techniques de caractérisation des substrats lignocellulosiques

II.4.A. Caractérisation chimique

Un substrat lignocellulosique, natif ou prétraité, est potentiellement composé de deux fractions : une fraction solide (appelé substrat lavé dans ce mémoire) et une fraction liquide (appelé jus ici) obtenue par extraction solide/liquide et lavage. Le substrat lavé et le jus peuvent ensuite être caractérisés *a minima* par leur teneur en matière sèche et leurs teneurs en sucres (glucose, xylose, arabinose, galactose, mannose) sous leurs différentes formes (polymérique, oligomérique soluble, monomérique et dégradée). Pour ce faire, il est nécessaire de réaliser un post-traitement poussé de la biomasse en supposant que le substrat lavé ne contient que des sucres sous leur forme polymérique et que le jus ne contient que des produits solubles, c'est-à-dire les sucres monomériques, les produits de dégradation de ces derniers (5-HMF et furfural), les acides organiques, mais aussi les sucres oligomériques solubles dans l'eau. L'analyse du substrat lavé et du jus permet donc, sur cette base, de reconstituer le substrat lignocellulosique complet et d'en déterminer sa composition (Figure II.5).

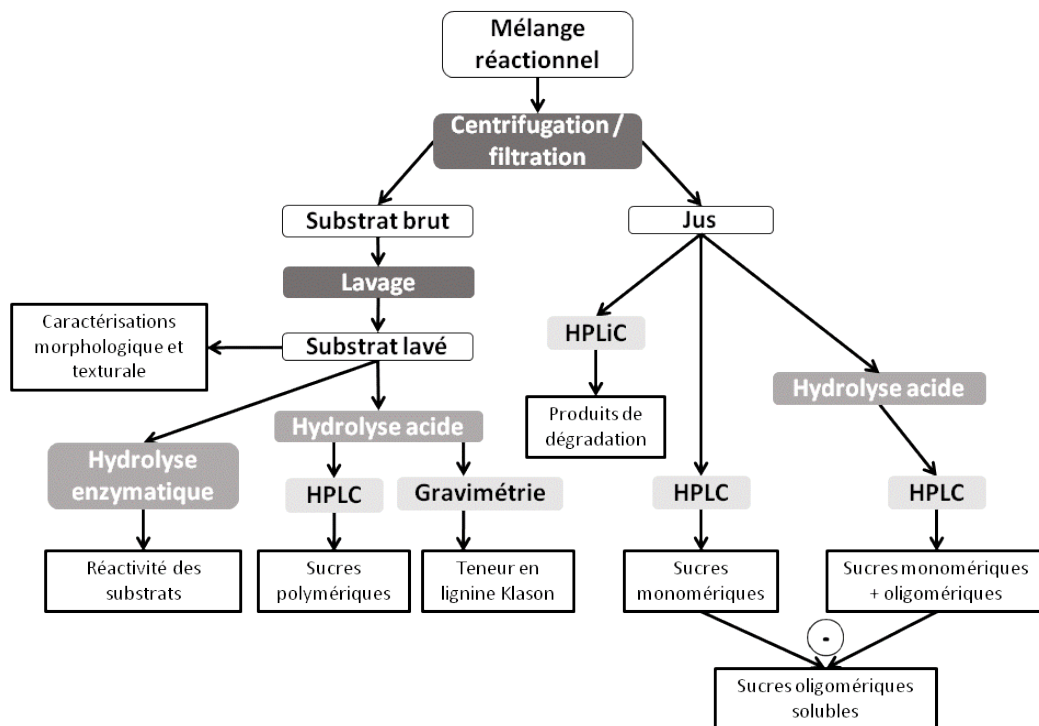


Figure II.5 : Méthodologie de caractérisation des substrats

II.4.A.1. Analyse du jus

L'analyse directe du jus de cuisson est réalisée par chromatographie liquide (HPLC) et par chromatographie liquide ionique (HPLiC) et va permettre de quantifier, respectivement, la quantité de chaque sucre (glucose, xylose, arabinose, galactose, mannose) sous leur forme monomérique, ainsi que les produits de dégradation (5-HMF et furfural) et les acides organiques.

II.4.A.1.a. Dosage des sucres monomériques par HPLC

Avant de réaliser l'analyse du jus, l'échantillon est tout d'abord filtré à l'aide d'un filtre-seringue de 0.2 µm afin d'éliminer toute trace de fines résiduelles. Les sucres monomériques présents dans le jus sont alors dosés à l'aide d'un appareil de chromatographie liquide (HPLC) utilisant une colonne contenant une résine échangeuse de cations Pb^{2+} . Dans cette approche, une colonne Metacarb 87P de la marque Agilent (300 × 7.8 mm) est ainsi utilisée et maintenue à 85°C. Les sucres sont élués de façon isocratique à l'aide d'eau ultra-pure et détectés en sortie par un réfractomètre. Un étalonnage externe permet de connaître l'ordre d'éluion des produits (cellobiose > glucose > xylose > galactose > arabinose > mannose > glycérol > xylitol > sorbitol) ainsi que leur concentration absolue. L'ensemble des échantillons est maintenu à 4°C dans le passeur, le volume d'injection est fixé à 20 µL et le débit à 0.4 mL/min. La quantification des sucres est effectuée par intégration de la surface des pics et le résultat final est exprimé en $g.kg^{-1}$.

II.4.A.1.b. Dosage des produits de dégradation par HPLiC

Les acides organiques et les produits de dégradation (5-HMF et furfural) sont dosés par chromatographie sur colonne ionique (HPLiC). Dans cette approche, une colonne Prevail Organic Acid 5 µm (250×4.6 mm) est utilisée et maintenue à 35°C. Dans un premier temps, les acides sont élués de manière isocratique à l'aide d'une phase mobile acidifiée avec de l'acide phosphorique. Cette phase mobile permet d'obtenir les acides sous leur forme protonique. L'ordre d'éluion est le suivant : acide formique, acide acétique et acide lévulinique. Après 15 min d'éluion, un gradient d'acétonitrile est progressivement mis en place sur une période de 25 min jusqu'à atteindre une proportion volumique de 50/50 (2 % volume/minute). Durant ce gradient, le 5-HMF puis le furfural sont élués. Finalement le gradient passe d'une proportion volumique de 50/50 en acétonitrile à 100 % d'eau acidifiée en 5 min puis la colonne est nettoyée et stabilisée en mode isocratique durant 10 min. L'ensemble des composés est détecté à l'aide d'un détecteur UV à barrette de diodes. Les acides sont détectés à 210 nm de longueur d'onde alors que le 5-HMF et le furfural sont détectés à 280 nm. Les quantités des différents composés présents dans le jus sont exprimées en g/kg.

II.4.A.2. Hydrolyse acide du jus

L'hydrolyse acide d'un produit permet de déterminer un potentiel en sucres en effectuant une dépolymérisation totale des différents polysaccharides présents. Le protocole mis en place ici est inspiré de l'hydrolyse acide d'un substrat lignocellulosique décrit par le *NREL (2008)*.

Pour opérer l'hydrolyse acide d'un jus, il est tout d'abord nécessaire de déterminer sa teneur en matière sèche (MS). Pour cela, une balance micro-ondes CEM Start System 5 disponible au laboratoire est utilisée. Une fois la teneur en matière sèche du jus déterminée, l'hydrolyse acide en tant que telle peut commencer. Elle est réalisée dans des flacons Schott Duran de 100 mL en doublon. Dans chaque flacon est introduit l'équivalent de 300 mg MS de solide, 4.92 g d'acide sulfurique à 72 % pds et un volume d'eau distillé permettant d'obtenir un poids total de 89 g (soit une concentration finale en acide sulfurique de 4 % pds).

Le flacon est ensuite placé dans un stérilisateur Systec DX23 à 121°C durant 60 min. Après refroidissement complet, le filtrat est récupéré puis neutralisé à pH 4.8 avec de la soude 2N (NaOH 2N) à l'aide d'un titreur automatique. La quantité globale de filtrat est mesurée, avant et après

neutralisation, afin de tenir compte de la dilution occasionnée par l'ajout de soude. L'échantillon est ensuite analysé en chromatographie liquide pour doser les sucres (cf. II.4.A.1.a).

Le potentiel de chaque sucre (P_S) en $g \cdot 100g^{-1}$ de MS est finalement déterminé de la façon suivante :

$$\text{Equation II.4 : } P_S = \frac{C_S}{K_S} \cdot \frac{m_1}{m_0 \cdot \frac{\%ms}{100}} \cdot 100$$

avec : C_S : concentration d'un sucre (glucose, xylose, arabinose, mannose, galactose) mesurée dans les hydrolysats acides produits

m_0 : masse humide d'échantillon introduit (g)

$\%ms$: teneur en ms de l'échantillon

m_1 : masse totale de l'hydrolysat obtenu (g).

K_S : coefficient d'extinction du sucre qui correspond à la fraction du sucre non dégradée par l'étape d'hydrolyse acide.

Le coefficient d'extinction pour chaque sucre a été déterminé par hydrolyse acide d'un jus sucré, aux teneurs connues, afin de mesurer la perte en sucres due aux réactions de dégradation. Les coefficients obtenus sont fournis dans le tableau suivant :

| Sucre | Glucose | Xylose | Galactose | Arabinose | Mannose |
|-------|---------|--------|-----------|-----------|---------|
| K_S | 0.96 | 0.87 | 0.94 | 0.94 | 0.96 |

II.4.A.3. Hydrolyse acide du substrat lavé

Le substrat lavé peut aussi subir une étape d'hydrolyse acide pour déterminer son potentiel en chaque sucre. Cependant, à l'inverse de l'hydrolyse acide de jus, cette détermination nécessite une hydrolyse acide en 2 étapes selon le protocole décrit par le NREL (2008).

L'hydrolyse acide du solide doit tout d'abord être réalisée sur un substrat ayant un taux d'humidité inférieur à 10 %pds et une granulométrie inférieure à 1.0 mm. Le substrat lavé est donc placé à l'étuve durant 24 h à 105°C, puis broyé au broyeur à couteaux Retch sur une grille de 1 mm. Le taux de matière sèche est ensuite déterminé par simple pesée.

Comme pour l'hydrolyse du jus, l'hydrolyse acide du substrat lavé est réalisée en doublon dans des flacons Schott Duran de 100 mL dotés d'un barreau magnétique permettant l'agitation. Pour la première étape de l'hydrolyse, 300 mg MS de substrat lavé sont introduits dans un flacon puis 4.92 g d'acide sulfurique à 72 %pds sont ajoutés. Le flacon est placé sous agitation magnétique dans un bain-marie thermostaté à 30°C durant 60 min. Dans la seconde étape, l'ensemble est dilué avec 84 mL d'eau déionisée (soit une concentration finale en acide de 4 %pds). Le flacon est finalement introduit dans un stérilisateur Systec DX23 à 121°C durant 60 min.

Après refroidissement, l'hydrolysat est centrifugé à 3300 g durant 20 min afin de séparer la fraction solide résiduelle. Le filtrat est récupéré puis neutralisé à pH 4.8 avec de la soude (NaOH 2N) à

l'aide d'un titreur automatique. La quantité de filtrat est pesée avant et après neutralisation afin de tenir compte de la dilution apportée par l'ajout de soude. Le potentiel de chaque sucre est déterminé de la même façon que pour l'hydrolyse acide de jus (cf. § II.4.A.1).

La teneur en résidu solide (lignine Klason) peut également être déterminée, en mettant en suspension avec de l'eau déionisée, le solide résiduel culoté après centrifugation. L'ensemble est filtré sur un filtre nylon de 11 μm . Le résidu est ensuite lavé avec 250 mL d'eau déionisée. Après séchage du filtre et du résidu solide, il est ainsi possible d'accéder à la teneur en résidu solide par gravimétrie.

II.4.A.4.Reconstitution du substrat

L'ensemble des techniques de caractérisation des substrats lavés et des jus vues précédemment ainsi que les méthodologies expérimentales détaillées précédemment permettent de reconstituer le mélange réactionnel complet et de déterminer sa composition globale. L'analyse des jus en HPLiC et HPLC permet de quantifier respectivement les produits de dégradation et les sucres présents sous leur forme monomérique. La quantité de sucres sous leur forme oligomérique soluble est déterminée par hydrolyse acide du jus après soustraction des sucres monomériques. Finalement l'hydrolyse acide du substrat lavé permet de quantifier la quantité des sucres sous leur forme polymérique. Par bilan matière, il est alors possible de déterminer, pour chacun des sucres principaux (glucose, xylose, galactose, arabinose et mannose), leur quantité et leur répartition sous leur forme polymérique, oligomérique soluble, monomérique et dégradée.

II.4.B.Caractérisation de la réactivité en hydrolyse enzymatique

L'objectif du test d'hydrolyse enzymatique consiste à comparer la digestibilité relative des substrats lavés les uns par rapport aux autres.

Ce test est réalisé dans un équipement STEM dans lequel sont insérés des flacons Schott de 100 mL dotés d'un barreau d'agitation magnétique en forme de croix. Les conditions opératoires retenues pour obtenir une bonne performance en hydrolyse enzymatique et une bonne reproductibilité sont les suivantes :

- Température : 50°C
- pH : 4.8
- Concentration en solide : m_0 g de substrat équivalent à 0.7 g de cellulose
- Concentration en enzymes : GC220 à 6 mg de protéine par g de cellulose et N188 à 18 mg de protéine de cellulose

Pour la détermination de la masse de substrat lavé m_0 , il est primordial de connaître le pourcentage en matière sèche ainsi que le pourcentage en cellulose du substrat. Ce point est réalisé en effectuant l'hydrolyse acide du substrat lavé.

Pour réaliser l'ensemble des tests standards d'hydrolyse enzymatique, plusieurs produits ont été utilisés. Le maintien du pH à 4.8 (pH optimal d'hydrolyse) a été géré à l'aide d'un tampon commercial d'acétate à 50 mmol.L^{-1} (Sigma Aldrich). Les risques de contamination biologique ont été réduits en utilisant une solution d'azoture de sodium à 10 g.L^{-1} , elle-même préparée à partir d'azoture de sodium anhydre (Sigma Aldrich, pureté $\geq 99.0\%$). Enfin l'hydrolyse enzymatique en tant que telle a été réalisée à l'aide de deux cocktails enzymatiques commerciaux : le cocktail GC200 et le cocktail N188. Les caractéristiques de ces cocktails enzymatiques sont détaillées ci-dessous.

Tableau II.1 : Caractéristiques des cocktails enzymatiques

| | GC220 | N188 |
|---|-------------|-----------------------|
| Fournisseur | Genecor | Novozyme |
| N°Lot | 491121-1718 | DCN00214 |
| Enzymes dominantes | Cellulases | β -glucosidases |
| Densité (g.cm³⁻¹) | 1.152 | 1.206 |
| Concentration (g de protéine.L⁻¹) | 187 | 184 |
| Activité FPase¹¹ ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) | 1.2 | 0.1 |
| Activité β-glucosidases¹² ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) | 2.1 | 2 |

II.4.B.1.Préparation du mélange réactionnel et démarrage du test

Dans un flacon Schott de 100 mL est introduite une quantité de substrat lavé correspondant à 0.7 g de cellulose, 3.5 mL de tampon acétate à 1 M (tampon de pH 4.5), 7 mL de solution d'azoture de sodium (10 g.L⁻¹) et un complément en eau distillée pour obtenir une masse totale de mélange de 70 g. La solution de tampon acétate présente dans le milieu permet le maintien approximatif du pH du milieu sans contrôle particulier alors que l'azoture de sodium, qui est un biocide, empêche le développement potentiel des microorganismes durant l'hydrolyse.

Pour chaque substrat lavé, l'hydrolyse enzymatique est réalisée en doublon. Après une période d'une nuit pour faciliter le « gonflement » du solide, la réaction d'hydrolyse enzymatique est démarrée à 50°C en introduisant les cocktails enzymatiques adéquats :

- 23 μL de cocktail GC220 (6 mg de protéine par g de cellulose).
- 70 μL de cocktail N188 (18 mg de protéine par g de cellulose).

II.4.B.2.Suivi et arrêt du test

Le suivi de l'hydrolyse enzymatique est réalisé en prélevant 1 mL du mélange réactionnel à différents temps après l'injection des enzymes ($t=1.5, 3, 6, 24, 48, 72$ et 144 h). Avec l'augmentation de la concentration en glucose au cours du temps, une dilution par deux est effectuée pour les prélèvements à 24, 48 et 72 h et une dilution par trois pour le prélèvement à 144h avant de réaliser le dosage du glucose à l'aide d'un glucostat YSI 2700 (cf. § II.4.B.3). Un contrôle de la température et du pH est aussi réalisé au début de l'essai.

Pour chaque prélèvement et afin de stopper la réaction enzymatique, les échantillons sont plongés dans un bain-marie à 90°C durant 10 min. Après refroidissement complet, les échantillons

¹¹ FPU : unité papier filtre, 1FPU correspond à la quantité de glucose libérée par minute et par mg d'enzymes dégradant du papier filtre dans les conditions standards du test.

¹² CBU : unité activité β -glucosidases, 1 CBU correspond à la quantité de glucose libérée par minute et par mg d'enzymes dégradant du cellobiose dans les conditions standards du test

sont centrifugés à 3300 g durant 20 min et le surnageant est prélevé pour doser la concentration en glucose.

II.4.B.3. Analyses

La détermination de la teneur en glucose tout au long du test d'hydrolyse enzymatique est réalisée à l'aide d'un analyseur YSI 2700. Cet analyseur mesure directement la quantité de D-glucose grâce à une sonde enzymatique contenant l'enzyme glucose-oxydase. Cette réaction conduit à la formation d'eau oxygénée qui va être oxydée au niveau d'une électrode au platine. Le courant produit est alors proportionnel à la concentration en glucose. La mesure est réalisée en doublon pour chaque échantillon.

La détermination du rendement final en glucose et en autres sucres est réalisée par HPLC uniquement à la fin de l'hydrolyse enzymatique à 144h. Pour déterminer ce rendement, il est nécessaire de connaître le potentiel de chaque sucre présent dans l'échantillon de substrat lavé. Le rendement en sucre (Rdt en %) est déterminé selon l'équation :

$$\text{Equation II.5 : } Rdt = \frac{C_S \cdot M_M}{M_S \cdot P_S} \cdot 100$$

avec : C_S : concentration d'un sucre (glucose, xylose, arabinose, mannose, galactose) mesurée dans l'hydrolysate (en $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

M_M : masse du mélange réactionnel initial (en g)

M_S : masse de substrat initial (en g de MS)

P_S : quantité d'un sucre libéré par hydrolyse acide du substrat lavé (en g.100g de MS^{-1})

II.4.C. Caractérisation avancée des substrats lavés

Les caractéristiques décrites précédemment permettent uniquement de définir la composition chimique des mélanges réactionnels en termes de sucres et la réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats lavés. Cependant des techniques de caractérisation plus avancées peuvent aussi être mises en œuvre afin de mieux comprendre l'impact du prétraitement sur la morphologie des substrats lignocellulosiques et donc sur leur réactivité en hydrolyse et cela en parallèle de leur composition chimique.

II.4.C.1. Préparation des échantillons

La caractérisation avancée des substrats natifs et des substrats prétraités lavés qui est maintenant présentée a été réalisée sur des produits lyophilisés. En effet, une étude réalisée par J. Passicouset (2018) a montré que le séchage des solides lignocellulosiques par lyophilisation est le conditionnement le plus adapté afin de ne pas modifier les propriétés physico-chimiques et structurales, à l'inverse du séchage à l'étuve.

La lyophilisation a été réalisée avec un EMITECH K775. Les échantillons préalablement congelés sont placés dans la chambre du lyophilisateur qui est ensuite mis sous vide pendant la descente en température. Les substrats sont ainsi maintenus environ 12 h à une température comprise entre -100 et -60°C afin de sublimer l'eau congelée. La remontée en température dure quelques

heures et permet la désorption lente de l'eau possiblement encore liée au solide. Lorsque la température a atteint la température ambiante, le vide est rompu sur une durée d'environ une minute. Les échantillons lyophilisés sont stockés dans un endroit sec à température ambiante.

II.4.C.2. Caractérisations physiques et morphologiques

II.4.C.2.a. Analyse morphologique : microscopie électronique à balayage (MEB)

Afin d'observer la macrostructure des substrats, un appareil MEB FEI Nova Nano SEM 450 a été utilisé après avoir déposé les échantillons sur un scotch carbone double face. Pour obtenir la meilleure résolution possible, différentes conditions opératoires ont été testées : soit les échantillons ont été analysés en mode haut vide, avec une tension d'accélération de 2 kV et un détecteur ETD (Everhart-Thornley), soit ils ont été analysés en mode *low vacuum*, avec une tension d'accélération de 3 kV et en utilisant un détecteur LVD (*Low Vacuum Detector*).

II.4.C.2.b. Distribution et taille des particules : granulométrie laser

La distribution et la taille des particules de substrats natifs ou de substrats lavés peuvent être déterminées par granulométrie à diffraction laser. Cet outil permet ainsi de connaître la distribution granulométrique d'un échantillon dont la taille est comprise entre environ 200 nm et 2 mm. Cette méthode d'analyse utilise le principe de diffusion (théorie de Mie) et/ou de diffraction de la lumière (théorie de Fraunhofer + théorie de Mie).

Un faisceau laser passe à travers un échantillon de particules dispersées. La quantité de lumière déviée et l'angle de déviation permettent de mesurer avec précision la taille des particules. En fonction du mode choisi (voie sèche ou voie humide), il est nécessaire d'adapter la méthode de dispersion de l'échantillon afin de ne pas modifier sa répartition granulométrique. Par voie humide, un module assure une agitation de la suspension en continu en amont du banc laser. Par voie sèche, la dispersion de l'échantillon est réalisée par l'injection d'air comprimé.

L'acquisition des données permet de représenter la distribution de la taille des particules, en volume ou en nombre (Figure II.6). Pour cette technique, les particules sont supposées sphériques, hypothèse critiquable dans le cas des échantillons de biomasse lignocellulosique. Toutefois, cette technique reste valable pour des approches comparatives et qualitatives. Les dispersions peuvent être de type multimodal ou monomodal. Dans le cas d'une dispersion monomodale, la Pharmacopée Européenne 7.0 (Méthode 2.9.31, 25) a défini des paramètres jugés pertinents afin de caractériser la distribution granulométrique d'un échantillon :

- $D_v(10)$, $D_v(50)$ et $D_v(90)$ correspondent respectivement aux diamètres en dessous desquels se situent 10, 50 et 90% du volume des particules
- $D_v[4.3]$ correspond au diamètre moyen en volume et est défini par :

$$\text{Equation II.6 : } D_v[4,3] = \frac{\sum_{j=1}^n V_j \cdot d_j}{\sum_{j=1}^n V_j}$$

- Span donne une indication sur la largeur de la distribution granulométrique :

$$\text{Equation II.7 : } \text{Span} = \frac{Dv(90) - Dv(10)}{Dv(50)}$$

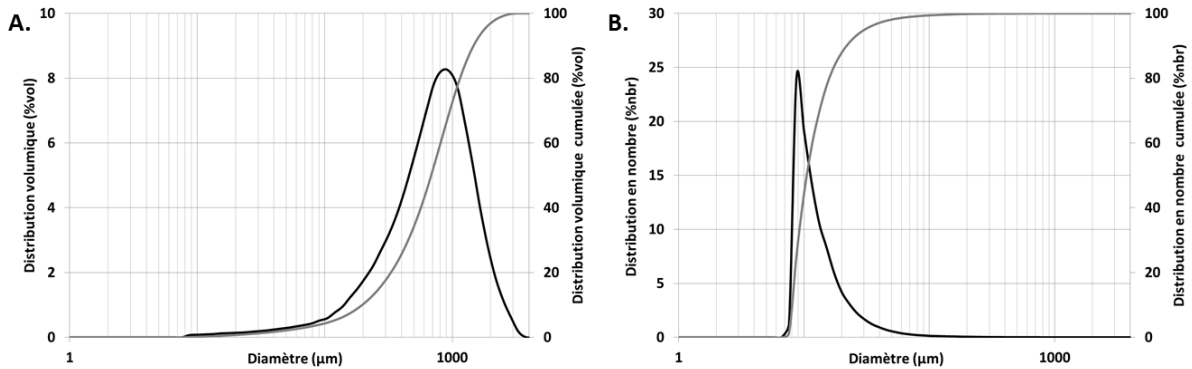


Figure II.6 : Distribution et distribution cumulée en volume (A) et en nombre (B) en fonction du diamètre des particules pour un échantillon de paille de blé prétraité à 140°C durant 60 min et 1% pds d'H₂SO₄

Dans le cadre de cette thèse, les substrats ont été analysés par un granulomètre à diffraction laser Malvern Mastersizer 3000 en mode voie sèche avec une dispersion des particules par injection d'air comprimé à 0.2 MPa. Les Dv(10), Dv(50), Dv(90), le span et le Dv4.3 ont été calculés à partir des données brutes.

II.4.C.3. Caractérisation de la porosité : physisorption à l'azote

La physisorption d'azote a été utilisée pour déterminer la porosité et la surface spécifique des substrats lignocellulosiques grâce à un appareil ASAP 2420 Micromeritics.

Dans un premier temps, l'eau résiduelle présente dans les échantillons a été éliminée par un prétraitement thermique doux sous vide de 30°C durant 120 min (même pour les échantillons préalablement lyophilisés car une reprise d'humidité est toujours possible). La montée et la descente en température se font en 15 min (soit 2°C.min⁻¹). L'échantillon est ensuite stabilisé à pression atmosphérique sous N₂.

Pour réaliser l'analyse, l'échantillon est amené à la température de l'azote liquide (-196°C) et sous pression (0.12 MPa). Ensuite plusieurs quantités connues d'azote sont successivement injectées dans la cellule forçant ce dernier à s'adsorber sur le substrat. Après chaque injection, la pression de la cellule diminue par adsorption jusqu'à ce que le système se mette à l'équilibre d'adsorption/désorption. La mesure des pressions d'équilibre P₀ effectuée en continu via un système relié au dispositif de mesure de pression. Les injections successives suivent une table de pression prédéfinie jusqu'à saturation (P/P₀ = 1) pour obtenir l'isotherme d'adsorption complète. Le système est ensuite purgé pas à pas pour accéder aux quantités restées adsorbées sur le solide et pour tracer l'isotherme de désorption. L'exploitation des mesures conduit aux calculs des différentes valeurs recherchées (S_{BET}, V_{total}, V_{micro}, V_{méso}) et aux tracés de différentes courbes d'intérêt (isotherme d'adsorption et de désorption, répartition poreuse, etc...) :

- la surface spécifique, S_{BET} , qui correspond aux surfaces interne et externe du solide, accessibles à l'azote. Elle est déterminée via la méthode B.E.T (Brunauer-Emmett-Teller) (*Brunauer et al. (1938)*) dans le domaine P/P_0 compris entre 0.05 et 0.35 (*Sing et al. (1985)*),
- le volume poreux total, V_{total} , qui représente le volume des micropores et des mésopores accessibles à l'azote. Il est déterminé à la fin de l'adsorption ($P/P_0 \sim 1$),
- la distribution mésoporeuse qui est la répartition du volume mésoporeux en fonction de la taille des pores. Elle est déterminée via le modèle B.J.H (Barret, Joyner, Halenda) (*Barrett et al. (1951)*).

II.4.C.4.Caractérisation physico-chimique

II.4.C.4.a.Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet une caractérisation chimique rapide des échantillons (Figure II.7). L'attribution des bandes d'absorption à des groupements fonctionnels spécifiques permet de classifier et suivre l'évolution chimique des substrats.

Avant d'être analysé, chaque échantillon est pastillé afin de faciliter l'acquisition des spectres et d'être le plus homogène possible. Pour ce faire, environ 30 mg d'échantillon sont introduits dans le moule à pastiller puis l'ensemble est soumis à une pression de 148 MPa (2 tonnes) dans une presse hydraulique. L'échantillon pastillé est ensuite extrait du moule et placé dans un module auxiliaire Thermo Nicolet AEM pour être analysé avec un Nexus 670 de chez Nicolet.

En pratique, la pastille est déposée sur le cristal de l'appareillage et maintenue en contact par le *golden gate*. L'acquisition est réalisée avec le logiciel OMNIC en mode ATR (réflectance totale atténuée) et chaque spectre rendu correspond en réalité à l'accumulation de 32 spectres de base. Pour la reproductibilité, 5 acquisitions sur 5 zones différentes de la pastille sont réalisées par échantillon (soit l'équivalent de 160 spectres). Les 5 spectres acquis sont ensuite moyennés puis corrigés par le spectre de référence de l'eau et du dioxyde de carbone. Entre chaque échantillon, un blanc est réalisé.

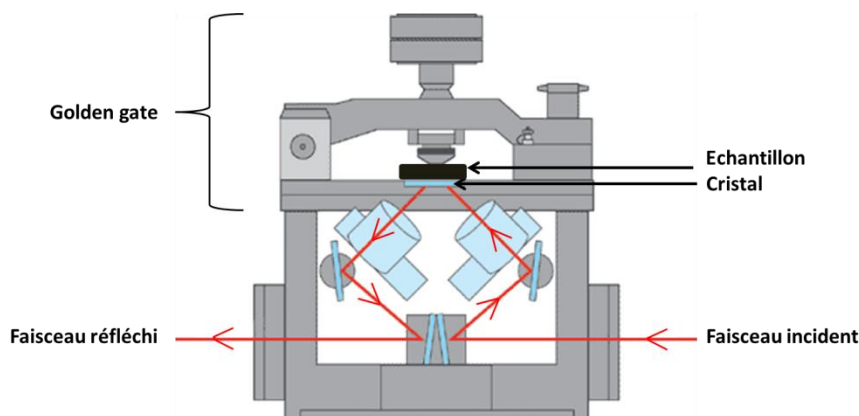


Figure II.7 : Représentation schématique de l'ATR-FTIR

II.4.C.4.b.Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) permet de suivre l'évolution de la masse d'un échantillon en fonction de la température à laquelle il est soumis. Différents types de transformation

peuvent être détectés comme l'évaporation, la sublimation, l'oxydation, la combustion, etc... A l'inverse, la fusion ou la cristallisation ne peuvent pas être détectées de par l'absence de perte de masse durant le processus. Cette technique permet également d'obtenir l'empreinte thermique d'un composé.

Les analyses ont été réalisées sur une thermobalance ATG de chez Mettler. Environ 30 mg d'échantillon sont placés dans un creuset puis une rampe de température de 10°C/min sous air est appliquée jusqu'à atteindre 1000°C. Un creuset vide, subissant le même traitement, permet de normaliser les données. Les grandeurs exploitées à partir des thermogrammes, fournis par le logiciel STARe v1, sont la masse en %pds (TG) et sa dérivée par rapport à la température en %pds/°C (DTG) (Figure II.8). L'utilisation de la DTG permet d'observer plus clairement les différents phénomènes mis en jeu lors de la montée en température.

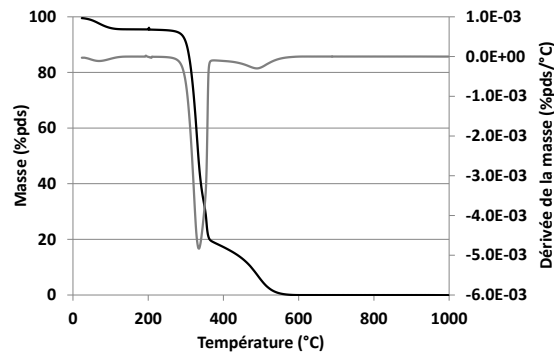


Figure II.8 : Thermogramme de la cellulose Avicel PH101

II.5.Conclusion

Afin de mieux comprendre l'impact spécifique de la détente explosive durant le prétraitement par explosion à la vapeur, il a été choisi de découpler expérimentalement la phase de vapocracage (cuisson acide) de la phase de détente explosive.

Dans ce but, la méthodologie expérimentale de la thèse s'est articulée autour de l'utilisation de deux outils de prétraitement distincts, l'un à IFPEN sur le site de Lyon (outil autoclave de cuisson acide), l'autre au département de Chimie Biologie Industrielle de l'Université de Liège-Gembloux (outil batch d'explosion vapeur). Ces outils sont décrits dans les parties 2 et 3 de ce chapitre.

La caractérisation des produits obtenus a aussi nécessité de mettre en place un protocole analytique complet avec, notamment, des étapes d'extraction des jus, de lavage des solides et de dosage par hydrolyse acide afin de quantifier les différents sucres sous leurs formes polymérique, oligomérique soluble, monomérique et dégradée. D'autres techniques analytiques ont aussi été utilisées pour répondre à certaines spécificités des études de la thèse. Ces techniques analytiques sont explicitées dans la partie 3 du chapitre.

L'ensemble des protocoles expérimentaux et analytiques présentés ici ont ainsi été utilisés pour réaliser 3 études distinctes qui sont décrites dans la suite du mémoire : une étude de cuisson acide (cf. Chapitre III), une étude de détente explosive (cf. Chapitre IV) et une étude sur la formation des humines (cf. Chapitre V) (Figure II.9)

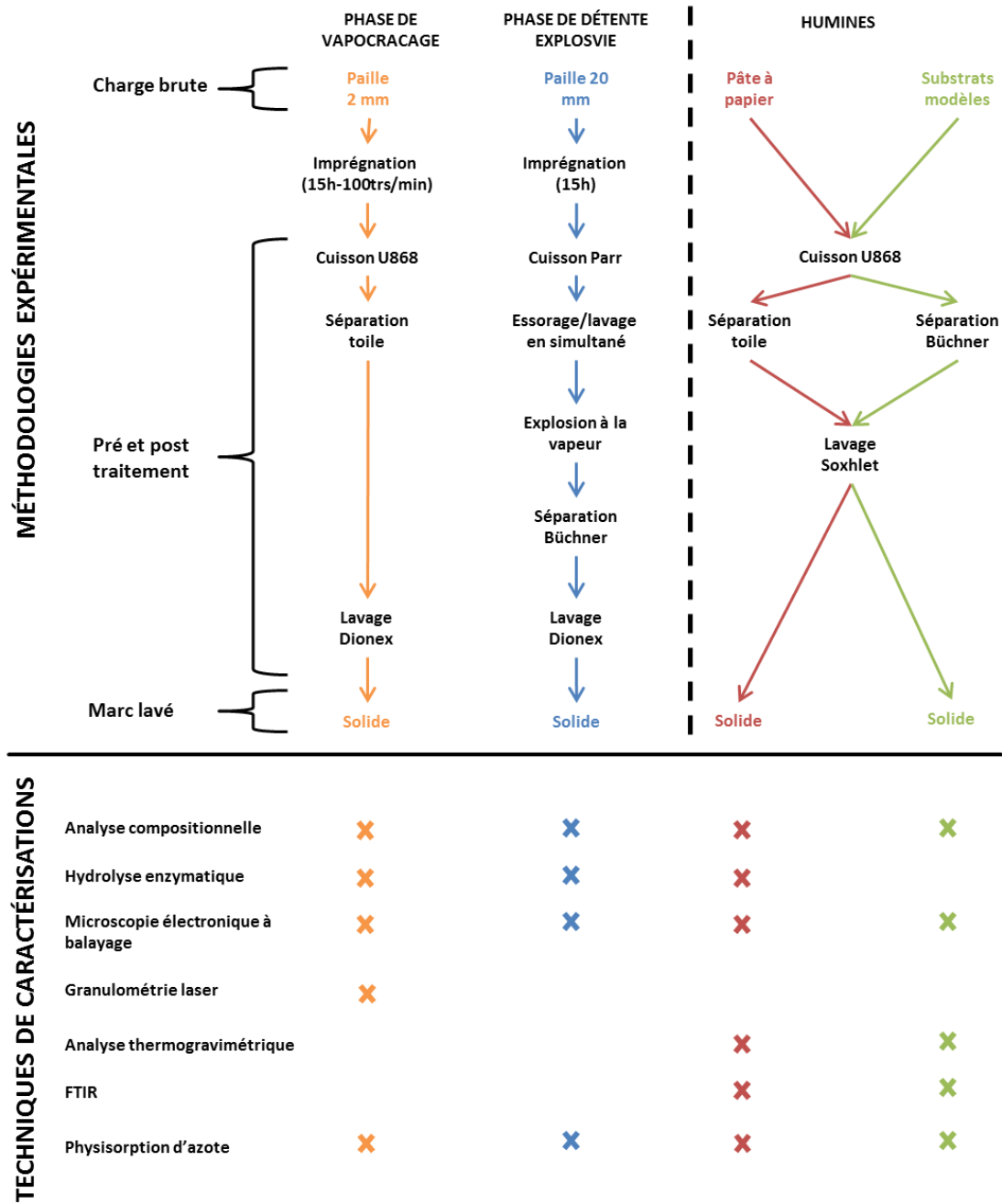


Figure II.9 : Représentation schématique des méthodologies expérimentales et des techniques de caractérisations mises en œuvre durant cette thèse

II.6.Références

- Barrett et al. (1951)* Barrett E. P., Joyner L. G. and Halenda P. P. (1951) **The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms.***Journal of the American Chemical Society***73**: 373–380.
- Brunauer et al. (1938)* Brunauer S., Emmett H. and Teller E. (1938) **Adsorption of gases in multimolecular layers.***Journal of the American chemical Society***60**: 309–319.
- Jacquet (2012)* Jacquet N. (2012) **Impact de la steam explosion et de l'homogénéisation sur les propriétés physico-chimiques et l'hydrolyse enzymatique de la cellulose.** Gembloux.
- Jacquet et al. (2012)* Jacquet N., Vanderghem C., Blecker C. and Paquot M. (2012) **Impact de la steam explosion et de l'homogénéisation sur les propriétés physicochimiques et l'hydrolyse enzymatique de la cellulose: La steam explosion application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique.** *Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique*, Gembloux.
- NREL (2008)* National Renewable Energies Laboratory (2008) **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.**
- Sing et al. (1985)* Sing K., Everett D.H., Haul R. et al. (1985) **Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity.** *Pure & Applied Chemistry***57**: 603–619.

CHAPITRE III : ETUDE EXPERIMENTALE DE CUISSON ACIDE

Résumé

Une fois mise en place l'approche méthodologique de la thèse et validés les outils expérimentaux et les protocoles analytiques, la première étude expérimentale a consisté à réaliser et à exploiter une série de prétraitements par cuisson acide. L'objectif de cette campagne était alors triple : (1) étudier l'impact des conditions opératoires de prétraitement sur la qualité des substrats obtenus en termes de composition, morphologie et réactivité à l'hydrolyse enzymatique (Chapitre III actuel), (2) préparer une base homogène d'échantillons de substrats prétraités pour approfondir la caractérisation par des techniques analytiques plus avancées (cf. thèse J. Passicouset) et (3) définir les conditions de cuisson à utiliser durant l'étude de détente explosive (Chapitre IV).

Pour des raisons de temps et pour éviter une trop forte dispersion de l'effort expérimental, il a été convenu de figer plusieurs paramètres de second ordre pour le prétraitement de cuisson acide comme la biomasse de départ (paille de blé dépoussiérée et broyée à 2 mm), la teneur en MS du mélange de cuisson (10 %pds) ou l'acide utilisé (acide sulfurique). A contrario, les autres conditions ont été modifiées dans un vaste domaine permettant de couvrir une large échelle de sévérité. La température a ainsi été modifiée entre 100 et 180°C, le temps de séjour entre 0 et 120 min et la teneur en acide sulfurique entre 0 et 1 %pds dans la liqueur d'imprégnation.

L'ensemble du plan expérimental a permis de produire 29 échantillons de substrats prétraités, certains dans des conditions de cuisson très éloignées des conditions optimales souvent étudiées dans la littérature. L'objectif de ce chapitre est de fournir le détail des expérimentations réalisées et de discuter des résultats obtenus, notamment en se comparant à la littérature et en explicitant les relations pouvant exister entre les propriétés physico-chimiques des substrats prétraités et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique.

PLAN DU CHAPITRE

| | |
|--|------------|
| III.1. Introduction | 115 |
| III.2. Description générale de l'étude | 116 |
| III.2.A. Description du substrat | 116 |
| III.2.B. Description des points expérimentaux | 117 |
| III.2.C. Validation du plan expérimental..... | 118 |
| III.3. Détermination des rendements expérimentaux | 120 |
| III.3.A. Bilans sur les sucres majoritaires..... | 120 |
| III.3.B. Evolution des rendements en glucose et xylose en fonction du facteur de sévérité..... | 122 |
| III.3.B.1. Hydrolyse acide de la fraction xylane de la paille de blé | 122 |
| III.3.B.2. Hydrolyse acide de la fraction cellulose de la paille de blé..... | 124 |
| III.4. Réactivité des substrats prétraités à l'hydrolyse enzymatique | 127 |
| III.4.A. Rendements en glucose après hydrolyse enzymatique à 72h de la paille de blé prétraitée par cuisson acide | 127 |
| III.4.B. Rendements cumulés en glucose et xylose après prétraitement et hydrolyse enzymatique .. | 128 |
| III.5. Impact des conditions opératoires de prétraitement sur les caractéristiques physico-chimiques des substrats en relation avec leurs réactivités à l'hydrolyse enzymatique | 131 |
| III.5.A. Modification chimique de la paille de blé prétraitée | 131 |
| III.5.B. Modification morphologique de la paille de blé prétraitée | 133 |
| III.5.C. Modification de la porosité de la paille de blé prétraitée | 137 |
| III.5.D. Modification structurale de la paille de blé | 139 |
| III.6. Conclusion générale de l'étude | 141 |
| III.7. Références | 143 |

III.1.Introduction

L'étude bibliographique a montré que le prétraitement par explosion à la vapeur est actuellement un des prétraitements industriels les plus prometteurs pour améliorer la réactivité des substrats lignocellulosiques à l'hydrolyse enzymatique, notamment grâce à l'hydrolyse de la majeure partie des hémicelluloses qui améliore ainsi l'accessibilité de la cellulose aux enzymes.

Dans un réacteur de prétraitement par explosion à la vapeur, deux phases peuvent être distinguées schématiquement : tout d'abord la phase de cuisson qui dépolymérise les chaînes d'hémicelluloses par catalyse acide ; ensuite la phase de détente explosive qui génère de fortes contraintes de cisaillement au sein des particules de biomasse par évaporation instantanée de l'eau à l'intérieur, ce qui entraîne leur éclatement mécanique. L'un des objectifs de cette thèse est de mieux comprendre l'ensemble des phénomènes physico-chimiques se déroulant dans cette famille de prétraitement, notamment en découplant expérimentalement et en étudiant séparément les deux phases. Pour ce faire, une démarche originale en deux temps a été mise en place : étude de la cuisson acide suivie d'une étude de la détente explosive.

Ce chapitre s'intéresse plus particulièrement à la phase de cuisson acide, en étudiant notamment l'impact de ses conditions opératoires principales : temps de séjour, température et teneur en acide sulfurique dans la liqueur d'imprégnation. Les autres paramètres ont été fixés pour limiter les degrés de liberté de l'étude, comme le choix de la biomasse (paille de blé, dépoussiérée et broyée à 2 mm), le choix de l'acide (acide sulfurique) ou la teneur en matière sèche du mélange réactionnel (10 %pds). L'idée consiste ici à disposer d'un ensemble homogène de substrats prétraités issus d'un même substrat lignocellulosique mais ayant une très forte dispersion en termes de sévérité de cuisson pour pouvoir ensuite étudier l'impact des conditions opératoires sur la qualité des substrats obtenus en termes de composition, de morphologie et de réactivité à l'hydrolyse enzymatique.

Dans cette approche, l'ensemble des cuissons acides ont été menées sur de la paille de blé (variété Bermude – blé tendre d'hiver) en utilisant un outil autoclave disponible dans les laboratoires d'IFPEN (unité U868). Pour plus de détails sur les méthodologies mises en œuvre pour cette étude, le lecteur pourra se référer au chapitre II « Matériels et méthodes » du mémoire. Les post-traitements, réalisés sur chaque cuisson, ont permis d'étudier et de comparer les évolutions de propriétés compositionnelles aux évolutions de réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Pour certaines cuissons typiques, cette caractérisation compositionnelle a aussi été complétée par d'autres techniques analytiques (surface BET, porosité, indice de cristallinité, etc...) afin d'affiner la discussion.

III.2. Description générale de l'étude

III.2.A. Description du substrat

Dans cette étude, l'ensemble des cuissons ont été réalisées sur une paille de blé (variété Bermude), récoltée dans le département de la Marne, pré-broyée sur champ à 50-100 mm puis stockée sous forme de balles sous grange, elle a ensuite été broyée à 20 mm puis dépoussiérée (broyage grossier). Elle a finalement été broyée à 2 mm chez IFPEN sur un broyeur à couteaux SM 100 Retsch afin de garantir la bonne faisabilité d'un mélange initial de cuisson acide à 10 %pds de matière sèche (MS) dans l'outil U868 (consigne minimale permettant d'obtenir, par essai, 20 à 30 g sec de substrat prétraité, nécessaire pour les post-traitements et les analyses de caractérisation).

Ce choix d'un broyage à 2 mm a été fait suite à une étude préliminaire qui n'est pas présentée dans ce mémoire. Cependant, pour résumer, des expérimentations de cuisson ont été conduites en début de thèse en utilisant de la paille broyée à différentes granulométries (2, 4 et 10 mm). Seule la paille broyée à 2 mm s'est avérée utilisable pour préparer des mélanges à 10 %pds MS qui ne soient pas trop pâteux et qui permettent la fermeture du réacteur et la bonne homogénéité du mélange. Le choix d'un broyage à 2 mm s'est donc imposé.

La composition chimique de la paille de blé utilisée est fournie dans le tableau ci-dessous. Les potentiels en sucres et la teneur en lignine insoluble ont été obtenus après hydrolyse acide (cf. § II.4.A.3). La teneur en mannane du tableau correspond au seuil de détection de la chromatographie liquide pour ce sucre. C'est pourquoi aucun résultat ne sera présenté sur le mannose dans la suite de l'étude. Enfin, 7.7 %pds de la MS (différence à 100 %) n'est pas identifiée en l'état et correspond à des fractions minoritaires comme la lignine soluble, les protéines, les extractibles, les acides phénoliques, etc...

Tableau III.1 : Analyse compositionnelle de la paille de blé

| | | |
|--------------------------------|------|---------------|
| Teneur en MS | %pds | 91.40 ± 0.07 |
| Teneur en cellulose/MS | %pds | 39.82 ± 0.98 |
| Teneur en xylane/MS | %pds | 24.43 ± 1.08 |
| Teneur en galactane/MS | %pds | 2.05 ± 0.38 |
| Teneur en arabinane/MS | %pds | 3.00 ± 0.07 |
| Teneur en mannane/MS | %pds | ≤ 0.01 ± 0.00 |
| Teneur en lignine insoluble/MS | %pds | 18.75 ± 0.28 |
| Teneur en cendres/MS | %pds | 4.25 ± 0.28 |

III.2.B. Description des points expérimentaux

La paille de blé broyée à 2 mm a ensuite été prétraitée dans l'unité U868 (cf. § II.2.A.1) en faisant varier les conditions opératoires de prétraitement :

- teneur en matière sèche du mélange : 10 %pds MS
- teneur en acide sulfurique : 0, 0.25, 0.5 et 1 %pds d'H₂SO₄
- temps d'imprégnation : 18 h
- temps de séjour de cuisson : 0, 10, 20, 30, 60, 90 et 120 min
- température de cuisson : 100, 120, 140, 160 et 180°C

A partir des grandeurs relatives au temps de séjour, à la température et à la teneur en acide de la liqueur d'imprégnation, il a été possible de calculer un facteur de sévérité pour chaque jeu de conditions opératoires à l'aide de l'équation II.1 (cf. § II.2.A.3) qui est rappelée ici :

$$\text{Equation III.1 : } F_0 = \log_{10} \left(\sum_i \Delta t \cdot e^{\frac{(T_i - T_{ref})}{14.75}} \right) - pH$$

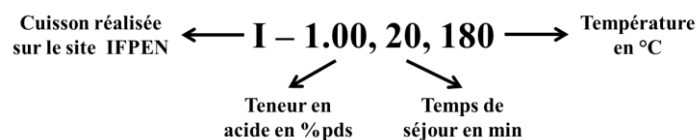
avec Δt : pas de temps entre l'acquisition de deux températures, équivalent à 0.08 min pour l'unité U868

T_i : température de cuisson en °C à l'instant i

T_{ref} : température de référence fixée arbitrairement à 100°C pour l'ensemble des essais

pH : pH du mélange réactionnel (considéré comme constant durant la cuisson)

La référence pour chaque essai de cette étude a été déclinée comme suit pour des raisons de clarté à la lecture :



L'ensemble des conditions opératoires testées durant cette thèse sont résumées dans le Tableau III.2 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Parmi les différents points obtenus, un jeu de conditions opératoires (140°C, 60 min, 1 %pds d'H₂SO₄) a été répété trois fois afin d'évaluer la reproductibilité intra-laboratoire des cuissons acides. Les conditions opératoires les plus douces conduisent à des facteurs de sévérité négatifs (valeur minimale de -2.69) ce qui pourraient surprendre. En réalité, ce résultat est lié à l'intégration du pH dans l'équation du facteur de sévérité, ce qui conduit mécaniquement à un « décalage » vers des valeurs plus faibles que celles habituellement fournies dans la littérature. Le facteur pour les conditions les plus sévères est de 2.96.

Certaines conditions opératoires du Tableau III.2 (voir cases colorées) ont été sélectionnées pour réaliser des analyses complémentaires afin d'approfondir la compréhension des relations entre les propriétés physico-chimiques et la réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats prétraités. Ces conditions opératoires particulières couvrent l'ensemble du domaine de sévérité. Elles sont gérées à l'aide d'un code couleur qui sera repris ensuite dans les différentes figures de l'étude, les autres conditions étant simplement grisées.

Tableau III.2 : Conditions opératoires de prétraitement

| Référence | Température °C | Temps min | Teneur en acide %pds | F ₀ | Référence | Température °C | Temps min | Teneur en acide %pds | F ₀ |
|------------------|-------------------|--------------|----------------------------|----------------|------------------|-------------------|--------------|----------------------------|----------------|
| Paille native | - | - | - | -6.52* | I-1.00, 30, 140 | 140 | 30 | 1 | 1.3 |
| I-0.00, 20, 140 | 140 | 20 | 0 | -2.69 | I-1.00, 10, 160 | 160 | 10 | 1 | 1.48 |
| I-0.00, 20, 180 | 180 | 20 | 0 | -0.62 | I-1.00, 60, 140 | 140 | 60 | 1 | 1.52 |
| I-0.25, 20, 140 | 140 | 20 | 0.25 | -0.06 | I-1.00, 60, 140 | 140 | 60 | 1 | 1.53 |
| I-1.00, 20, 100 | 100 | 20 | 1 | 0.02 | I-1.00, 60, 140 | 140 | 60 | 1 | 1.53 |
| I-1.00, 0, 140 | 140 | 0 | 1 | 0.28 | I-1.00, 90, 140 | 140 | 90 | 1 | 1.61 |
| I-1.00, 60, 100 | 100 | 60 | 1 | 0.4 | I-1.00, 20, 160 | 160 | 20 | 1 | 1.64 |
| I-1.00, 20, 120 | 120 | 20 | 1 | 0.53 | I-1.00, 120, 140 | 140 | 120 | 1 | 1.65 |
| I-1.00, 120, 100 | 100 | 120 | 1 | 0.65 | I-0.50, 20, 180 | 180 | 20 | 0.5 | 1.80 |
| I-0.50, 20, 140 | 140 | 20 | 0.5 | 0.66 | I-1.00, 10, 180 | 180 | 10 | 1 | 2.00 |
| I-1.00, 10, 140 | 140 | 10 | 1 | 0.94 | I-1.00, 60, 160 | 160 | 60 | 1 | 2.10 |
| I-0.25, 20, 180 | 180 | 20 | 0.25 | 0.95 | I-1.00, 20, 180 | 180 | 20 | 1 | 2.23 |
| I-1.00, 60, 120 | 120 | 60 | 1 | 0.97 | I-1.00, 120, 160 | 160 | 120 | 1 | 2.4 |
| I-1.00, 20, 140 | 140 | 20 | 1 | 1.19 | I-1.00, 60, 180 | 180 | 60 | 1 | 2.67 |
| I-1.00, 120, 120 | 120 | 120 | 1 | 1.22 | I-1.00, 120, 180 | 180 | 120 | 1 | 2.96 |

*valeur arbitraire attribuée à la paille native correspondant à l'opposé du pH mesuré de cette dernière dans l'eau

III.2.C. Validation du plan expérimental

En suivant la méthodologie expérimentale de cuisson décrite dans le chapitre II « Matériels et méthodes » de ce mémoire, chaque essai a fait l'objet d'un bilan massique global et d'un bilan sur la matière sèche afin de le valider.

En ce qui concerne le bilan massique global, les résultats présentés dans la Figure III.1/A sont très satisfaisants (bilans compris entre 95.2 et 99.6 %pds sans tendance nette en fonction du facteur de sévérité), ce qui valide la méthodologie expérimentale mise en œuvre, notamment toutes les étapes de post-traitement et de récupération des échantillons.

Cependant, en regardant les bilans sur la matière sèche (Figure III.1/B), les résultats semblent moins bons avec des valeurs comprises entre 83.5 et 105.9 %pds. De plus, à la reproductibilité expérimentale près, il est possible de voir que les pertes en matière sèche augmentent avec la sévérité de la cuisson. Par exemple, pour l'essai I-1.00, 120, 180 correspondant au facteur de sévérité le plus élevé (F₀= 2.96), une perte d'environ 20 %pds est observée. Ces pertes en matière sèche peuvent s'expliquer naturellement par les défauts de la méthodologie de caractérisation mise en place. En effet, les teneurs en matière sèche des jus de cuisson et des substrats prétraités non lavés sont déterminées respectivement à l'aide d'une balance micro-ondes (température de consigne = 65°C) et d'une étuve (température de consigne = 105°C). Dans ces conditions de température de séchage, certaines espèces volatiles, comme le 5-HMF, le furfural ou les acides organiques, présentes dans les jus de cuisson,

s'évaporent en même temps que l'eau et ne sont donc pas quantifiées par l'analyse de MS. Cela entraîne par conséquent une sous-estimation de la teneur en matière sèche, notamment dans les cas de cuisson à forte sévérité où les quantités de produits volatiles de dégradation (5-HMF et surtout furfural) sont les plus importantes.

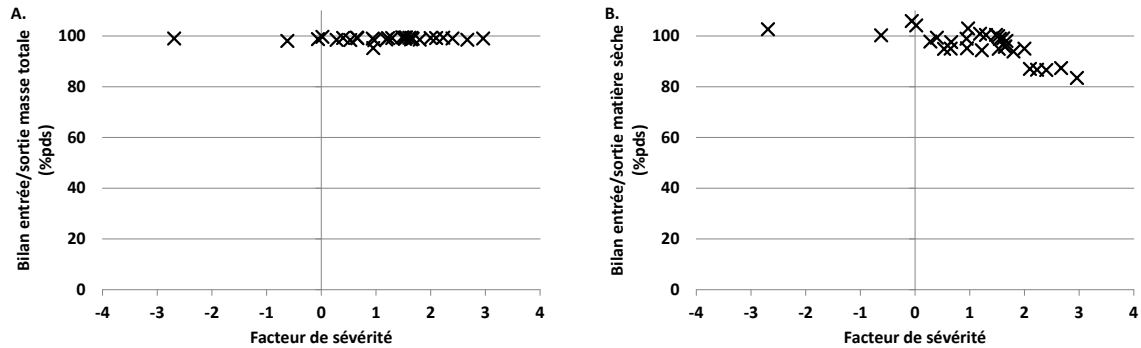


Figure III.1 : Bilan entrée / sortie du prétraitement de cuisson acide en fonction de la masse totale (A) et en fonction de la matière sèche (B)

L'ensemble des points expérimentaux réalisés dans le cadre de l'étude de cuisson acide ont ainsi pu être validés par cette approche. L'étape suivante a ensuite consisté à effectuer un bilan sur chacun des sucres, notamment sur les sucres majoritaires (glucose et xylose), afin de déterminer la composition des substrats prétraités et les rendements de conversion de l'étape de cuisson.

III.3.Détermination des rendements expérimentaux

III.3.A.Bilans sur les sucres majoritaires

L'ensemble des prétraitements par cuisson acide ont été effectués sur des mélanges de 400 g à 10 % pds MS de paille de blé 2 mm. Par hydrolyse acide de la paille native (cf. § II.4.A.3), les quantités de sucres potentiels introduits initialement dans l'autoclave U868 ont pu être déterminées :

- masse de glucose potentiel : 17.70 ± 0.11 g
- masse de xylose potentiel : 11.10 ± 0.07 g
- masse de galactose potentiel : 0.91 ± 0.01 g
- masse d'arabinose potentiel : 1.36 ± 0.01 g

Le post-traitement et l'analyse du substrat et du jus de cuisson selon la méthodologie présentée dans le Chapitre I « Matériel et méthodes » permettent de déterminer, quant à eux, les quantités des différents sucres sous leurs formes polymérique, oligomérique soluble, monomérique et dégradée, après cuisson. Il est alors possible de vérifier que les quantités de sucres introduits sont en accord avec les quantités de sucres récupérés. L'ensemble des résultats concernant les bilans matière pour chaque sucre est disponible en Annexe A. Dans la suite de ce chapitre, les rendements globaux seront tracés en fonction du facteur de sévérité F_0 pour des raisons de clarté.

L'analyse des résultats bruts montre clairement que les bilans matière de chaque sucre ne sont pas complets (Figure III.2). Dans le cas du bilan sur le glucose, deux domaines distincts sont observables. Pour des facteurs de sévérité compris entre -2.69 et 2.10 , les bilans matière bouclent entre 94.3% et 106.3% , ce qui est acceptable au vu des imprécisions expérimentales (Figure III.2/A). En effet, en analysant les résultats du jeu de conditions opératoires de référence ($F_0 = 1.53$) qui a été répété 3 fois, il est possible de déterminer une reproductibilité moyenne pour cette cuisson particulière, ce qui donne un bilan en glucose de $94.6\% \pm 3.4\%$. En faisant l'hypothèse d'une reproductibilité expérimentale similaire pour les autres cuissons acides, les bilans calculés sur le glucose pour les facteurs de sévérité compris entre -2.69 et 2.10 sont de 100% , à l'incertitude expérimentale près. Après examen des calculs des bilans, cette incertitude est due principalement à la difficulté d'estimer expérimentalement le rendement de lavage du substrat prétraité. Il a donc été choisi de renormaliser ces bilans en modifiant les rendements de lavage afin qu'ils bouclent à 100% . Cette renormalisation a été effectuée pour les points avec un facteur de sévérité inférieur à 2.10 , là où il a été considéré que l'erreur n'était qu'expérimentale. En revanche, pour les points à haute sévérité ($F_0 > 2.10$), les pertes observées sur les bilans glucose deviennent trop importantes et ne peuvent plus être simplement expliquées par une incertitude expérimentale. Ces pertes en glucose sont donc dues à un phénomène non mesuré dans le protocole analytique standard, et sont probablement liées à la formation d'humines par réaction/condensation du glucose et/ou de ses produits de dégradation (cf. Chapitre I sur l'état de l'art).

Les mêmes remarques peuvent être faites pour les bilans sur le xylose. En effet, les bilans sont corrects pour des facteurs de sévérité compris entre -2.69 et 1.61 avec des variations entre 86.8% et 105.3% mais que des pertes importantes apparaissent pour des sévérités plus élevées (Figure III.2/B). Ici, cependant, la renormalisation n'est plus possible puisqu'elle a déjà été faite sur la base des bilans glucose. Il a donc été considéré que ces dernières étaient dues simplement à la dégradation du xylose sous forme d'humines ou de pseudo-lignine, non détectables ni quantifiables par les techniques mises

en place. Afin de faire boucler les bilans sur le xylose, le complément à 100 % a donc été affecté arbitrairement aux humines.

Pour les bilans galactose et arabinose, les résultats montrent une très forte variabilité (bilans variant de 36 à 108 % pour le galactose et de 25 à 108 % pour l'arabinose) sans réelle tendance. Ces fortes variations sont dues à la faible proportion de ces sucres dans les jus et les substrats prétraités, qui entraîne des difficultés analytiques de quantification et une incertitude élevée sur la globalité du bilan (Figure III.2/ C et D). C'est pourquoi, dans la suite de cette étude, le galactane et l'arabinane ne seront pas détaillés.

Après exploitation des bilans glucose et xylose, et renormalisation à 100 % pour tenir compte des incertitudes expérimentales et de la formation des humines, l'évolution des différents sucres sous leurs formes polymérique, oligomérique, monomérique, dégradée et « humines » a pu être tracée en fonction du facteur de sévérité. Ces résultats sont présentés dans la suite du chapitre.

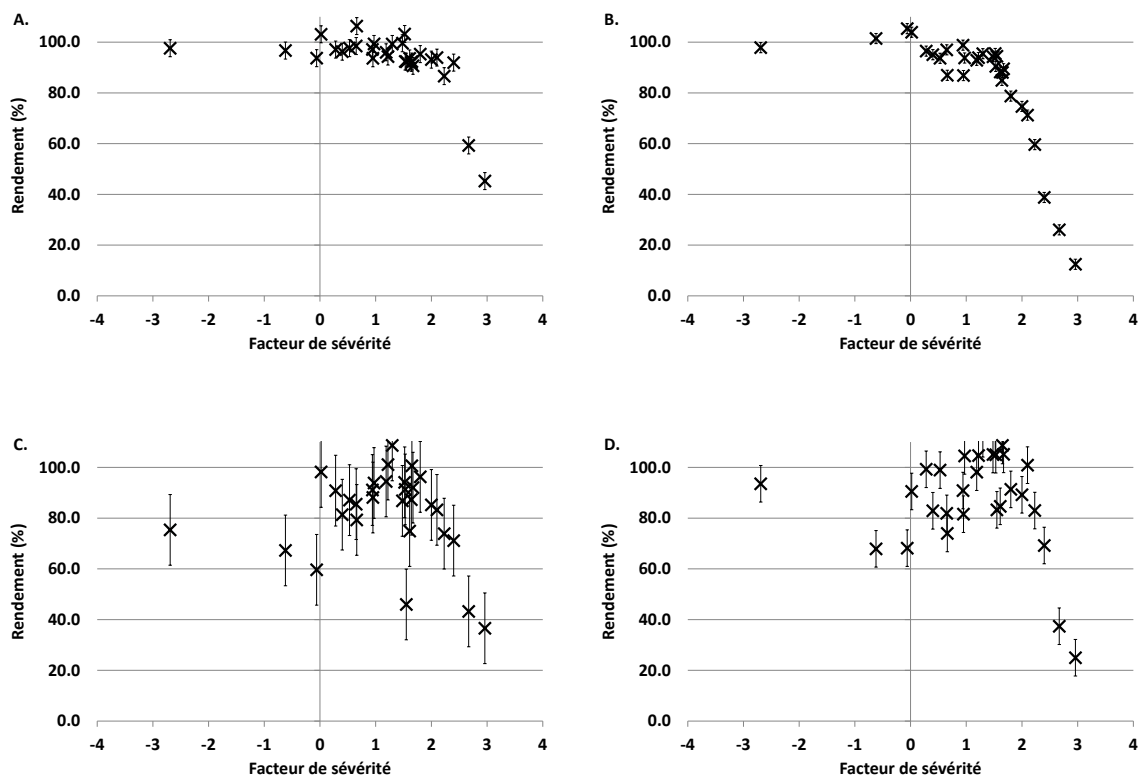


Figure III.2 : Résultats expérimentaux bruts pour les bilans matières de chacun des sucres en fonction du facteur de sévérité (A/ glucose ; B/ xylose ; C/ galactose ; D/ arabinose)

La réalisation des bilans massiques est très importante pour permettre la validation et l'optimisation du procédé. Cependant, notamment dans le cas du prétraitement à l'acide dilué, peu d'études issues de la littérature appliquent spécifiquement cette approche. En effet, la majorité d'entre elles détermine exclusivement la composition chimique des substrats prétraités, sans faire de calcul de rendement, car leur seul objectif est de proposer des conditions opératoires optimales de prétraitement afin de rendre le substrat le plus réactif à l'hydrolyse enzymatique. Il existe cependant certaines études

qui ont réalisé un travail similaire à celui de cette thèse (Qin *et al.* (2012) ; Shekiro *et al.* (2014) ; Schell *et al.* (2003)). En effectuant une comparaison entre l'étude présentée ici et celles de la bibliographie (Tableau III.3), il est possible de constater que les bilans glucose sont similaires alors que les bilans xylose sont meilleurs dans les études de la littérature. Cela peut s'expliquer par leurs facteurs de sévérité plus faibles, qui ont limité les problèmes liés à la non quantification des humines. Les auteurs en sont d'ailleurs en partie conscient puisque, comme le précise Garlock *et al.* (2011), il est difficile de boucler les bilans, pour des facteurs de sévérité élevés, en raison de la complexité des produits de dégradation obtenus à partir du glucose et du xylose.

Il est à noter que cette comparaison n'a pu être réalisée qu'en utilisant une formule simplifiée pour le facteur de sévérité, ne prenant pas en compte le profil de température durant la cuisson mais uniquement la durée du palier. C'est pourquoi les valeurs correspondant à notre étude dans le Tableau III.2 sont différentes de celles fournies dans le Tableau III.3.

$$\text{Equation III.2 : } F_0 = \log_{10} \left(t \cdot e^{\frac{(T - T_{ref})}{14.75}} \right) - pH$$

- avec : t : temps de séjour (min)
 T : température de consigne (°C)
 T_{ref} : température de référence fixée à 100°C
 pH : pH du milieu réactionnel

Tableau III.3 : Comparaison d'études de cuisson acide sur les bilans glucose et xylose en fonction du facteur de sévérité

| Référence | Plage du facteur de sévérité | Bilan glucose | Bilan xylose |
|--------------------------------|------------------------------|---------------|--------------|
| | - | %pds | %pds |
| Etude | [-3.52 ; 3.23] | [94 ; 106] | [12 ; 105] |
| Qin <i>et al.</i> , (2012) | [0.86 ; 2.93] | [82 ; 100] | [78 ; 98] |
| Shekiro <i>et al.</i> , (2014) | [0.56 ; 1.34] | [95 ; 107] | [92 ; 100] |
| Schell <i>et al.</i> , (2003) | [0.44 ; 2.03] | non fourni | [79 ; 106] |

III.3.B. Evolution des rendements en glucose et xylose en fonction du facteur de sévérité

III.3.B.1. Hydrolyse acide de la fraction xylane de la paille de blé

Le xylane, composé majoritaire des hémicelluloses de la paille de blé, est très facilement dépolymérisé en xylose lors d'une cuisson acide (comparativement à la cellulose). Cependant, une hydrolyse acide trop sévère conduit à la formation de furfural, voire d'humines dans les conditions les

plus extrêmes. Or la production de ces composés n'est pas souhaitable car le premier est connu pour être un inhibiteur de la fermentation (*Taherzadeh et al. (1997)*) et les seconds vont avoir tendance à s'agréger au sein même de la biomasse prétraitée, à précipiter sur les fibres ou fragments de fibres et, en conséquence, à diminuer la réactivité du substrat à l'hydrolyse enzymatique (*Juan et al. (2018)*). Les résultats expérimentaux pour les rendements concernant le xylose sont présentés dans la Figure III.3.

Tout d'abord, la conversion du xylane (xylose sous forme polymérique) est très rapide (50% de conversion pour un facteur de sévérité d'environ 0.53) et devient totale pour un facteur de sévérité supérieur à 2.0 (Figure III.3/A).

Le xylose polymérique est d'abord transformé en xylose oligomérique soluble qui reste peu présent avec un rendement maximal d'environ 30 % pour un facteur de sévérité d'environ 0.53. Pour des facteurs de sévérité plus élevés, le rendement en xylose oligomérique soluble devient quasiment nul car sa vitesse de production à partir du xylose polymérique devient faible par rapport à sa vitesse de disparition sous la forme monomérique (Figure III.3/B) Consécutivement, le rendement en xylose monomérique augmente fortement suite à l'hydrolyse du xylose polymérique puis du xylose oligomérique jusqu'à un facteur de sévérité de 1.53 (Figure III.3/C). A nouveau, ce rendement finit lui-aussi par diminuer car le xylose commence à se transformer en furfural. En effet, ce dernier commence à apparaître à partir d'un facteur de sévérité de 1.53 et son rendement augmente jusqu'à 30 % pour le facteur de sévérité le plus élevé (Figure III.3/D). Dans le même temps, le rendement en « humines » (ensemble de composés non quantifiables par les techniques analytiques utilisées mais dont la teneur a été estimée par bilan sur le xylose) augmente jusqu'à représenter 67 % du xylose initialement présent (Figure III.3/E).

Si ces résultats sont comparés à la littérature, les mêmes tendances sont observées. En effet, dans leurs études, *Qin et al. (2012)* et *Shekiro et al. (2014)* observent les mêmes évolutions de la conversion du xylane en xylose sous ses formes oligomérique, monomérique et dégradée (furfural). Dans la majorité des cas, les auteurs obtiennent des rendements maximaux en xylose monomérique aux alentours de 80 % pour des conditions opératoires de prétraitement dites optimales, ce qui est très similaire aux résultats présentés ici. Ce rendement maximal de 80 % semble être universel puisqu'il est le même dans des cas de cuisson où la température est élevée (160-200°C) mais le temps de séjour est court (< 10 min) (*Cara et al. (2008)* ; *Zhang et al. (2015)*), dans des cas de cuisson où la température est plus faible (100-130°C) mais le temps de séjour est plus long (> 20 min) (*Aguilar et al. (2002)* ; *Roberto et al. (2003)*) ou dans des cas de cuisson où la température et le temps de séjour sont intermédiaires (*Sung Bong et al. (2011)*). Même l'utilisation de substrats différents (bois d'olivier, bagasse de sorgho et de canne à sucre, paille de riz, d'orge et de maïs) ne semble pas impacter cette valeur.

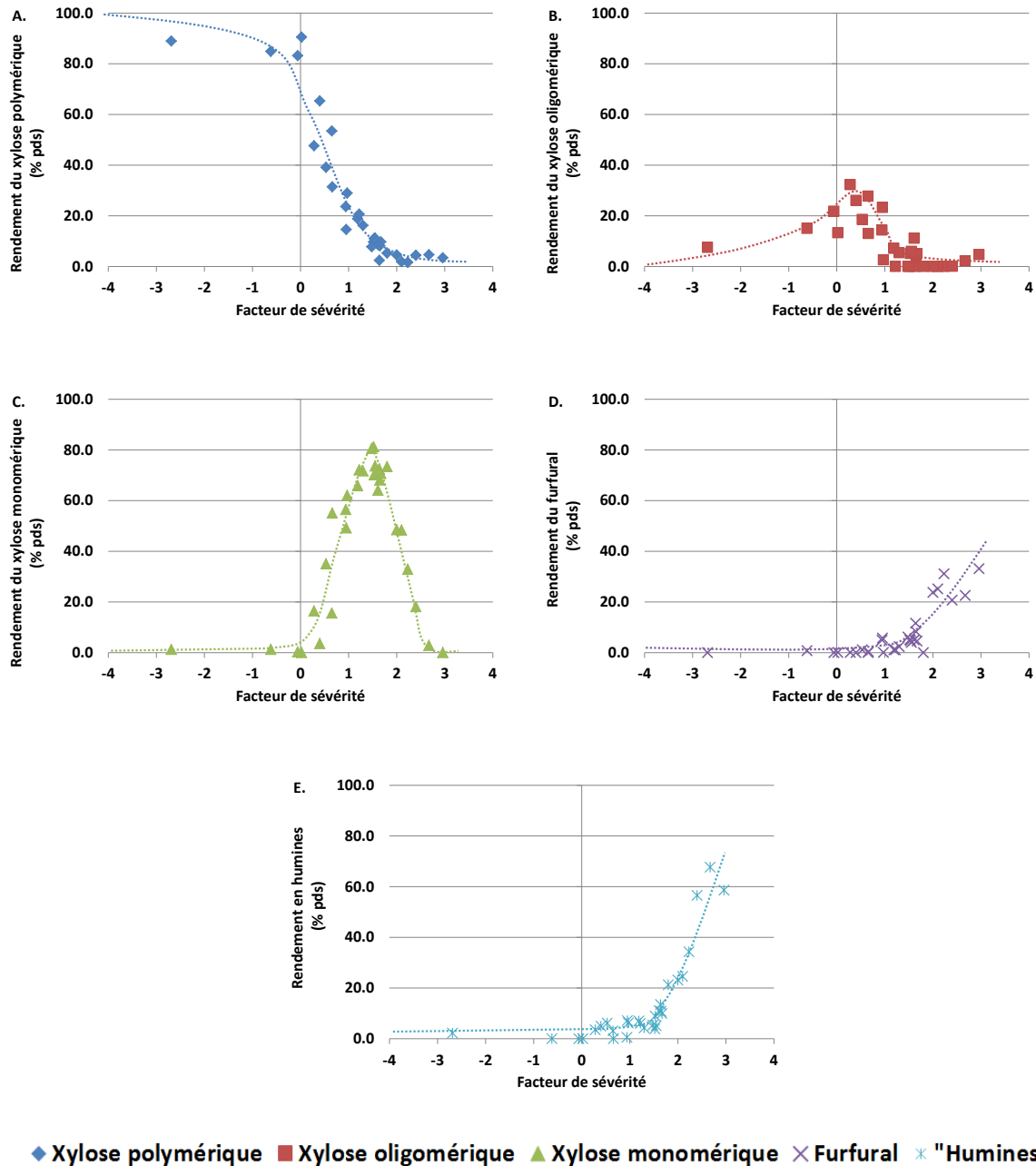


Figure III.3 : Rendements des différents sous-produits du xylane en fonction du facteur de sévérité (A/ xylose polymérique, B/ xylose oligomérique, C/ xylose monomérique, D/ furfural, E/ « humines »)

III.3.B.2. Hydrolyse acide de la fraction cellulose de la paille de blé

Au contraire de l'hydrolyse acide du xylane, la cinétique de dépolymérisation de la cellulose est lente durant l'étape de cuisson acide. En effet, le glucose polymérique est faiblement dégradé pour des facteurs de sévérité inférieurs à 1.53 avec des conversions de la cellulose comprises entre 2 et 12 % (pour rappel, les conversions du xylane variaient de 10 à 100 %) (Figure III.4/A).

Dans ce même intervalle de sévérité, les rendements en glucose oligomérique et monomérique restent faibles avec des rendements inférieurs à 10 %. A l'inverse, pour des facteurs de sévérité supérieurs à 1.53, les conditions expérimentales sont suffisamment fortes pour commencer à dégrader le glucose polymérique en oligomère puis en monomère. La transition entre le glucose polymérique et

oligomérique n'est cependant pas très visible quand ce dernier est présent et le rendement en glucose monomérique augmente pour atteindre environ 30 % pour un facteur de sévérité de 2.96 (Figure III.4/B et C). Finalement, les rendements en 5-HMF sont quasiment nuls et restent, dans toutes les conditions testées, inférieurs à 5 %.

La faible présence de 5-HMF dans le jus de cuisson peut s'expliquer par sa faible stabilité dans un milieu aqueux et acide. En effet, la molécule se réhydrate rapidement en acide lévulinique et formique (*Gaset et al. (1981)* ; *Lopes de Souza et al. (2012)*). Cependant, leurs proportions ne dépassent pas 5.07 et 0.23 %pds respectivement pour l'acide lévulinique et formique dans les conditions les plus sévères. Il est possible que ces acides se dégradent, se polymérisent et/ou se recondensent rapidement avec d'autres intermédiaires de réaction comme le 5-HMF, le furfural ou encore les sucres eux-mêmes pour produire des humines qui pourront alors être présentes dans la phase liquide ou précipitées sur le substrat. L'étude de la formation des humines sera présentée spécifiquement au Chapitre V de ce manuscrit.

Comme pour l'hydrolyse acide du xylane (cf. III.3.B.1), les tendances observées sont similaires à la littérature. Cependant, dans ces cas-là, les plages de sévérité sont plus étroites et les conditions extrêmes sont très peu étudiées (*Schell et al. (2003)* ; *Qin et al. (2012)*). En effet, l'objectif de ces études étant d'optimiser les conditions opératoires de prétraitement en hydrolysant les hémicelluloses sans affecter la cellulose, les sévérités sont relativement basses. La comparaison des résultats obtenus par rapport à la littérature est donc impossible pour des facteurs de sévérité élevés, supérieurs à 1.53.

Pour conclure sur l'évolution des rendements en glucose et xylose en fonction du facteur de sévérité, il a été vu que la cinétique de dégradation des polysaccharides sous leurs formes oligomérique, puis monomérique et enfin dégradée était beaucoup plus rapide pour le xylane que pour la cellulose. Pour un facteur de sévérité d'environ 1.53, le xylane a été complètement hydrolysé et le rendement en xylose monomérique dans le jus de cuisson est maximal (≈ 80 %pds). A cette sévérité, les conditions opératoires sont suffisamment sévères pour commencer à dégrader la cellulose en oligomère puis en monomère.

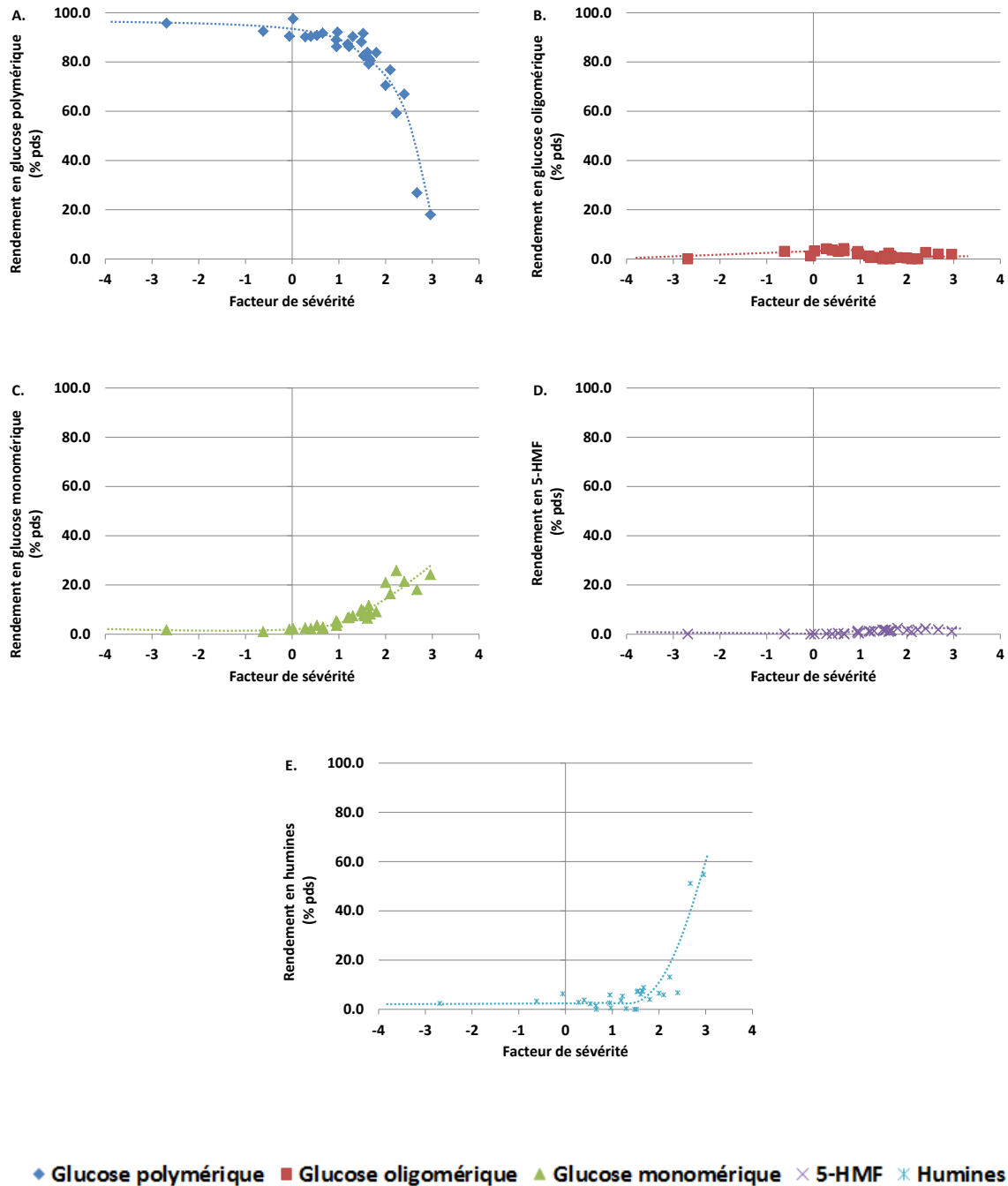


Figure III.4 : Rendements des sous-produits de la cellulose en fonction du facteur de sévérité (A/ glucose polymérique, B/ glucose oligomérique, C/ glucose monomérique, D/ 5-HMF, E/ « humines »)

III.4.Réactivité des substrats prétraités à l'hydrolyse enzymatique

En parallèle du travail de caractérisation des substrats prétraités et du travail de consolidation des données expérimentales obtenues sur les différentes cuissons acides, une étude complète d'évaluation de la réactivité de ces substrats à l'hydrolyse enzymatique a aussi été effectuée. Dans un premier temps, afin d'évaluer les différences de réactivité entre les substrats prétraités, le rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction du facteur de sévérité a été utilisé comme indicateur. Dans un second temps, comme l'objectif des procédés de conversion de la biomasse lignocellulosique en éthanol est de produire le maximum de sucres C₅ et C₆ pour l'étape de fermentation (*Danquah et al. (2011)*), les rendements cumulés en glucose et xylose après prétraitement et hydrolyse enzymatique seront présentés.

III.4.A.Rendements en glucose après hydrolyse enzymatique à 72h de la paille de blé prétraitée par cuisson acide

Les rendements d'hydrolyse enzymatique à 72 h sont fournis dans la Figure III.5. Ils ont été obtenus via un protocole d'hydrolyse standard qui est décrit dans le paragraphe II.4.B. Les résultats montrent que le rendement en glucose après 72h d'hydrolyse des substrats varie entre 12 et 52 % avec un maximum obtenu pour un facteur de sévérité compris entre 1.19 et 1.53. De plus, jusqu'à un facteur de sévérité d'environ 1.53, plus les conditions de cuisson acide sont sévères, plus la réactivité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique augmente. Cependant, à partir d'un facteur de 2.10, cette réactivité diminue drastiquement et passe de 52 à 12 % pds pour le facteur de sévérité le plus élevé. Cette diminution de réactivité débute pour des facteurs de sévérité où la formation d'humines est suspectée, validant partiellement l'hypothèse que ces humines jouent un rôle négatif majeur sur la réactivité des substrats.

Les résultats du test standard d'hydrolyse enzymatique sont donc fortement corrélés aux résultats d'analyses compositionnelles des substrats prétraités précédemment décrits. En effet, pour un facteur de sévérité compris entre 1.19 et 1.54, il a été vu que les hémicelluloses étaient totalement hydrolysées, que la cellulose n'était pas encore impactée par le prétraitement de cuisson acide et que la transformation des sucres monomériques en produits de dégradation restait très faible. L'augmentation de l'accessibilité de la cellulose et l'absence d'inhibiteurs permettent alors d'obtenir les meilleurs rendements à l'hydrolyse enzymatique. A partir d'un facteur de sévérité de 1.8, la réactivité à l'hydrolyse enzymatique chute fortement pour atteindre 12 %, et ce dans les conditions les plus sévères. Cette baisse de réactivité peut être associée, soit à la formation de produits de dégradation qui conduiraient soit à l'adsorption partielle des enzymes sur les humines, soit au recouvrement de la cellulose par les humines, ce qui bloquerait l'action ultérieure des enzymes.

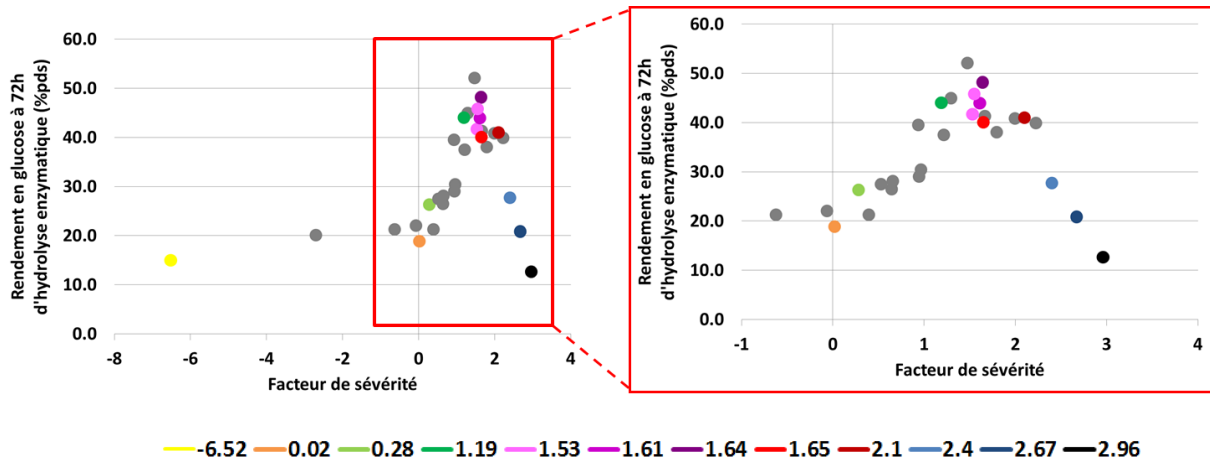


Figure III.5 : Réactivité des substrats prétraités en fonction du facteur de sévérité (en couleur, les substrats d'intérêts sélectionnés pour la suite de l'étude)

Il est très difficile de comparer ce travail aux autres études de la littérature car les performances d'hydrolyse enzymatique dépendent fortement des conditions opérées, notamment le choix du cocktail enzymatique, la dose d'enzymes appliquée ou la teneur en matière sèche du mélange réactionnel. Cependant, en restant qualitatif, il est possible de constater que les résultats obtenus dans cette étude suivent les mêmes tendances que ceux de la littérature. En effet, tous les articles montrent que les rendements à l'hydrolyse enzymatique sont optimaux pour des conditions opératoires de prétraitement semblables et correspondants aux conditions où le rendement en xylose monomérique est maximal (Ballesteros *et al.* (2008) ; Cara *et al.* (2008) ; Shekiro *et al.* (2014)).

III.4.B. Rendements cumulés en glucose et xylose après prétraitement et hydrolyse enzymatique

Les procédés de production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique utilisent de plus en plus de levures MGM permettant de fermenter les sucres à 6 atomes de carbone (principalement le glucose) et les sucres à 5 atomes de carbone (principalement le xylose) (Dasari and Berson (2007)). C'est pourquoi, il est intéressant de combiner les rendements en glucose et en xylose sous leur forme monomérique, après prétraitement à l'acide dilué et après le test d'hydrolyse enzymatique standard à 144h (Equation III.3). Le rendement cumulé (Rdt) pour chaque sucre est déterminé par :

$$\text{Equation III.3 : } Rdt = \frac{P_{mono}^{PT} + P_{mono}^{HE}}{P_{poly}} \times 100$$

avec : P_{poly} : quantité du sucre sous forme polymérique présent dans la biomasse initiale (g)

P_{mono}^{PT} : quantité de sucre sous forme monomérique libérée par cuisson acide (g)

P_{mono}^{HE} : quantité de sucre sous forme monomérique libérée après l'hydrolyse enzymatique (g).

Pour ne pas alourdir les graphiques, les rendements cumulés en glucose et xylose (Figure III.6) ont été réalisés sur les 12 échantillons d'intérêts qui ont la particularité d'englober l'ensemble du domaine de sévérité et qui seront détaillés plus spécifiquement dans la suite de ce chapitre. Dans cette figure, les rendements après prétraitement correspondent aux valeurs décrites dans la partie III.3.B. de

ce chapitre et les rendements à l'hydrolyse enzymatique ont été calculés sur la base des prélèvements à 144h qui ont ensuite été analysés en HPLC (cf. II.4.B).

Concernant le glucose monomérique (Figure III.6/A), le rendement cumulé global augmente de 30 à 80 %pds pour un facteur de sévérité de 0.02 et 1.53 respectivement. Ensuite, un plateau avec des rendements compris entre 76.5 et 80.5 %pds est observé pour des facteurs de sévérité compris entre 1.19 et 1.65. Enfin, le rendement total diminue pour atteindre 26.5 % pour les conditions opératoires les plus sévères ($F_0 = 2.96$). Pour le xylose monomérique (Figure III.6/B), les mêmes tendances sont observées et les rendements cumulés maximaux (environ 79 %pds) sont obtenus pour les facteurs de sévérités de 1.19 et 1.54. Pour des sévérités plus élevées, le rendement total en xylose diminue suite à leur transformation en produits de dégradation (furfural puis humines) dans l'étape de prétraitement.

Pour conclure, deux échantillons sur les 12 sélectionnés (hors doublons du point I-1.00, 60, 140) permettent de convertir environ 80 % de la cellulose initiale et 80 % du xylane initial. Ces deux échantillons I-1.00, 20, 140 et I-1.00, 60, 140 ont un facteur de sévérité de 1.19 et 1.54 respectivement. Leur seule différence étant le temps de séjour dans le réacteur de cuisson, il est cohérent de proposer l'échantillon I-1.00, 20, 140 comme optimal car le temps de séjour est trois fois inférieur à celui de l'échantillon I-1.00, 60, 140.

En dehors de l'optimisation des conditions opératoires, il est intéressant d'observer que, pour un facteur de sévérité de 0.02 (I-1.00, 20, 100), le rendement cumulé en xylose monomérique provient exclusivement de l'étape d'hydrolyse enzymatique et est relativement important (23.7 %pds) alors que le cocktail enzymatique principal utilisé (GC220) n'est pas reconnu pour sa forte activité en xylanase. Ce point pourrait être intéressant à discuter dans l'optique d'une optimisation complète de l'ensemble prétraitement + hydrolyse enzymatique.

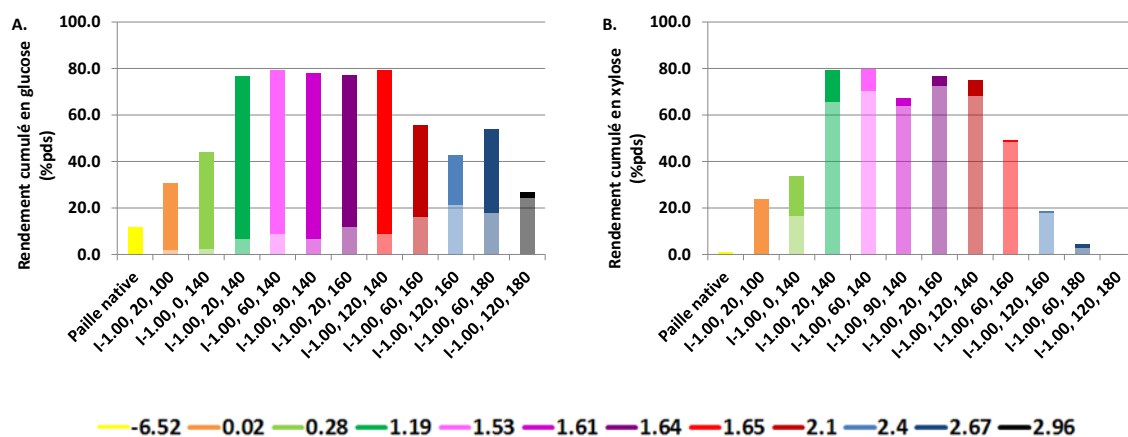


Figure III.6 : Rendements cumulés en glucose (A) et xylose (B) monomériques après prétraitement (zone claire) et après hydrolyse enzymatique (zone foncée)

Pour conclure sur cette première étape de l'étude, en ce qui concerne les rendements en glucose après hydrolyse enzymatique, ceux présentés dans la plupart des articles sont généralement plus élevés mais il n'est pas possible d'en tirer la moindre conclusion car les conditions d'hydrolyse enzymatique peuvent être totalement différentes (utilisation d'un cocktail enzymatique plus ou moins performant, quantité variable d'enzymes par gramme de cellulose dans le milieu réactionnel, etc...). Cependant, ces rendements sont optimaux pour des conditions opératoires de prétraitement

semblables, correspondant aux conditions pour lesquelles le rendement en xylose monomérique est maximal. En ce qui concerne les rendements cumulés du glucose et du xylose après prétraitement et hydrolyse enzymatique, les rendements sont maximaux pour une large plage de facteur de sévérité (de 1.19 à 1.53). Se positionner à des facteurs de sévérité bas afin de produire le moins possible de produits de dégradation semble alors pertinent car ces derniers sont connus pour être de forts inhibiteurs de la fermentation (*Mahesh et al. (2017)*).

III.5.Impact des conditions opératoires de prétraitement sur les caractéristiques physico-chimiques des substrats en relation avec leurs réactivités à l'hydrolyse enzymatique

Comme cela a été détaillé dans le chapitre I « Etat de l'art », plusieurs techniques de caractérisation des substrats natifs et prétraités peuvent être envisagées afin de décrire et comprendre l'impact d'un prétraitement sur la biomasse lignocellulosique et donc sur sa réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Cependant, l'utilisation de ces techniques ne fait pas consensus dans la littérature. De plus, comme différentes techniques peuvent être utilisées indépendamment les unes des autres, peu d'études ont appliqué une approche multi-technique exhaustive pour améliorer cette compréhension. C'est pourquoi, malgré une mise en œuvre compliquée, une méthodologie de caractérisation basée sur une approche multi-technique a été réalisée durant la thèse (en couplage avec la thèse de Joël Passicouset) (Figure III.7). Par exemple, à l'échelle macroscopique, la morphologie des fibres et des tissus peut être analysée par granulométrie laser ou par microscopie (microscopie confocale, microscopie électronique). A plus petite échelle (inférieure au micromètre), l'état de porosité et le taux de cristallinité peuvent être déterminés respectivement par physisorption d'azote et par RMN, tandis que les paramètres chimiques peuvent être suivis par infra-rouge. Dans cette étude, certaines caractérisations des substrats prétraités ont été réalisées dans le cadre de la thèse de J. Passicouset, intitulée « Descripteurs physico-chimiques de biomasses lignocellulosiques en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in situ ».

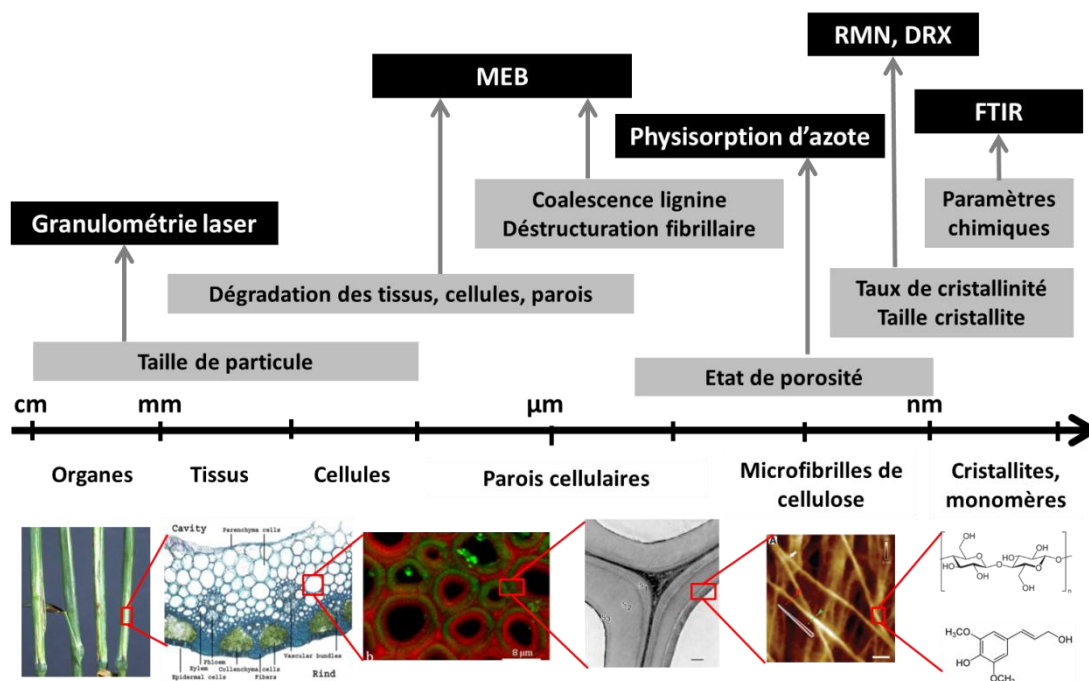


Figure III.7 : Approche multi-technique de caractérisation de la biomasse lignocellulosique (Passicouset (2018))

III.5.A.Modification chimique de la paille de blé prétraitée

La partie III.3 de ce chapitre a montré que le prétraitement à l'acide dilué conduit, dans un premier temps, à l'hydrolyse des hémicelluloses puis à l'hydrolyse de la cellulose pour des conditions

de prétraitement de plus en plus sévères. Cela amène, pour des conditions de plus en plus drastiques, à l'enrichissement en sucres, puis en produits de dégradation de la fraction liquide (jus) et à une diminution de la fraction solide (substrat lavé) comme le montre la Figure III.8. En effet, la masse de la fraction solide résiduelle est divisée de moitié pour un facteur de sévérité d'environ 2. Cette diminution de la fraction solide après prétraitement, due à la solubilisation des hémicelluloses et des extractibles présents dans la biomasse native, est connue dans la littérature. Par exemple, *Qin et al. (2012)* obtiennent une récupération de solide après prétraitement de 49.7 %pds pour leur jeu de conditions opératoires le plus sévère (190°C, 30 min, pH = 1.2, soit un facteur de sévérité F_0 égal à 3 (Equation III.2)). En comparaison, le point le plus extrême de l'étude présentée ici (*I-1.00, 120, 180*, pH = 1.3, soit un facteur de sévérité F_0 égal à 3.23 sur la base de la même équation que *Qin et al. (2012)*) conduit à une récupération de solide de 39.9 %pds.

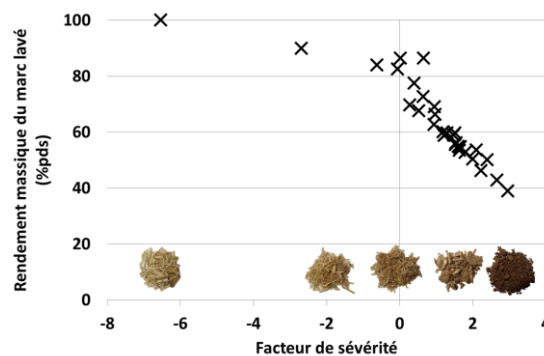


Figure III.8 : Evolution du rendement massique de substrat lavé en fonction du facteur de sévérité

A l'échelle macroscopique, il a également été observé un assombrissement marqué du substrat prétraité avec l'augmentation du facteur de sévérité. Cet assombrissement est probablement dû à la production de composés de dégradation qui se condensent et/ou polymérisent sur le substrat (*Stevenson (1994)*). La mesure de la teneur en lignine Klason (résidu solide insoluble) confirme par ailleurs ce point. En effet, après détermination de la fraction de lignine Klason dans les substrats lavés récupérés après prétraitement (paille native + points *I-1.00, 60, 140* ; *I-1.00, 10, 180* ; *I-1.00, 20, 140* et *I-1.00, 60, 180*), il semblerait que le prétraitement conduise, dans un premier temps, à la solubilisation d'une partie de la lignine présente initialement. En effet, alors que la biomasse native contient 7.5 g de lignine insoluble pour 40 g de matière sèche, la valeur diminue à 6.7 g pour un facteur de sévérité de 1.53, soit une perte de 0.8 g (Figure III.9/A). A l'inverse, pour des sévérités plus élevées, la quantité de lignine Klason réaugmente pour atteindre une valeur de 9.8 g pour un facteur de sévérité de 2.67. Il y a donc eu production de composés insolubles supplémentaires durant les cuissons les plus sévères.

Pour préciser la composition chimique du substrat et l'impact du prétraitement, une analyse infrarouge par transformée de Fourier (FTIR) en mode Réflectance Totale Atténuée (ATR) a été réalisée et les résultats sont présentés sur la Figure III.9/B. La comparaison des différents spectres indique trois bandes caractéristiques à 1510, 1600 et 1700 cm^{-1} . Ces différentes longueurs d'ondes peuvent être attribuées à des fonctions chimiques qui correspondent respectivement aux liaisons C=C aromatique, C=O ou C-C conjugué et C=O (acide carboxylique saturé). L'ATR-IR n'étant pas une technique quantitative, il n'est pas possible de connaître les proportions relatives de chacune de ces

fonctions. Cependant, il est possible de conclure que les composés insolubles formés durant la cuisson sont de type aromatique et aliphatique.

L'augmentation de la teneur relative en lignine insoluble (lignine Klason) lorsque la sévérité de prétraitement augmente, est connue dans la littérature et attribuée à la recondensation / repolymérisation des hydrates de carbone et/ou de la lignine entraînant la formation d'« humines » (Li et al. (2007) ; Foston and Ragauskas (2010)). De manière similaire, certains auteurs ont pratiqué des analyses infrarouges qui fournissent des résultats semblables à ceux présentés ici. En effet, en dehors du rôle hydrolysant des polysaccharides de la cuisson acide, ce type de prétraitement impacte également les groupements fonctionnels spécifiques de la lignine, ce qui est visible, au moins qualitativement, par l'augmentation de l'intensité des pics caractéristiques (Chum et al. (1990) ; Schell et al. (2003) ; Donohoe et al. (2008) ; Chen et al. (2011)). La formation d'humines semble donc primordiale à étudier et fera l'objet d'une étude spécifique présentée dans le Chapitre V.

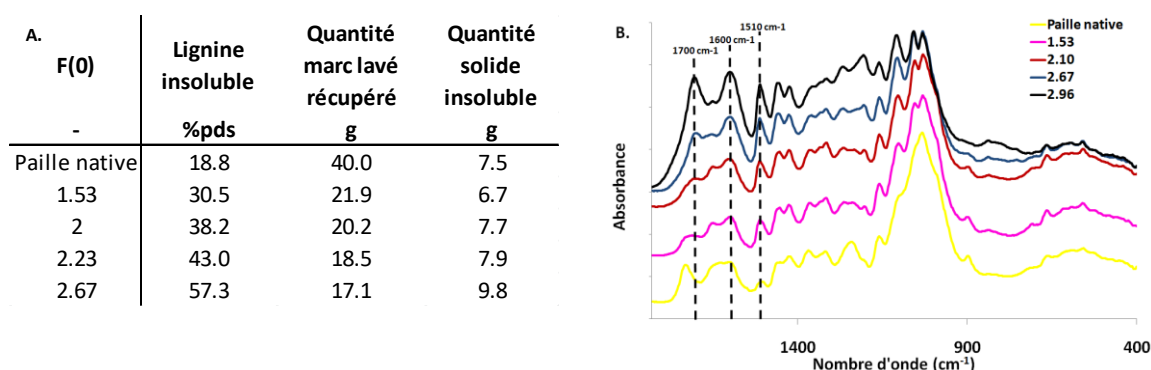


Figure III.9 : Evolution de la teneur en lignine insoluble en fonction du facteur de sévérité (A) et des spectres infrarouges à transformée de Fourier correspondants (B)

III.5.B.Modification morphologique de la paille de blé prétraitée

La distribution granulométrique des substrats prétraités (Figure III.10/A) permet aussi de se rendre compte de l'effet du prétraitement sur la morphologie du substrat, même si cela reste à nouveau qualitatif. Pour l'ensemble des échantillons précuits, la distribution est monomodale ce qui indique une certaine homogénéité particulière des échantillons. Trois familles de distribution peuvent être observées. En effet, les distributions sont similaires pour des facteurs de sévérité inférieurs à 1.64, compris entre 1.65 et 2.67 et supérieurs à 2.67. Pour ces trois familles, la largeur de la distribution tend à augmenter lorsque la sévérité augmente.

Comme expliqué dans la partie II.4.C.2.b de ce manuscrit, la distribution granulométrique permet de calculer un diamètre moyen des particules pour chaque échantillon. Dans le cas du prétraitement à l'acide dilué sur de la paille de blé 2 mm, ce diamètre moyen diminue avec l'augmentation du facteur de sévérité (Figure III.10/B). En effet, ce dernier passe de 1058 à 170 μm , respectivement pour la paille native et pour la paille traitée avec un facteur de sévérité 2.96. Cette diminution de taille de particules peut être induite par l'hydrolyse progressive et successive des hémicelluloses puis de la cellulose qui va conduire à une fragilisation de la matrice lignocellulosique et donc à sa fragmentation au niveau macroscopique (Figure III.11).

En termes de réactivité à l'hydrolyse enzymatique (Figure III.10/C), il semblerait que, pour une paille native broyée à 2 mm, la diminution de la taille des particules, pour des sévérités inférieures

à 1.53, permet d'améliorer le rendement en glucose. A l'inverse, pour des sévérités plus élevées, le rendement diminue alors même que la taille des particules continue à se réduire. Un autre phénomène doit donc expliquer cette perte de réactivité.

En conséquence, ce paramètre ne semble pas pertinent comme descripteur majeur de la relation entre la morphologie des substrats prétraités et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique.

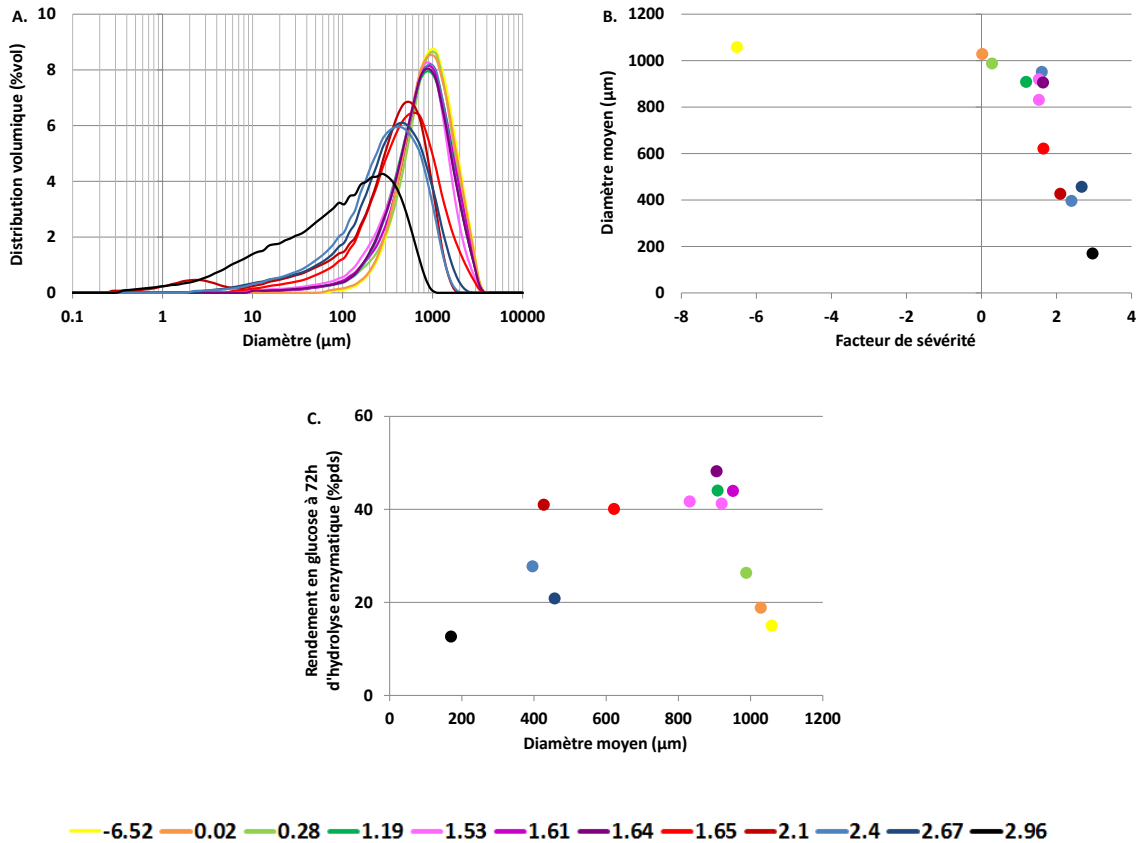


Figure III.10 : Distribution volumique de la taille des particules en fonction du diamètre de particule (A) ; Diamètre moyen en fonction du facteur de sévérité (B) ; Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique en fonction du diamètre moyen des particules (C)

Comme vu précédemment, la distribution volumique de la taille des particules et le diamètre moyen de ces dernières semblent très sensibles aux conditions opératoires de cuisson. Ce même type d'observations a été fait par *Chen et al. (2011)* sur de la bagasse de canne à sucre. Ils constatent une distribution volumique monomodale pour le substrat non traité, centrée autour de 525 µm. Lorsque la bagasse subit une cuisson et que la sévérité du prétraitement augmente, cela entraîne une dégradation de la taille moyenne et un élargissement de sa distribution. Ainsi, le diamètre moyen des particules diminue de 525 à 150 µm pour la bagasse native et prétraitée à 190°C durant 10 min respectivement.

En ce qui concerne l'impact de la taille des particules après prétraitement sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique, il semblerait que ce descripteur ne soit pas particulièrement pertinent, ou alors de second ordre. En effet, ce paramètre ne fait pas l'unanimité dans la littérature. Par exemple, pour de la cellulose pure et du coton, *Shewale et al. (1979)* et *Sinitsyn et al. (1989)* n'observent pas d'amélioration de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique lorsque la taille moyenne des particules passe de 90 à 38 µm et de 32 à 17 µm respectivement. A l'inverse, toujours pour de la cellulose pure,

Gan et al. (2003) et *Dasari and Berson (2007)* constatent une nette amélioration de la réactivité pour des tailles de particules passant de 82 à 38 μm et de 590 à 33 μm respectivement. Il est tout de même important de signaler que ces résultats doivent être pris avec précaution car l'outil de broyage (broyeur à billes) utilisé pour réduire la taille initiale des particules peut aussi impacter d'autres paramètres structuraux du substrat et donc leur réactivité. De plus, toutes ces études ont été réalisées sur des substrats contenant très majoritairement de la cellulose. Or les prétraitements, qu'ils soient mécaniques comme le broyage, ou thermochimique comme la cuisson acide, peuvent aussi modifier les fractions de lignine et d'hémicelluloses dans des substrats plus complexes. Ces modifications de composition peuvent entraîner des effets collatéraux sur la réactivité de ces derniers (*Zhang et al. (2004)*).

L'analyse en microscopie électronique à balayage avec un grossissement 50 et 20000 permet d'observer la déstructuration fibrillaire induite par le prétraitement de cuisson acide mais également la modification surfacique du substrat (Figure III.11). En effet, pour un facteur de sévérité de 0.02, la surface du substrat est lisse mais un aspect rugueux commence à apparaître avec l'augmentation de la sévérité. Pour un facteur de sévérité de 1.64, des petites sphères (d'environ 10 nm) apparaissent à la surface du substrat. Leur taille grossit ensuite avec le facteur de sévérité (100 nm pour $F_0 = 2.1$). Enfin pour le substrat le plus fortement prétraité, il semblerait que l'ensemble de la surface soit recouvert de ces sphères ce qui donne un aspect particulièrement rugueux. Ces sphères peuvent être attribuées aux humines (ou pseudo-lignine) qui se forment à forte sévérité, se condensent, au moins en partie, sur le substrat et inhibent la réactivité à l'hydrolyse enzymatique. A nouveau, le lecteur est renvoyé au Chapitre V pour l'étude spécifique concernant la formation des humines.

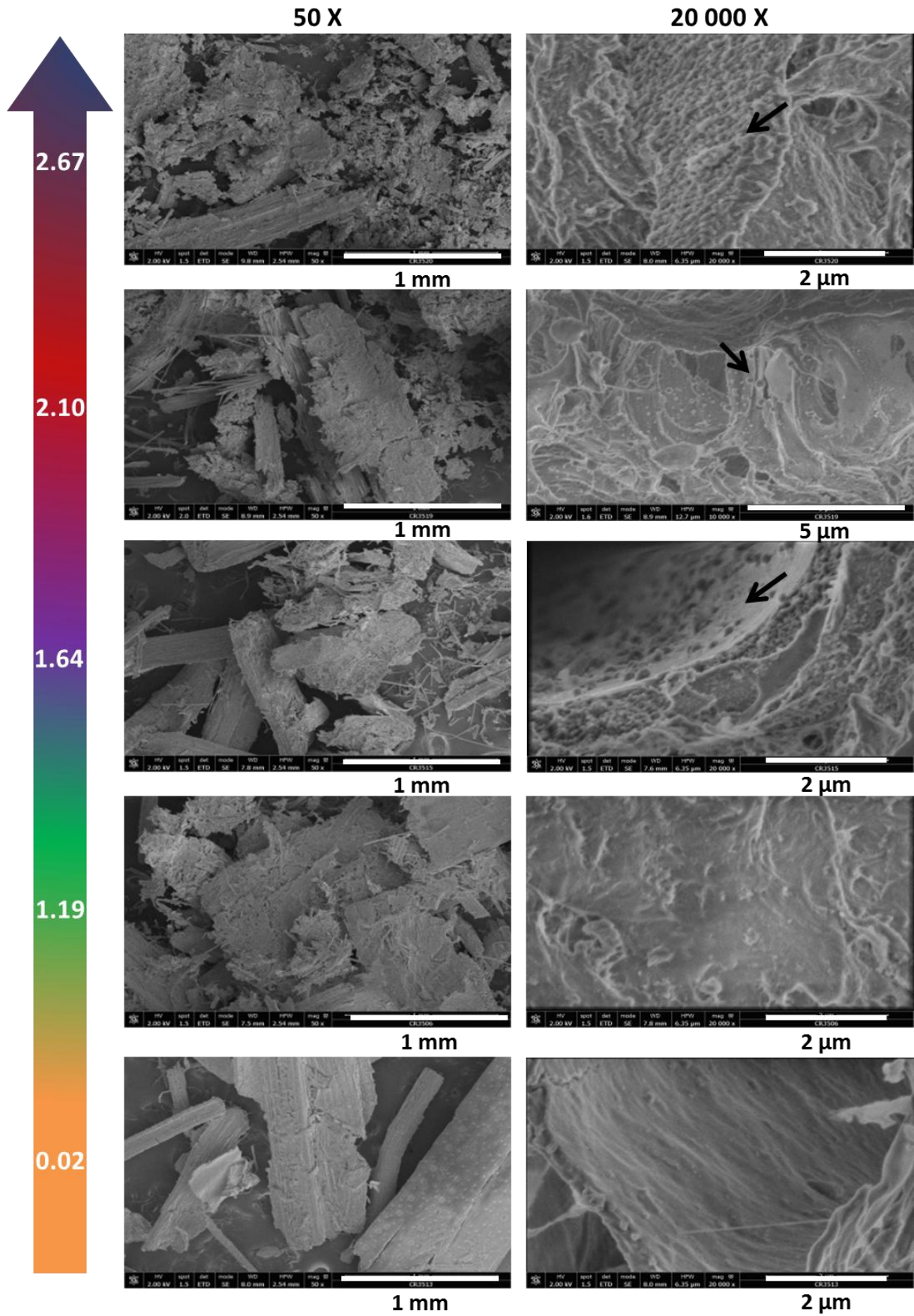


Figure III.11 : Images par microscopie électronique à balayage des substrats prétraités

III.5.C.Modification de la porosité de la paille de blé prétraitée

L'analyse par physisorption d'azote sur le substrat natif et sur les substrats prétraités permet d'obtenir des informations sur l'état de porosité des différents échantillons. Cependant, cette technique n'est pas forcément optimale pour des échantillons hétérogènes comme la biomasse lignocellulosique, car ces derniers doivent être secs pour pouvoir être analysés. Or le séchage peut entraîner des effets non désirés comme l'effondrement d'une partie des pores. C'est pourquoi, dans cette étude, il a été décidé, par précaution, de lyophiliser les substrats (Hames *et al.* (2008); Karimi and Taherzadeh (2016)) afin d'éviter l'affaissement de la matrice lignocellulosique provoqué par un séchage à l'étuve (Piccolo *et al.* (2010)). Malgré cet inconvénient, la physisorption d'azote est une technique intéressante car elle permet de sonder la mésoporosité, ce qui est une échelle très adaptée par rapport aux tailles des enzymes (environ 5 nm) (Henriksson *et al.* (1996)).

En ce qui concerne la distribution poreuse des échantillons précuits (Figure III.12), le volume mésoporeux (2 à 50 nm) augmente avec la sévérité du prétraitement (augmentation des aires cumulées), mais le diamètre poreux moyen reste inchangé (environ 10 nm). Le fait que le diamètre moyen reste constant laisse supposer que l'augmentation de la sévérité de prétraitement permet de libérer des pores initialement présents mais obstrués, ou qu'elle entraîne la création de pores ayant la même taille, par exemple par hydrolyse des hémicelluloses. Un second type de porosité (entre 20 et 50 nm) pour les deux échantillons fortement prétraités (2.67 et 2.96) est également visible. Cette création de pores de plus grande taille pourrait être attribuée à deux phénomènes différents : soit à l'hydrolyse partielle de la cellulose, soit à la formation des humines, supposées intrinsèquement poreuses (Hu *et al.* (2012)) ou engendrant une porosité de par leur agencement et leur rugosité.

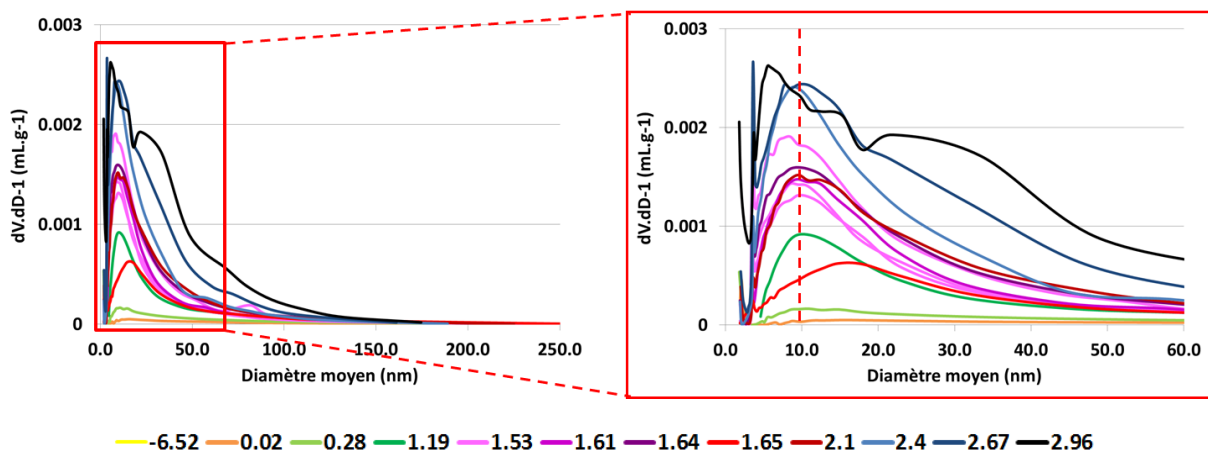


Figure III.12 : Distribution du volume poreux des substrats prétraités

En ce qui concerne la surface spécifique, elle augmente drastiquement avec l'augmentation du facteur de sévérité et passe de 1.19 à 22.5 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ pour des sévérités de 0.02 et 2.96 respectivement (Figure III.13/A). Cette augmentation de surface spécifique peut être attribuée, dans un premier temps, à l'hydrolyse des hémicelluloses ($F_0 < 1.53$), comme le montre la Figure III.13/B, puis à l'hydrolyse de la cellulose ($F_0 > 1.53$). Pour les sévérités les plus élevées, la présence d'humines peut aussi être la cause de l'augmentation de la surface de 9 à 23 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$, du fait de leur structure supposée poreuse (et développant ainsi une surface supplémentaire), mais aussi du fait de leur dépôt sur la surface des substrats, ce qui augmente alors la rugosité de surface, comme vu précédemment par analyse MEB.

La mesure de la surface spécifique semble être un indicateur intéressant pour comprendre l'impact du prétraitement sur le substrat. En étudiant l'influence de cette augmentation de surface sur le rendement à l'hydrolyse enzymatique (Figure III.13/C), il est possible de distinguer tout d'abord une amélioration de la réactivité des substrats avec l'augmentation de la surface spécifique. En effet, la réactivité augmente de 15 à 44 %pds pour une surface variant de 1 à 5 m².g⁻¹. Dans un second temps, la surface continue de croître mais la réactivité n'est plus améliorée. Finalement, pour les facteurs de sévérité les plus élevés, une forte diminution de la réactivité est observée en parallèle d'une forte augmentation de la surface, ce qui pourrait paraître étonnant. En réalité, ces variations pourraient s'expliquer simplement en faisant la distinction entre surface totale et « surface cellulosique accessible aux enzymes » qui ne représente alors qu'une sous-partie de la surface totale. En effet, à basse sévérité, la cuisson acide permet d'hydrolyser les hémicelluloses ce qui permet de libérer de la surface totale (qui augmente un peu) mais surtout de libérer la surface cellulosique (qui augmente beaucoup). D'où les gains observés en hydrolyse enzymatique. A forte sévérité, la production et le dépôt d'humines sur le solide entraînent l'augmentation toujours plus importante de la surface totale mais la surface cellulosique, elle, reste au mieux constante, voire diminue à cause du masquage par les dépôts d'humines. Il est alors possible de considérer que ces humines gênent l'accessibilité de la cellulose aux enzymes, ou bien qu'une partie des enzymes s'adsorbe sur ces dernières et est alors « perdue » pour l'hydrolyse de la cellulose.

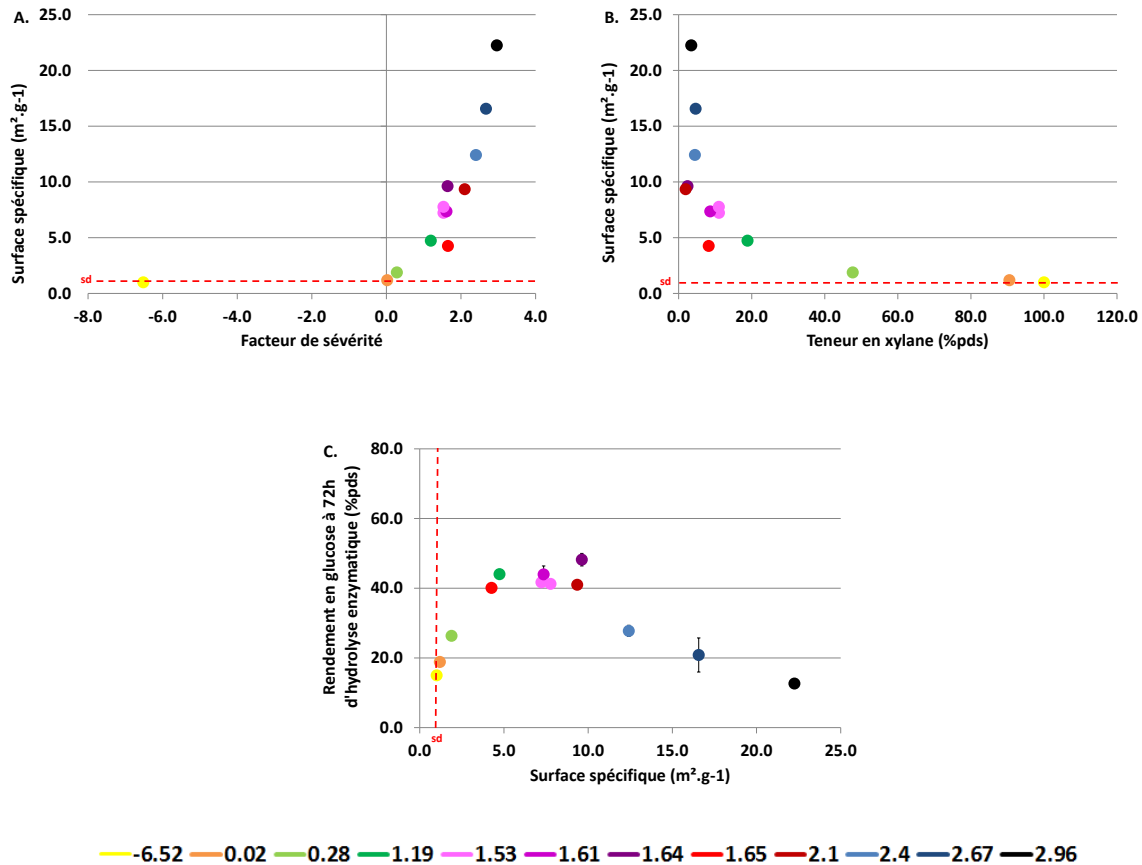


Figure III.13 : Surface spécifique en fonction du facteur de sévérité (A) ; Surface spécifique en fonction de la teneur en xylane des substrats prétraités (B) ; Surface spécifique en fonction du rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique (C)

III.5.D.Modification structurale de la paille de blé

A l'échelle nanométrique, l'indice de cristallinité a largement été étudié (cf : I.3.C.2). Ce descripteur fait pourtant polémique quant à sa pertinence entre les propriétés physico-chimiques des substrats prétraités et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique. En effet, les résultats vont dépendre de la technique analytique utilisée, selon si l'intérêt se porte sur la cristallinité du substrat dans sa globalité (DRX) ou sur la cristallinité de la fraction cellulosique (RMN du solide) (*Fan et al. (1980) ; Thompson et al. (1992) ; Sung Bong et al. (2011) ; Gonçalves et al. (2015)*). Dans cette étude, il a été choisi d'utiliser la RMN du solide pour mesurer l'indice de cristallinité de la cellulose.

En suivant l'évolution de cet indice de cristallinité en fonction du facteur de sévérité (Figure III.14/A), il est possible de constater que, pour un facteur de sévérité inférieur à 1.19, l'indice n'évolue pas. Par la suite, cet indice passe de 28 à 42 % pour un facteur de sévérité de 1.19 et 2.1 respectivement, puis stagne. Cette évolution de la cristallinité peut s'expliquer par l'évolution de la composition chimique des substrats prétraités en fonction des conditions opératoires de prétraitement. En effet, pour un facteur de sévérité inférieur à 1.19, les hémicelluloses s'hydrolysent progressivement mais la cellulose n'est pas impactée par le prétraitement, ce qui explique la constance de l'indice de cristallinité. Pour un facteur de sévérité supérieur à 1.19, l'augmentation de la cristallinité de la cellulose s'explique par l'hydrolyse de la cellulose amorphe par rapport à la cellulose cristalline. Finalement, lorsque la proportion de cellulose amorphe est totalement hydrolysée, l'indice de

crystallinité stagne à nouveau même si la proportion globale en cellulose continue à diminuer. Au niveau du rendement à l'hydrolyse enzymatique, aucune corrélation n'existe entre l'indice de cristallinité et le rendement à l'hydrolyse enzymatique (Figure III.14/B). La cristallinité de la cellulose au sein de notre substrat peut donc être un bon descripteur du prétraitement mais pas de la réactivité à hydrolyse enzymatique.

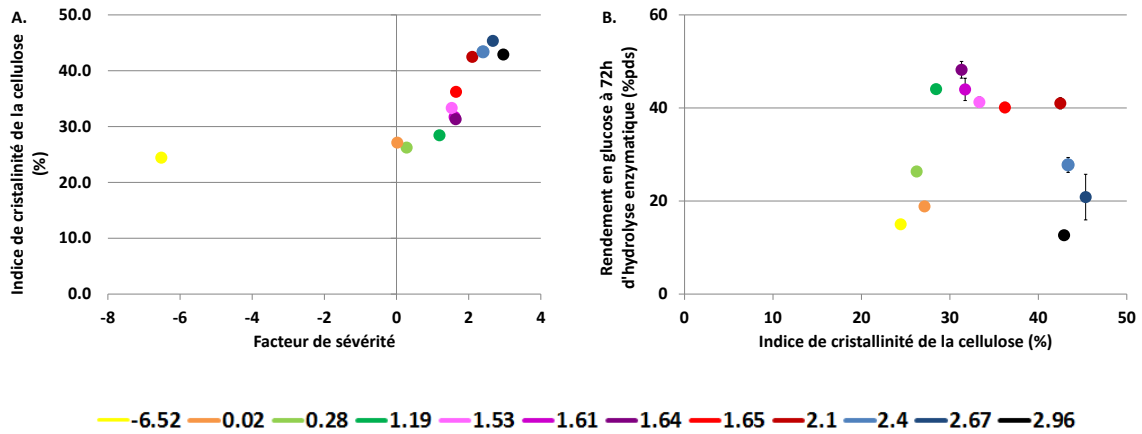


Figure III.14 : Evolution de l'indice de cristallinité en fonction du facteur de sévérité (A) et relation entre le rendement à l'hydrolyse enzymatique et l'indice de cristallinité (B)

III.6. Conclusion générale de l'étude

Dans cette étude, différents points expérimentaux réalisés en cuisson acide de paille de blé ont permis de générer plusieurs substrats prétraités possédant des caractéristiques chimiques variées. Les résultats expérimentaux obtenus dans ce travail sont en accord avec différents travaux précédemment cités dans la littérature, ce qui permet de les valider et de les confronter entre eux. Cependant, plusieurs atouts de l'étude présentée dans ce chapitre sont à relever ici. Tout d'abord, la base d'échantillon est très large (29 substrats prétraités) avec un domaine de sévérité très large, ce qui est suffisamment rare dans la littérature pour être noté. Ensuite, l'exploitation des cuissons a été réalisée en effectuant des bilans matière, et non pas en effectuant seulement une caractérisation des substrats prétraités. Enfin une approche multi-technique a été employée pour pouvoir appuyer les observations faites, et ce à plusieurs échelles de description.

En ce qui concerne les modifications chimiques des substrats prétraités et leur impact sur la réactivité, il apparaît que la diminution drastique de la teneur en xylane (composé majoritaire des hémicelluloses) permet une meilleure accessibilité de la cellulose aux enzymes et donc une meilleure réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique pour des facteurs de sévérité inférieurs à 1.53. Pour des facteurs de sévérité supérieurs à cette valeur, la cellulose s'hydrolyse progressivement et la réactivité diminue fortement. Cette diminution semble liée à l'apparition d'un résidu solide insoluble (nommé humines ou pseudo-lignine) qui conduirait à l'adsorption non productive des enzymes sur sa surface et/ou au fait que le dépôt de ce résidu sur le substrat masquerait tout ou partie de la cellulose aux enzymes.

A l'échelle macroscopique, la distribution granulométrique des échantillons semble être un bon indicateur de la sévérité de la cuisson. En effet, la taille des particules diminue lorsque la sévérité du prétraitement augmente, ce qui est certainement dû à l'élimination des hémicelluloses qui jouent le rôle de ciment au sein de la matrice lignocellulosique. L'élimination de ces hémicelluloses fragilise la structure et facilite donc la fragmentation de la matrice. Cependant cet indicateur est sûrement dépendant du type de substrat et du prétraitement utilisés. Par contre, la granulométrie ne semble pas vraiment liée à la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique.

A l'échelle nanométrique, l'état de porosité déterminé par physisorption d'azote, notamment la surface spécifique, est significativement impactée par le prétraitement et semble aussi influencer la réactivité du substrat mais de manière contradictoire. Les observations effectuées concluent à la non-pertinence de ce critère qui devrait plutôt être remplacé par une « surface cellulosique accessible aux enzymes ». La technique analytique permettant cette caractérisation reste encore à trouver.

Concernant la cristallinité de la cellulose mesurée par RMN, il a été vu que ce paramètre pouvait être utilisé pour décrire l'effet du prétraitement à l'acide dilué sur le substrat mais n'avait pas d'influence sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique. L'ensemble des observations relatives à ce chapitre sont résumées dans la Figure III.15.

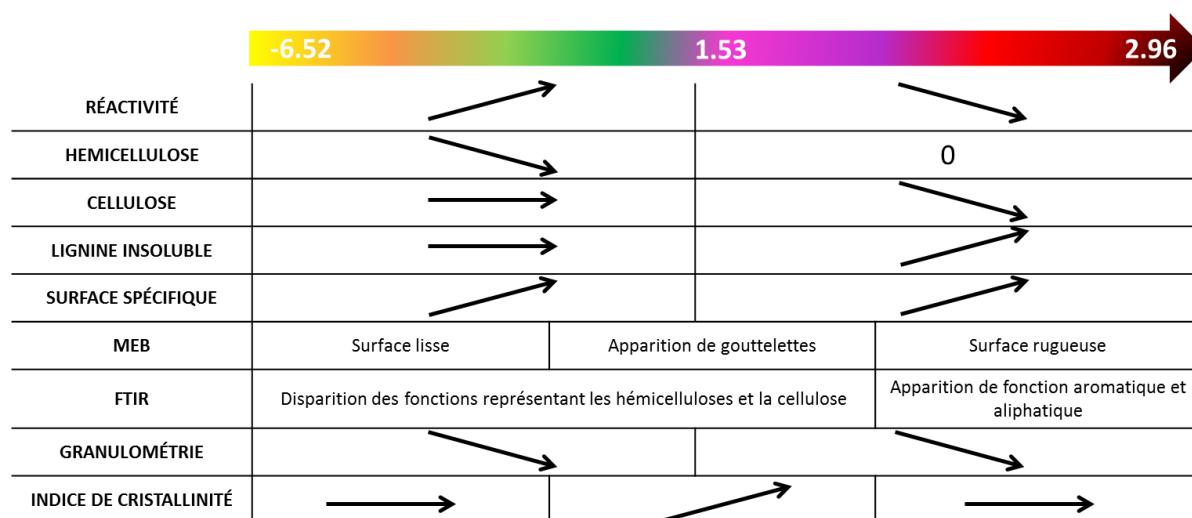


Figure III.15 : Résumé sur les relations morphologie/réactivité des substrats prétraités après cuisson acide

Un des points importants, encore mal expliqué, concerne l'origine de la formation des humines lorsque les cuissons sont particulièrement sévères. En effet, plusieurs analyses tendent à montrer que la cuisson acide conduit à la formation d'humines à forte sévérité, humines qui semblent être responsables de la chute de réactivité des substrats en hydrolyse enzymatique. Par exemple, l'analyse de la lignine Klason montre une augmentation des solides résiduels après hydrolyse acide dans les substrats prétraités, cette augmentation ne pouvant être expliquée que par la formation de nouveaux composés insolubles qui se déposent sur le substrat prétraité. Cette apparition des humines est confirmée par les analyses par microscopie MEB qui permettent d'observer la formation de gouttelettes à la surface des substrats fortement prétraités et par les analyses de surface BET qui confirment un fort accroissement de la surface globale lorsque ces gouttelettes se forment. De plus l'analyse FTIR confirme que ces composés insolubles sont riches en fonctions aromatiques et aliphatiques. Toutes ces observations confirment l'importance du rôle des humines dans la réactivité des substrats issus de la cuisson acide. Une étude spécifique, décrite dans le Chapitre V, a donc été initiée en fin de thèse pour essayer d'améliorer la compréhension des mécanismes relatifs à la formation de ces produits dans des conditions sévères de cuisson.

La réalisation d'une base expérimentale pour le prétraitement par cuisson acide a aussi permis de produire des substrats prétraités de paille possédant différentes propriétés physico-chimiques. Cette base peut maintenant être utilisée pour étudier plus spécifiquement la détente explosive ayant lieu dans un prétraitement par explosion à la vapeur. L'objectif est alors de voir si cette détente a un impact sur la qualité des substrats prétraités et, surtout, sur leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Ce travail, réalisé en milieu de thèse, est décrit dans le chapitre IV suivant.

III.7.Références

- Aguilar *et al.* (2002) Aguilar R., Ramírez J., Garrote G. and Vázquez M. (2002) **Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse.** *Journal of Food Engineering* **55**: 309–318.
- Ballesteros *et al.* (2008) Ballesteros I., Ballesteros M., Manzanares P. et al. (2008) **Dilute sulfuric acid pretreatment of cardoon for ethanol production.** *Biochemical Engineering Journal* **42**: 84–91.
- Cara *et al.* (2008) Cara C., Ruiz E., Oliva J. M., Sáez F. and Castro E. (2008) **Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification.** *Bioresource Technology* **99**: 1869–1876.
- Chen *et al.* (2011) Chen W. H., Tu Y. J. and Sheen H. K. (2011) **Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating.** *Applied Energy* **88**: 2726–2734.
- Chum *et al.* (1990) Chum H. L., Johnson D. K., Black S. K. and Overend R. P. (1990) **Pretreatment-Catalyst effects and the combined severity parameter.** *Applied biochemistry and biotechnology* **1**: 1–14.
- Danquah *et al.* (2011) Danquah M., Liu B. and Haru R. (2011) **Analysis of process configurations for bioethanol production from microalgal biomass.** *In Progress in Biomass and Bioenergy Production*
- Dasari and Berson (2007) Dasari R. K. and Berson E. R. (2007) **The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries.** *Applied biochemistry and biotechnology* **137**: 289–299.
- Donohoe *et al.* (2008) Donohoe B. S., Decker S. R., Tucker M. P., Himmel M. E. and Vinzant T. B. (2008) **Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment.** *Biotechnology and bioengineering* **101**: 913–925.
- Fan *et al.* (1980) Fan L. T., Lee Y. H. and Beardmore (1980) **Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis.** *Biotechnology and bioengineering* **22**: 177–199.
- Foston and Ragauskas (2010) Foston M. and Ragauskas A. J. (2010) **Changes in lignocellulosic supramolecular and ultrastructure during dilute acid pretreatment of Populus and switchgrass.** *Biomass and Bioenergy* **34**(12): 1885–1895.

- Gan et al. (2003)* Gan Q., Allen S. and Taylor G. (2003) **Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental study and mathematical modelling.** *Process Biochemistry* **38**: 1003–1018.
- Garlock et al. (2011)* Garlock R. J., Balan V., Dale B. E. et al. (2011) **Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars.** *Bioresource Technology* **102**: 11063–11071.
- Gaset et al. (1981)* Gaset A., Rigal L., Paillassa G., Salome J. P. and Fleche G. (1981) **Procédé de fabrication du 5-hydroxymethylfurfural.** FR2551754A1.
- Gonçalves et al. (2015)* Gonçalves F. A., Ruiz H. A., Dos Santos, E. S., Teixeira J. A. and De Macedo, G. R. (2015) **Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis.** *Industrial Crops and Products* **77**: 1–12.
- Hames et al. (2008)* Hames B., Ruiz R., Scarlata C. et al. (2008) **Preparation of samples for compositional analysis.**
- Henriksson et al. (1996)* Henriksson H., Ståhlberg J., Isaksson R. and Pettersson G. (1996) **The active sites of cellulases are involved in chiral recognition: A comparison of cellobiohydrolase 1 and endoglucanase 1.** *FEBS Letters* **390**: 339–344.
- Hu et al. (2012)* Hu F., Jung S. and Ragauskas A. (2012) **Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis.** *Bioresource Technology* **117**: 7–12.
- Juan et al. (2018)* Juan H., Caoxing H., Chenhuan L. et al. (2018) **Elucidation of structure-inhibition relationship of monosaccharides derived pseudo-lignin in enzymatic hydrolysis.** *Industrial Crops and Products* **113**: 368–375.
- Karimi and Taherzadeh (2016)* Karimi K. and Taherzadeh M. J. (2016) **A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity.** *Bioresource Technology* **200**: 1008–1018.
- Li et al. (2007)* Li J., Henriksson G. and Gellerstedt G. (2007) **Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion.** *Bioresource Technology* **98**: 3061–3068.
- Lopes de Souza et al. (2012)* Lopes de Souza R., Yu H., Rataboul F. and Essayem N. (2012) **5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) production from hexoses: Limits of heterogeneous catalysis in hydrothermal conditions and potential of concentrated aqueous organic acids as reactive solvent system.** *Challenges* **3**: 212–232.

- Mahesh et al. (2017)* Mahesh K. M., Kumar Kharia S., Prasad S. et al. (2017) **Furfural and 5-HMF Potent fermentation inhibitors and their removal techniques.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **6**: 2060–2066.
- Passicousset (2018)* Passicousset J. (2018) **Descripteurs physico-chimiques de biomasses lignocellulosiques en hydrolyse enzymatique : vers une caractérisation in situ.** *IFP Energies Nouvelles*.
- Piccolo et al. (2010)* Piccolo C., Wiman M., Bezzo F. and Lidén G. (2010) **Enzyme adsorption on SO₂ catalyzed steam-pretreated wheat and spruce material.** *Enzyme and microbial technology* **46**: 159–169.
- Qin et al. (2012)* Qin L., Liu Z. H., Li B. Z., Dale B. E. and Yuan Y. J. (2012) **Mass balance and transformation of corn stover by pretreatment with different dilute organic acids.** *Bioresource Technology* **112**: 319–326.
- Roberto et al. (2003)* Roberto I. C. , Mussatto S. I. and Rodrigues R. C. (2003) **Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor.** *Industrial Crops and Products* **17**: 171–176.
- Schell et al. (2003)* Schell D. J., Farmer J., Newman M. and McMillan J. D. (2003) **Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor: investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids.** *Appl Biochem Biotechnol.* **105**: 69–85.
- Selig et al. (2007)* Selig M. J., Viamajala S., Decker S. R. et al. (2007) **Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Biotechnology progress* **23**: 1333–1339.
- Shekiro et al. (2014)* Shekiro J., Kuhn E. M., Nagle N. J. et al. (2014) **Characterization of pilot-scale dilute acid pretreatment performance using deacetylated corn stover.** *Biotechnology for biofuels* **71**: 23–32.
- Shewale et al. (1979)* Shewale J. G. and Sadana J. C. (1979) **Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials by *Sclerotium rolfsii* culture filtrate for sugar production.** *Canadian Journal of Microbiology* **25**: 773–783.
- Sinitsyn et al. (1989)* Sinitsyn A. P., Mitkevich O. V., Gusakov A. V. and 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.

- Stevenson (1994)* Stevenson F. J (1994) **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions.** Wiley. New York.
- Sung Bong et al. (2011)* Sung Bong K., Ja Hyun L., Kyeong Keun O. et al. (2011) **Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation.** *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **16**: 725–732.
- Taherzadeh et al. (1997)* Taherzadeh M. J., Eklund R., Gustafsson L., Niklasson C. and Lidén G. (1997) **Characterization and Fermentation of Dilute-Acid Hydrolyzates from Wood.** *Industrial & Engineering Chemistry Research* **36**: 4659–4665.
- Thompson et al. (1992)* Thompson D. N., Chen H. C. and Grethlein H. E. (1992) **Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area.** *Bioresource Technology* **39**: 155–163.
- Zhang et al. (2015)* Zhang B. Z., Zhang S. P., Zhao S. T., Xu Q. L. and Yan Y. J. (2015) **Conversion of Sweet Sorghum Bagasse Residue to Glucose by Dilute Acid Hydrolysis.** *Energy Sources* **37**: 1688–1696.
- Zhang et al. (2004)* Zhang Y. H. P. and Lynd L. R. (2004) **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** *Biotechnology and bioengineering* **88**: 797–824.

CHAPITRE IV : ETUDE EXPERIMENTALE DE LA DETENTE EXPLOSIVE

Résumé

Le prétraitement par explosion à la vapeur peut, théoriquement, se décomposer en deux phases distinctes : la phase de cuisson acide, qui a fait l'objet d'une étude spécifique dans le chapitre précédent, et la phase de détente explosive, qui sera étudiée ici.

Afin de pouvoir étudier cette dernière, une méthodologie expérimentale inédite a été mise en place. Elle consiste à précuire de la paille de blé 20 mm dans un outil de cuisson afin d'obtenir des substrats avec des compositions chimiques variées. Certains de ces substrats précuits sont ensuite lavés, neutralisés puis introduits dans un outil d'explosion à la vapeur afin d'appliquer différentes consignes de décompression brutale allant de 7.0 à 20.0 bar.

Ces expérimentations ont pour objectif de permettre une meilleure compréhension de l'impact spécifique de la détente explosive durant le prétraitement par explosion à la vapeur, alors même que ce phénomène particulier n'a été que très peu étudié dans la littérature, et souvent avec des conclusions contradictoires (*Brownell et al. (1986)* ; *Pielhop et al. (2016)*).

PLAN DU CHAPITRE

| | |
|---|------------|
| IV.1. Introduction | 151 |
| IV.2. Description générale de l'étude | 152 |
| IV.2.A. Stratégie expérimentale | 152 |
| IV.2.B. Choix des conditions opératoires | 153 |
| IV.2.B.1. Conditions opératoires de cuisson acide | 153 |
| IV.2.B.2. Teneur en matière sèche et granulométrie initiale durant la phase de cuisson | 154 |
| IV.2.B.3. Validation de l'outil Parr pour l'opération de cuisson | 154 |
| IV.2.B.4. Choix des conditions opératoires de la phase de détente explosive | 156 |
| IV.3. Caractérisation chimique et réactivité des substrats après détente explosive | 157 |
| IV.3.A. Détermination de la composition chimique des substrats après détente explosive | 158 |
| IV.3.B. Réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats après détente explosive | 160 |
| IV.3.C. Consolidation des données expérimentales | 161 |
| IV.3.D. Relation entre la composition chimique des substrats après détente explosive et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique | 162 |
| IV.4. Impact des conditions opératoires de prétraitement sur les caractéristiques physico-chimiques des substrats en relation avec leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique | 165 |
| IV.4.A. Modification morphologique de la paille de blé | 165 |
| IV.4.B. Modification de la porosité de la paille de blé prétraitée | 167 |
| IV.5. Marquage de la cellulose et surface accessible aux enzymes | 170 |
| IV.5.A. Etat de l'art et mise en place de la méthode | 170 |
| IV.5.B. Mode opératoire sélectionné | 171 |
| IV.5.B.1. Préparation de l'échantillon | 171 |
| IV.5.B.2. Marquage de l'échantillon à la safranine | 171 |
| IV.5.B.3. Observation des échantillons | 171 |
| IV.5.C. Résultats et discussion | 172 |
| IV.6. Conclusion générale de l'étude | 174 |
| IV.7. Références | 175 |

IV.1.Introduction

Lors d'un prétraitement conventionnel par explosion à la vapeur, les étapes de cuisson et de détente ont lieu dans un même outil et sont donc dépendantes l'une de l'autre, du fait du couplage entre la température et la pression de la vapeur d'eau à l'équilibre dans le réacteur. Vouloir étudier la détente explosive revient principalement à étudier l'impact de la pression de l'unité qui est elle-même liée à la température de la vapeur, donc à la température de l'unité. Or cette température a une action sur la dépolymérisation de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine via le phénomène de cuisson acide. L'étude de la détente explosive semble donc intrinsèquement liée à celle de la cuisson acide lorsque l'outil d'explosion vapeur est étudié dans son intégralité. Pour pouvoir séparer les deux phénomènes, il faut donc pouvoir isoler la détente explosive en garantissant que les réactions de dépolymérisation ne pourront pas avoir lieu. Pour ce faire, il est nécessaire de limiter l'acidité du substrat avant son introduction dans l'outil d'explosion et de réduire au maximum le temps de séjour dans le réacteur d'explosion avant d'opérer la détente.

Pour obtenir ce résultat, une démarche originale en deux temps a été mise en place : obtention de substrats précuits à différents jeux de conditions opératoires et évaluation de l'impact de la détente explosive sur ces derniers.

Dans cette approche, l'ensemble des expérimentations a été réalisé au sein des laboratoires d'AgroBio Tech (Gembloux). Les cuissons et les détentes explosives ont été menées respectivement dans un outil autoclave de 8 L (unité Parr) et dans un réacteur batch d'explosion vapeur de 50 L construit spécifiquement pour les besoins du laboratoire. Contrairement à l'étude sur les cuissons acides, les expériences ont été réalisées sur de la paille 20 mm (et non 2 mm) et l'étape de lavage du substrat a été adaptée aux outils disponibles localement. Pour plus de détails sur les méthodologies mises en œuvre, le lecteur pourra se référer au chapitre II « Matériels et méthodes » du mémoire (cf. II.3).

Le développement de cette méthodologie a permis de comparer l'évolution des propriétés compositionnelles à celle de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique pour des substrats précuits et des substrats précuits puis explosés à plusieurs niveaux de dépressurisation. L'évolution des propriétés physiques a également été prise en compte, notamment celle de la surface via la physisorption à l'azote qui avait montré sa pertinence dans le chapitre précédent. En parallèle de ces caractérisations et afin d'affiner la discussion, une méthodologie de couplage de la microscopie confocale à balayage laser avec un marquage fluorophore a été développée afin de prendre en compte la surface cellulosique accessible aux enzymes (et non plus la surface totale). Cette technique conduit à une meilleure compréhension de l'impact spécifique de la détente explosive.

IV.2. Description générale de l'étude

IV.2.A. Stratégie expérimentale

Afin d'étudier spécifiquement la phase de détente explosive durant le prétraitement par explosion à la vapeur, des cuissons acides ont été réalisées au préalable dans un réacteur autoclave en appliquant différentes conditions opératoires (temps de séjour et températures variables mais teneur en acide et chargement du mélange réactionnel fixes) afin d'obtenir plusieurs échantillons ayant des caractéristiques différentes en termes de composition et de réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Les substrats prétraités ont ensuite été neutralisés à pH 7, lavés puis essorés afin d'éliminer les sucres solubles (monomères et oligomère solubles) et les possibles produits de dégradation produits durant cette étape. La neutralisation ainsi que l'élimination de ces sucres ont pour but de limiter au maximum les risques de reprise de l'auto-hydrolyse qui pourrait avoir lieu durant l'étape de détente explosive. Les substrats lavés et essorés ont ensuite été introduits dans un outil d'explosion à la vapeur pour étudier l'impact de différents niveaux de dépressurisation sur la réactivité des substrats finaux (Figure IV.1). Le but de cette stratégie est de vérifier si la bonne compréhension des phénomènes ayant lieu durant la cuisson (Chapitre III) et des phénomènes ayant lieu durant la détente explosive permettent d'appréhender le prétraitement par explosion vapeur dans sa globalité.

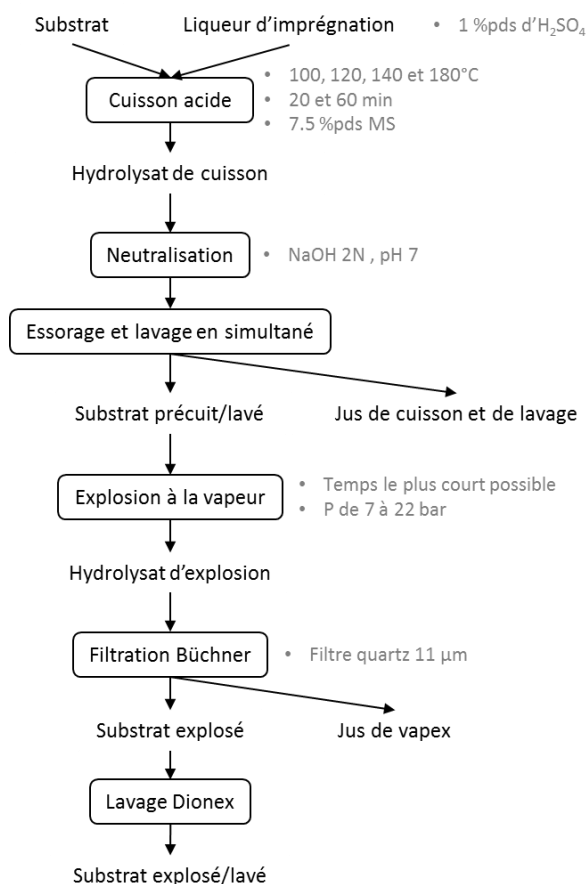


Figure IV.1 : Schéma de la méthodologie expérimentale mise en place pour l'étude de l'impact spécifique de la détente explosive

Toutes les expérimentations relatives aux essais de détente explosive ont été réalisées à l'Université d'Agro-Bio Tech de Gembloux (Belgique) car l'IFPEN ne possède pas ce type d'outil en propre. Cependant, deux contraintes majeures ont dû être prises en compte à ce niveau. Premièrement, l'outil d'explosion à la vapeur d'Agro-Bio Tech ne peut pas contenir de substrats acidifiés pour des problèmes de garantie et de corrosion. Au regard de la stratégie expérimentale choisie et expliquée précédemment, cette contrainte n'est pas très importante car la cuisson des substrats est effectuée dans un outil distinct (réacteur Parr) et le substrat précuit est neutralisé avant son introduction dans l'outil d'explosion (initialement pour limiter les réactions de reprise d'auto-hydrolyse). Deuxièmement, au vu de sa taille, il est nécessaire d'alimenter l'outil d'explosion avec un minimum de 500 g sec de substrat. Cette quantité est impossible à produire en utilisant directement l'unité U868 de l'étude précédente (40 g par batch au mieux). C'est pourquoi le choix a été fait d'effectuer les cuissons directement sur place puisque Agro-Bio Tech dispose aussi d'un outil de cuisson acide de plus grande taille (8 L), adaptée à la problématique.

Pour plus de détails sur la méthodologie expérimentale appliquée dans cette étude, le lecteur pourra se référer au paragraphe II.3 de ce manuscrit.

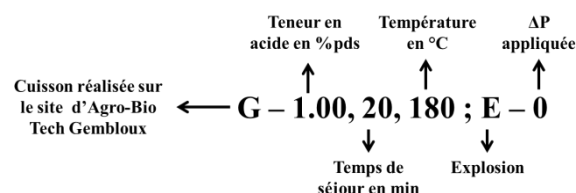
IV.2.B.Choix des conditions opératoires

IV.2.B.1.Conditions opératoires de cuisson acide

Dans le Chapitre III de ce manuscrit, 28 jeux de conditions opératoires aux facteurs de sévérité allant de -6.25 (*paille native*) à 2.96 (*I-1.00, 120, 180*) ont été appliqués afin d'étudier leur impact sur la composition des substrats précuits et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Pour des raisons d'homogénéité entre les études et afin de réduire les temps d'expérimentation, seuls 6 jeux de conditions opératoires (Tableau IV.1) ont été sélectionnés dans le cadre de l'étude sur la détente explosive en satisfaisant les contraintes suivantes :

- couvrir au maximum l'ensemble de la plage de facteur de sévérité
- fixer la concentration en acide sulfurique à 1 %pds pour limiter les degrés de liberté
- conserver le point central correspondant à 140°C, 60 min, 1 %pds d'H₂SO₄.

L'indicatif pour chaque essai réalisé dans cette étude sera exprimé de la manière suivante dans la suite du chapitre :



L'ensemble des facteurs de sévérité indiqués dans le tableau ci-dessous ont tous été calculés de la même manière en utilisant l'équation II.1 (cf. II.2.A.3), que cela soit pour l'unité U868 (IFPEN) ou pour le réacteur Parr (Agro-Bio Tech). Il apparaît alors que, pour les mêmes consignes, les facteurs déterminés à partir des profils d'acquisition du réacteur Parr sont légèrement supérieurs à ceux déterminés à partir de l'unité U868. Cela s'explique par les outils de cuisson eux-mêmes qui ne possèdent pas les mêmes systèmes de chauffage (4 cartouches chauffantes pour l'unité U868 et coquille chauffante en fibre de céramique pour le réacteur Parr) et de refroidissement (vortex d'air

comprimé pour l'unité U868 et serpentin d'eau froide pour le réacteur Parr). Ces différents systèmes de chauffe et refroidissement conduisent à des rampes différentes de montée et de descente en température qui sont plus longues pour le réacteur Parr que pour l'unité U868. D'où les facteurs de sévérité légèrement plus élevés sur l'outil Parr pour des mêmes consignes de température et de temps de séjour.

Tableau IV.1 : Conditions opératoires des cuissons réalisées dans le cadre de l'étude sur la détente explosive

| Référence | Température | Temps | H ₂ SO ₄ | F ₀ (Parr) | F ₀ (U868) (cf. chapitre III) |
|-----------------------|-------------|-------|--------------------------------|-----------------------|---|
| | °C | min | %pds | | |
| Native ; E-0 | - | - | - | -6.54 | -6.52 |
| G-1.00, 20, 100 ; E-0 | 100 | 20 | 1 | 0.13 | 0.02 |
| G-1.00, 20, 120 ; E-0 | 120 | 20 | 1 | 0.69 | 0.53 |
| G-1.00, 20, 140 ; E-0 | 140 | 20 | 1 | 1.26 | 1.19 |
| G-1.00, 60, 140 ; E-0 | 140 | 60 | 1 | 1.67 | 1.53 |
| G-1.00, 20, 180 ; E-0 | 180 | 20 | 1 | 2.44 | 2.23 |

IV.2.B.2. Teneur en matière sèche et granulométrie initiale durant la phase de cuisson

En dehors des conditions « classiques » de cuisson (temps de séjour, température et teneur en acide) discutées précédemment, la granulométrie initiale de la paille de blé et la teneur en matière sèche du mélange réactionnel ont également dû être adaptées aux typologies des outils d'Agro-Bio Tech.

En ce qui concerne la granulométrie, il a été choisi d'utiliser de la paille de blé broyée à 20 mm (alors que c'était 2 mm pour l'étude de cuisson acide du chapitre précédent) car le temps de broyage à 2 mm a été jugé trop long au vu des volumes nécessaires pour cette étude.

Pour la teneur en matière sèche, il a été choisi de travailler avec des mélanges réactionnels à 7.5 %pds MS (au lieu de 10 %pds MS comme pour l'étude de cuisson acide du chapitre précédent). En effet en fixant la granulométrie à 20 mm, il s'est révélé impossible de fermer le réacteur Parr dans le cas d'un mélange à 10 %pds MS à cause de la présence du serpentin interne de refroidissement à l'eau (dans le cas de l'unité U868, le refroidissement se fait à l'extérieur du réacteur par un système d'air froid et le problème n'existe pas). Il a donc été nécessaire de diminuer la teneur en matière sèche à 7.5 %pds pour que les essais puissent être réalisés dans de bonnes conditions.

IV.2.B.3. Validation de l'outil Parr pour l'opération de cuisson

Du fait des changements d'outils et de protocoles expérimentaux entre les cuissons réalisées à IFPEN et celles effectuées à Agro-Bio Tech (Tableau IV.2), il a été nécessaire de valider le nouvel outil de cuisson (réacteur Parr) par rapport à sa référence du chapitre précédent (unité U868).

Tableau IV.2 : Comparaison des caractéristiques techniques et opératoires des 2 outils de cuisson utilisés durant cette thèse

| Réacteur | U868 | Parr |
|--|--------------------------|--|
| Hauteur (cm) | 14 | 44 |
| Diamètre (cm) | 9 | 15.2 |
| Volume (L) | 0.9 | 8 |
| Système de refroidissement | Vortex externe d'air | Serpentin interne d'eau froide |
| Système de chauffe | 4 cartouches chauffantes | Coquille chauffante en fibres de céramique |
| Granulométrie (mm) | 2 | 20 |
| Teneur en MS du mélange réactionnel (%pds) | 10 | 7.5 |
| Masse du mélange réactionnel (g) | 40 | 3330 |

En effet, il a été vu que les facteurs de sévérité déterminés après cuisson dans l'outil Parr étaient légèrement supérieurs à ceux obtenus avec l'unité U868, ce qui pouvait conduire à une hydrolyse plus importante des différents polysaccharides de la paille. C'est pourquoi, une étude préliminaire a consisté à comparer la composition chimique et la réactivité des substrats pré-cuits dans les 2 outils à 100 et 120°C durant 20 min et 1 %pds d'acide sulfurique. Comme le montre la Figure IV.2/A, pour les deux jeux de conditions opératoires testés, les compositions en cellulose et en xylane des substrats après cuisson sont identiques entre les deux unités. Par exemple, pour la cuisson à 120°C durant 20 min, les teneurs en cellulose et en xylane sont respectivement de 53.3 et 16.6 %pds pour l'unité U868 et de 52.6 et 17.4 %pds pour le réacteur Parr. En ce qui concerne la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique, les rendements en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique sont aussi similaires entre les 2 outils de cuisson (Figure IV.2/B).

Au vu de ces résultats, il est possible de conclure que les deux unités de cuisson conduisent à la production de substrat pré-traité possédant les mêmes compositions chimiques et les mêmes réactivités à l'hydrolyse enzymatique, malgré les petits écarts observés en termes de facteurs de sévérité.

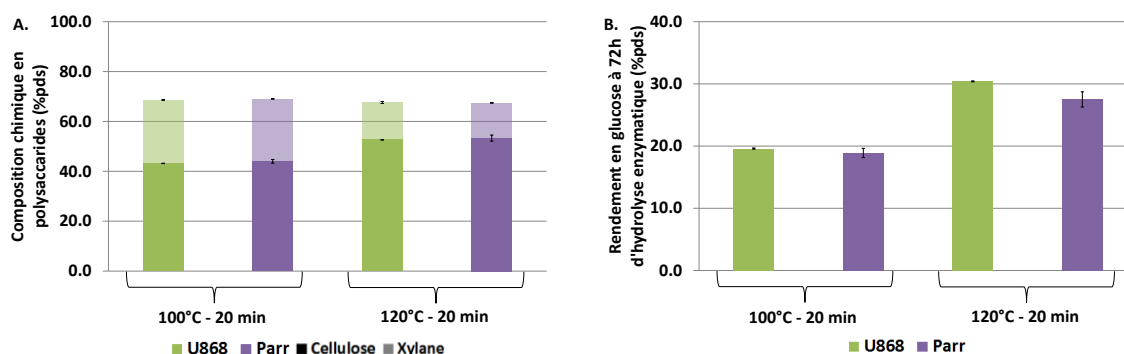


Figure IV.2 : Comparaison des unités de cuisson acide U868 et Parr sur la composition chimique des substrats prétraités (A) et sur leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique (B)

IV.2.B.4. Choix des conditions opératoires de la phase de détente explosive

L'outil d'explosion à la vapeur d'Agro-Bio Tech permet d'appliquer une pression variant de 5 à 50 bar avant la détente explosive, correspondant à une température de vapeur saturée de 150 à 260°C respectivement. Au regard de la littérature, le prétraitement par explosion à la vapeur, en absence d'acide, est généralement réalisé entre 6 et 47 bar, soit 160 et 260°C respectivement. Avec l'ajout d'un acide, la consigne de détente maximale est généralement de 28 bar, soit 230°C. Dans cette étude, comme les substrats sont précuits au préalable, trois dépressurisations ont été testées à 7, 14 et 20 bar, soit 160, 195 et 212°C respectivement. De plus des dépressurisations intermédiaires à 10, 12, 16, 18 et 22 bar ont également été appliquées sur le substrat précuit *G-1.00, 20, 140* et sur la paille native.

De plus, afin de limiter les risques de reprise des réactions d'auto-hydrolyse dans l'outil d'explosion à la vapeur, il a été choisi de neutraliser puis de laver et d'essorer les substrats précuits avant leur introduction dans le réacteur. En effet, l'élimination de l'acide sulfurique et de l'acide acétique par lavage/neutralisation en amont permet de limiter le redémarrage de ces réactions qui sont catalysées par la présence d'acide. Toujours dans le même objectif, il a été choisi d'appliquer la détente explosive dès que la pression dans le réacteur avait atteint la consigne du test, ceci afin de diminuer au maximum le temps de séjour du substrat au sein du réacteur et donc de limiter à nouveau les risques de reprise des réactions de dépolymérisation.

Il est à noter que, malgré tous les efforts réalisés pour limiter au maximum le temps de séjour du substrat dans le réacteur d'explosion, le chargement est réalisé manuellement requérant une durée de 10 min incompressible. De plus, la durée d'injection de la vapeur saturée dans le réacteur pour la mise en pression est aussi de l'ordre de quelques minutes et augmente avec la consigne appliquée (Tableau IV.3).

Tableau IV.3 : Température finale du réacteur et temps de montée en pression pour les différentes consignes de dépressurisation

| Pression de consigne (bar) | 7 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 |
|---|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Equivalence en °C de vapeur d'eau saturée | 165 | 180 | 188 | 195 | 201 | 207 | 212 | 222 |
| Temps de montée en pression (min) | 0.33 | 0.66 | 0.83 | 1 | 1.2 | 1.5 | 3 | 4 |

IV.3.Caractérisation chimique et réactivité des substrats après détente explosive

La stratégie expérimentale explicitée ci-dessus a permis de produire 24 échantillons. Cinq jeux de conditions opératoires de cuisson acide ont été appliqués sur la paille native 20 mm et correspondent à des facteurs de sévérité de 0.13, 0.69, 1.26, 1.67 et 2.44 (Figure IV.3). La paille native et les 5 lots de paille ayant subi l'étape de cuisson/lavage/neutralisation ont ensuite été introduits dans l'outil d'explosion et 3 niveaux de pression (7, 14 et 20 bar) ont été appliqués avant la détente explosive. Dans la suite de ce chapitre et pour faciliter la lecture des graphiques, les facteurs de sévérité ont été employés pour désigner le prétraitement de cuisson acide appliqué et un code couleur a été utilisé pour différencier les différentes pressions appliquées avant détente (Figure IV.3).

Dans la partie III.5.B de ce manuscrit, un assombrissement marqué du substrat prétraité est observé avec l'augmentation du facteur de sévérité durant l'étape de cuisson seule (colonne « précuit » de la Figure IV.3). Cet assombrissement est également visible dans cette étude et est dû à la production de composés de dégradation qui se condensent et/ou polymérisent sur le substrat (*Stevenson (1994)*). En appliquant une pression croissante avant la détente, un défibrage des brins de paille est observé ce qui leur donne un aspect plus cotonneux. Une diminution de la taille des particules est également notée. Ce phénomène a largement été observé dans la littérature et provient de la libération rapide de la vapeur au sein de la biomasse qui entraîne une séparation des fibres à cause des forces de cisaillement produites par l'explosion (*Tanahashi (1990)* ; *Michalowicz et al. (1991)* ; *Toussaint et al. (1991)* ; *Vignon et al. (1995)*).

Après production des échantillons, les analyses de composition chimique et de réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats prétraités ont été réalisées afin d'observer et de comprendre l'impact spécifique de la détente explosive durant le prétraitement par explosion à la vapeur.

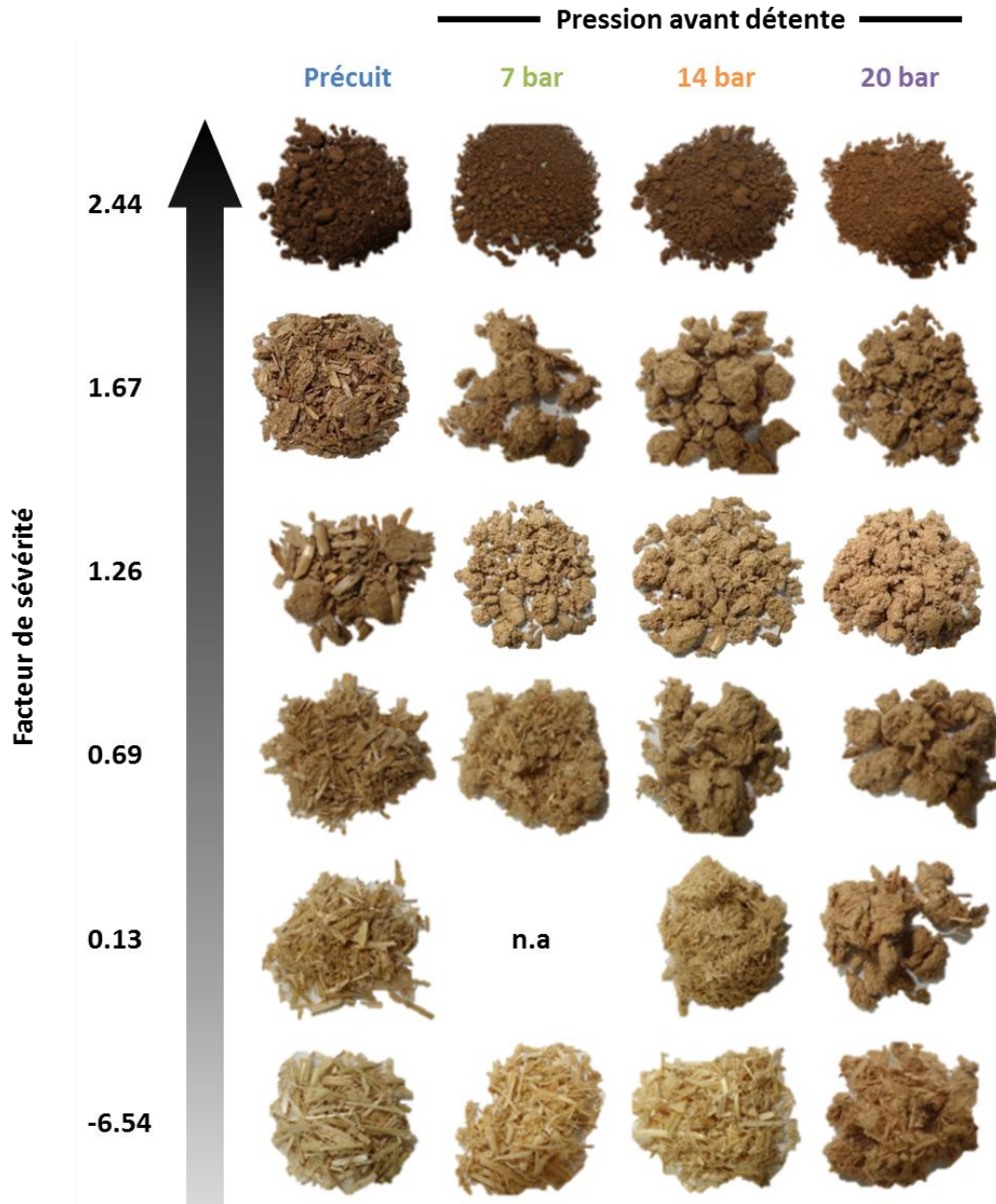


Figure IV.3 : Présentation des différents échantillons produits dans cette étude

IV.3.A. Détermination de la composition chimique des substrats après détente explosive

La composition chimique des substrats précuits et des substrats précuits et explosés a été déterminée par hydrolyse acide (cf. II.4.A.3) et les résultats sont présentés dans la Figure IV.4.

Pour les substrats uniquement précuits (Figure IV.4 - colonnes bleues), la teneur en cellulose augmente de 39.2 à 60.4 %pds et la teneur en xylane diminue en parallèle de 30.6 à 6.1 %pds pour la paille native ($F_0 = -6.54$) et *G-1.00, 60, 140* ($F_0 = 1.67$) respectivement. Ensuite, les teneurs en cellulose et en xylane diminuent à 50.2 et 4.6 %pds respectivement pour *G-1.00, 20, 180* ($F_0 = 2.44$). Ces tendances ont déjà été discutées et explicitées dans le chapitre III de ce manuscrit.

Lorsque l'effet de la détente explosive est étudié sur ces différents substrats précuits (Figure IV.4 - colonnes vertes, oranges et violettes respectivement), deux tendances se dégagent en fonction de la sévérité de l'opération de cuisson.

Pour les conditions de cuisson les plus sévères (*G-1.00-60-140* ($F_0 = 1.67$); *G-1.00-20-180* ($F_0 = 2.44$)), il apparaît clairement que les différentes détentes explosives appliquées n'ont pas impacté la composition du substrat. L'objectif de limiter au maximum le risque de redémarrage des réactions d'auto-hydrolyse par neutralisation du substrat et par limitation du temps de séjour semble donc atteint dans ces cas-là.

Pour les conditions de cuisson les plus douces (i.e. pour la *paille native* ($F_0 = -6.54$); *G-1.00, 20, 100* ($F_0 = 0.13$); *G-1.00, 20, 120* ($F_0 = 0.69$); *G-1.00, 20, 120* ($F_0 = 1.26$)), cette stabilité compositionnelle n'est plus observée. En effet, même si les détentes à 7 et 14 bar continuent à très peu impacter la composition des substrats, il n'en va pas de même lorsqu'une pression de 20 bar est appliquée avant détente. En effet, dans cette condition particulière, les teneurs en polysaccharides varient notablement. Par exemple, pour *G-1.00, 20, 100*, la teneur en cellulose augmente de 43.2 à 54.3 %pds et la teneur en xylane diminue de 29.1 à 21.9 %pds lorsque l'observation passe du substrat uniquement précuit (*G-1.00, 20, 100*; *E-0*) à celui explosé à 20 bar (*G-1.00, 20, 100*; *E-20*). Ce point suggère que, pour des substrats précuits peu sévèrement et possédant encore une teneur importante en xylane, l'application d'une détente explosive à 20 bar conduit à la reprise des réactions d'auto-hydrolyse au sein de l'outil d'explosion à la vapeur. Comme le temps de chargement du substrat dans le réacteur est similaire pour chaque essai quelle que soit la détente appliquée (≈ 10 min), cette partie du protocole expérimental ne peut être accusée d'être à l'origine du redémarrage puisque certaines détentes n'impactent pas la composition du substrat. Il est donc probable que c'est durant l'injection de la vapeur d'eau saturée que le phénomène d'auto-hydrolyse a lieu, phénomène d'autant plus efficace que la pression de consigne est élevée car la température du réacteur est alors aussi plus élevée, ainsi que le temps d'injection. Par exemple, pour une consigne de 20 bar avant détente, la montée en pression se fait en 3 min et la température du réacteur est aux alentours de 211 C. Ces conditions sont donc plus favorables au redémarrage des réactions d'auto-hydrolyse que la consigne de 7 bar pour laquelle la température stabilisée n'est que de 165°C et la durée de montée en pression de 0.33 min.

En conséquence de quoi, pour éviter une modification de la composition du substrat à cause de l'étape de détente explosive, trois conditions paraissent nécessaires a posteriori :

1. neutralisation du substrat avant introduction dans l'outil de détente
2. limitation maximale des temps d'introduction et de montée en pression
3. utilisation d'un substrat déjà fortement converti en amont durant l'étape de cuisson

Dans le cas de cette étude, seules quelques détentes ont conduit à l'obtention de substrats prétraités sans modification de leur composition en polysaccharides. C'est le cas notamment des substrats précuits sévèrement (*G-1.00-60-140* ($F_0 = 1.67$); *G-1.00-20-180* ($F_0 = 2.44$)) qui peuvent alors subir l'ensemble de l'échelle de pression (7 à 20 bar) avant détente. Dans le cas des substrats précuits dans des conditions plus douces (*paille native* ($F_0 = -6.54$); *G-1.00, 20, 100* ($F_0 = 0.13$); *G-1.00, 20, 120* ($F_0 = 0.69$); *G-1.00, 20, 120* ($F_0 = 1.26$)), seules les détentes à 7 et 14 bar permettent de ne pas modifier la composition des substrats.

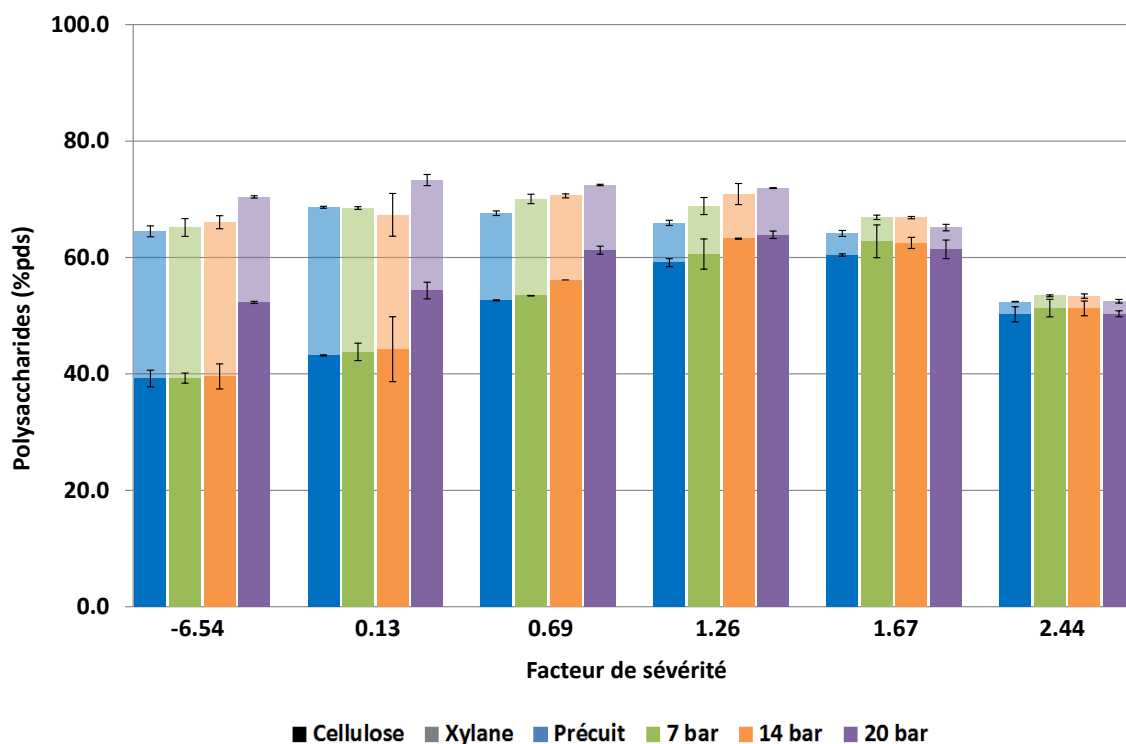


Figure IV.4 : Composition en polysaccharides pour les substrats pré-cuits et les substrats pré-cuits et explosés

IV.3.B. Réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats après détente explosive

En tout premier lieu, le test d'hydrolyse enzymatique standard défini dans le paragraphe II.4.B de ce manuscrit devait être appliqué sur l'ensemble des substrats produits durant l'étude. Cependant, très rapidement, un problème est apparu au niveau des cinétiques d'hydrolyse enzymatique pour certains substrats prétraités. En effet, pour les substrats les moins cuits, l'application d'une détente explosive entraîne une forte modification de leur morphologie (mais pas de leur composition) qui se traduit, en partie, par un aspect externe très cotonneux dû au défibrage mécanique (Figure IV.3). Or ce comportement cotonneux conduit à un encombrement volumique dans les réacteurs d'hydrolyse enzymatique ainsi qu'à une mauvaise homogénéisation du mélange durant les 24 premières heures, le temps que l'hydrolyse enzymatique réduise les fibres de cellulose. La conséquence directe de ce phénomène est une mauvaise performance en hydrolyse enzymatique qui n'est pas liée à la cinétique propre mais à une mauvaise homogénéisation du milieu réactionnel. Pour réduire cette difficulté expérimentale, il a donc été choisi de doubler la dose d'enzyme afin de booster la vitesse initiale d'hydrolyse et de limiter ainsi la durée durant laquelle l'homogénéisation est imparfaite. En conséquence, pour l'étude spécifique sur la détente explosive, les tests d'hydrolyse enzymatique standard ont été réalisés avec 12 mg de protéine par gramme de cellulose de cocktail GC220 et 36 mg de protéine par gramme de cellulose pour le cocktail N188.

En prenant en compte cet ajustement, les rendements en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique des substrats prétraités sont présentés dans la Figure IV.5. A nouveau, comme dans le cas de la composition chimique des substrats, deux tendances se dégagent.

Tout d'abord, pour un facteur de sévérité $F_0 \geq 1.26$ (*G-1.00-20-140*), la réactivité des substrats précuits est identique à celles des substrats précuits et explosés avec un rendement en glucose moyen de 50.3 ± 3.7 , 55.7 ± 1.4 et 19.4 ± 1.7 %pds pour un facteur de sévérité de la cuisson de 1.26, 1.67 et 2.44 respectivement. Les détentes explosives n'ont donc pas eu d'impact positif sur la réactivité des substrats dans ces cas précis.

A contrario, pour la paille native et les substrats précuits peu sévèrement (*G-1.00, 20, 100* et *G-1.00, 20, 120*), la réactivité augmente avec l'augmentation de la pression appliquée avant détente. Par exemple, pour un facteur de sévérité de 0.13, le rendement en glucose pour l'hydrolyse enzymatique augmente de 22.8 à 38.0 % lorsque la consigne de pression passe de 7 à 20 bar. Cependant, à ce niveau, il est impossible de dire si ce gain de réactivité provient de la modification de la composition du substrat ou est dû à un impact particulier de la détente explosive en tant que telle.

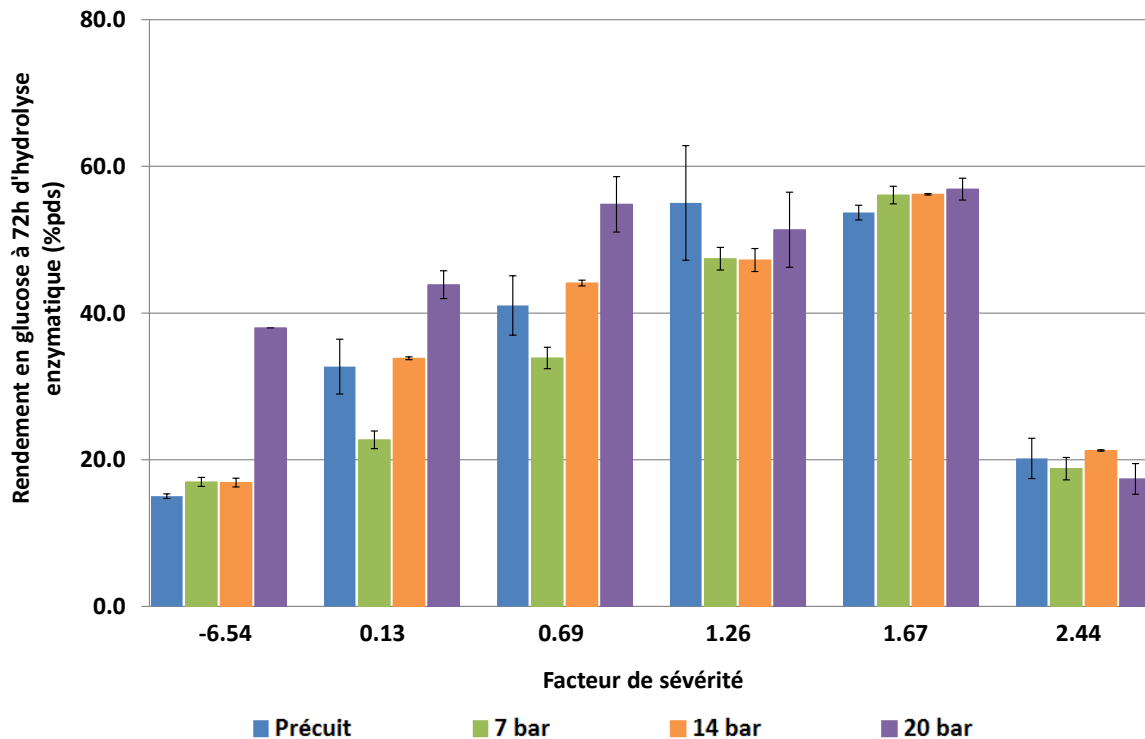


Figure IV.5 : Rendements en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique pour les substrats précuits et les substrats précuits et explosés

IV.3.C.Consolidation des données expérimentales

Afin de consolider les deux grandes tendances explicitées précédemment, il a été choisi d'appliquer sur de la paille native et sur de la paille précuite (*G-1.00, 20, 140*) des détentes explosives supplémentaires (10, 12, 16, 18 et 22 bar). Les résultats obtenus en termes de composition chimique et de réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats sont présentés dans la Figure IV.6.

Pour la paille native, l'augmentation de la pression avant la détente entraîne une diminution de teneur en xylane des substrats et donc une augmentation en relatif de la teneur en cellulose. A l'inverse, l'application d'une pression croissante avant détente sur le substrat précuit *G-1.00, 20, 140*, n'entraîne pas d'évolution des teneurs en polysaccharides (Figure IV.6/A). En ce qui concerne le rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique, la réactivité s'améliore avec l'augmentation de la pression pour la série effectuée sur de la paille native alors que la réactivité reste identique quelle que soit la pression pour la série opérée sur le substrat précuit (Figure IV.6/B).

Ces résultats confirment donc les observations décrites précédemment (cf. IV.3.A et IV.3.B). Elles ne seront pas rappelées ici.

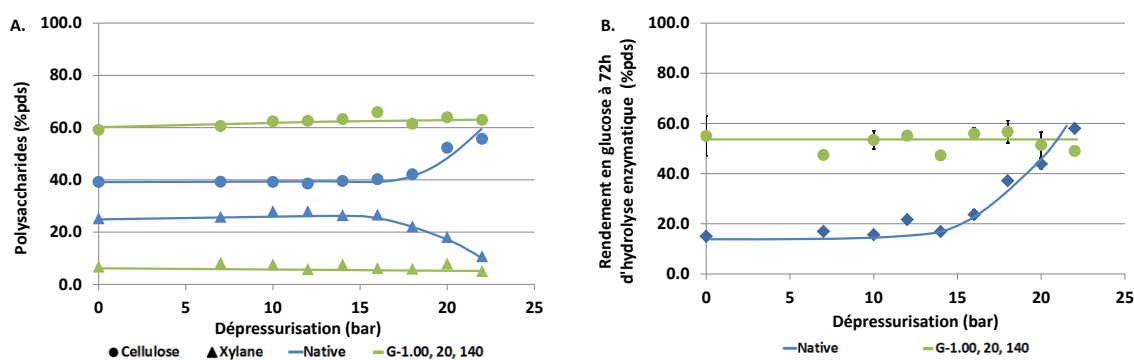


Figure IV.6 : Impact de la détente explosive sur de la paille native et précuite (A/ Evolution de la composition chimique des substrats en fonction de la détente appliquée ; B/ Rendement à l'hydrolyse enzymatique des substrats en fonction de la détente appliquée)

IV.3.D.Relation entre la composition chimique des substrats après détente explosive et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique

Lorsque les observations précédentes sont mises en commun, il apparaît clairement que deux grandes tendances coexistent et qu'elles dépendent grandement du facteur de sévérité appliqué lors de la cuisson. En effet, comme le montre la Figure IV.7, lorsque la sévérité de cuisson conduit à la production d'un substrat ne contenant quasiment plus de xylane (donc, par extension, d'hémicelluloses) ($F_0 = 1.26, 1.1.67$ et 2.44), la réactivité des substrats précuits et des substrats précuits et explosés n'évolue pas avec le niveau de pression appliquée. Par exemple, pour la série *G-1.00, 60, 140* ($F_0 = 1.67$), la teneur en xylane résiduelle est comprise entre 3.7 et 4.4 %pds ; les rendements en hydrolyse enzymatique sont alors compris entre 53.7 et 56.9 % quelle que soit la consigne de pression appliquée. Ces résultats sont très intéressants et suggèrent que la détente explosive en tant que telle ne permet pas de gagner en réactivité lors de l'hydrolyse enzymatique.

A l'inverse, pour les substrats contenant encore une proportion non négligeable de xylane après cuisson ($F_0 = -6.54, 0.13$ et 0.69), la teneur en xylane diminue avec l'application d'une détente explosive croissante, probablement parce que les réactions d'auto-hydrolyse redémarrent malgré toutes les précautions prises. En parallèle, les rendements à l'hydrolyse enzymatique s'améliorent. Par exemple pour le substrat précuit *G-1.00, 20, 120*, la teneur en xylane passe de 16.6 %pds sur le substrat uniquement précuit à 11.2 %pds lorsqu'une pression de 20 bar est appliquée avant détente et la réactivité augmente de 33.9 à 54.8 %. Cela suggère que, dans ces conditions, des réactions d'auto-hydrolyse ont lieu et conduisent à une diminution de la teneur en xylane dans le substrat. Il paraît alors

probable que l'amélioration de la réactivité soit uniquement due à la perte en hémicellulose et non à un impact purement mécanique de la détente explosive en tant que telle.

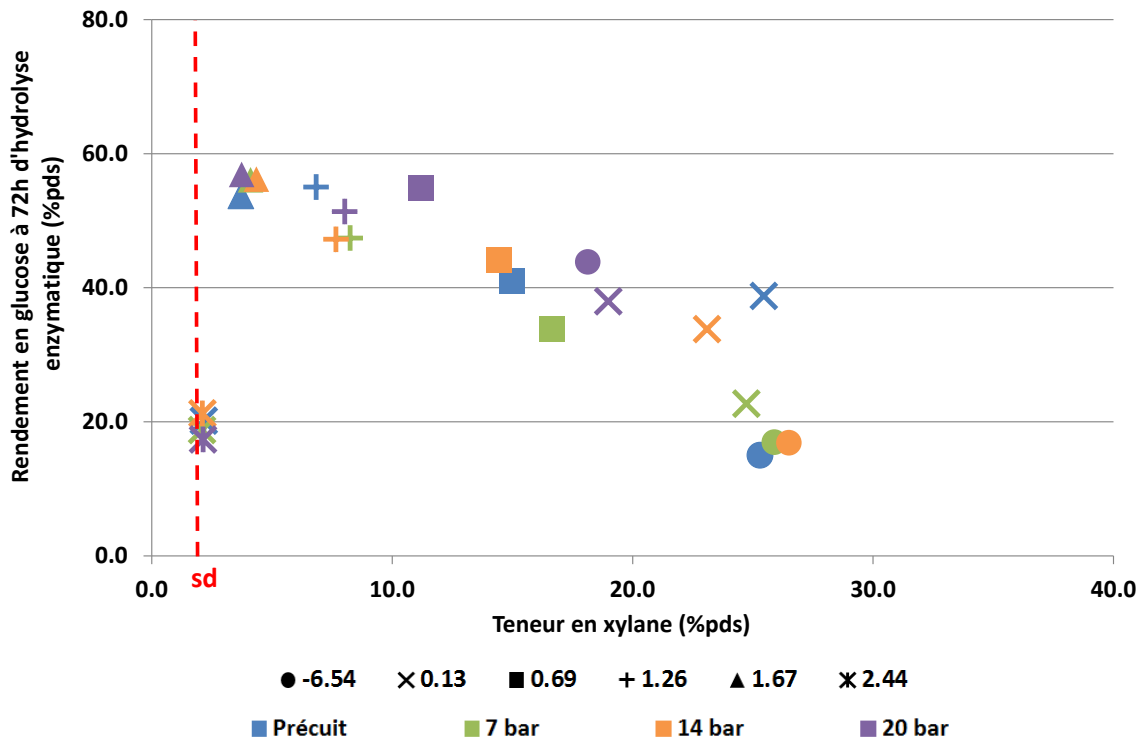


Figure IV.7 : Evolution des rendements en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en xylane des substrats

Au regard de la littérature, il a été montré dans le Chapitre I « Etat de l'art » (§.I.4.A.4) que l'impact spécifique de la détente explosive avait été peu étudié, probablement à cause de la difficulté à isoler spécifiquement le phénomène. A notre connaissance, seulement deux groupes d'auteurs (*Brownell et al. (1986)* ; *Pielhop et al. (2016)*) ont ainsi étudié cet impact et leurs conclusions sont contradictoires. En effet, sur du peuplier (3.2 mm), *Brownell et al. (1986)* estiment que la détente explosive n'a pas d'effet sur la réactivité des substrats, alors que *Pielhop et al. (2016)* observent une amélioration de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique d'environ 50% entre une détente à 2.5 et 30 bar en travaillant sur de l'épicéa (30 mm). Pour ces deux études, la stratégie expérimentale a été identique, c'est-à-dire que les phases de « cuisson acide » et de « détente explosive » ont été réalisées dans le même réacteur et que les températures de cuisson ont été sélectionnées pour correspondre aux pressions maximales que les auteurs voulaient tester. Par exemple, pour *Brownell et al. (1986)*, le prétraitement a été réalisé à 240°C durant 2.5 min et la détente maximale de test était de 32 bar. Pour pouvoir appliquer des détentes plus faibles (dans leur cas, 3.4 et 6.9 bar), le réacteur a été purgé lentement afin d'atteindre la nouvelle consigne de pression puis la vapeur a été relâchée brutalement pour simuler la détente explosive. Ce temps de purge n'a pas été spécifié par *Brownell et al. (1986)*. A l'inverse, *Pielhop et al. (2016)* précisent qu'il était inférieur à 20 secondes.

En comparant l'étude de *Brownell et al. (1986)* à nos observations, il apparaît que la teneur en pentoses, donc en hémicelluloses, passe de 18.5 %pds à 6.6 %pds entre leur substrat natif et leur substrat prétraité à 240°C durant 2.5 min puis explosé à 32 bar. La teneur en pentoses du peuplier

prétraité peut donc être considérée comme résiduelle, comme cela est le cas pour les substrats de cette étude pré-cuits à $F_0 = 1.26, 1.67$ et 2.44 . La conclusion de *Brownell et al. (1986)* est donc partiellement en accord avec les résultats de ce mémoire qui montrent que, sur la paille de blé prétraitée, ne possédant plus de xylane, l'application d'une détente explosive ne permet pas d'améliorer la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique. A l'inverse, dans l'étude de *Pielhop et al. (2016)*, les auteurs constatent une amélioration de la réactivité des substrats avec l'augmentation de la pression avant la détente explosive alors que la teneur en hémicelluloses est résiduelle pour l'ensemble des substrats prétraités et explosés. Dans ce cas, l'amélioration de la réactivité ne serait donc pas liée à la teneur en hémicelluloses. Un des paramètres qui pourrait expliquer ce phénomène est la taille des particules initiales. En effet, *Pielhop et al. (2016)* ayant travaillé sur des particules de bois 10 fois plus grosses que *Brownell et al. (1986)*, l'application d'une pression de plus en plus forte avant détente pourrait permettre un meilleur éclatement mécanique du substrat et donc une augmentation de la surface cellulosique accessible aux enzymes. En appui à cette hypothèse, *Pielhop et al. (2016)* montrent qu'associée à l'augmentation de la pression avant détente explosive, la taille moyenne des particules, initialement de 30 mm, décroît jusqu'à 1 mm. Cette granulométrie est atteinte lorsque la pression appliquée avant détente est de 20 bar et elle n'évolue plus pour les essais à 25 et 30 bar, tout comme la réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Il semblerait donc que l'impact de la détente explosive ne soit pas uniquement lié à la teneur en hémicelluloses du substrat, mais pourrait être également sensible à la nature et à la granulométrie initiale de ce dernier.

IV.4.Impact des conditions opératoires de prétraitement sur les caractéristiques physico-chimiques des substrats en relation avec leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique

Comme explicité dans le paragraphe III.5 du chapitre sur la cuisson acide, plusieurs techniques de caractérisation des substrats natifs et des substrats prétraités peuvent être envisagées afin de décrire et comprendre l'impact d'un prétraitement sur la biomasse lignocellulosique et donc sur sa réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Cependant cette étude a aussi montré que les techniques analytiques, telles que la granulométrie laser, l'analyse RMN du solide ou la physisorption à l'azote, ne permettaient pas forcément d'obtenir des descripteurs pertinents afin de mieux appréhender le lien entre les caractéristiques physico-chimiques des substrats et leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Par exemple, il a été montré que la taille des particules et l'indice de cristallinité de la cellulose permet de décrire l'effet du prétraitement à l'acide dilué sur le substrat mais n'a pas d'influence sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique. A l'inverse, l'étude sur la porosité des substrats a montré la pertinence de cette technique. En effet, le prétraitement à l'acide dilué semble impacter significativement le volume poreux et la surface spécifique, qui, à leur tour, semblent influencer la réactivité du substrat. C'est pourquoi dans cette étude, l'évolution de la morphologie des substrats ainsi que celles de la surface spécifique et du volume poreux ont été étudiées plus particulièrement.

IV.4.A.Modification morphologique de la paille de blé

L'étape de cuisson puis de détente explosive conduit à une modification morphologique de la paille de blé, comme cela a pu être observé précédemment à l'œil nu (Figure IV.3). L'analyse en microscopie électronique à balayage (MEB) avec un grossissement de 50, confirme la diminution de la taille des particules induite par le prétraitement de cuisson acide. De plus, la déstructuration des fibres suite à la détente explosive donne un aspect cotonneux au substrat, aspect de plus en plus marqué avec l'augmentation de la pression appliquée (Figure IV.8). La microscopie MEB permet également d'observer des petites sphères à la surface du substrat cuit le plus sévèrement (*G-1.00, 20, 180*), avec ou sans détente explosive (Figure IV.9). Comme expliqué précédemment (cf. § III.5.B), ces sphères peuvent être attribuées à la présence d'humines (ou pseudo-lignine) qui se forment à forte sévérité de cuisson, se condensent au moins partiellement sur le substrat et inhibent la réactivité à l'hydrolyse enzymatique (*Selig et al. (2007)*).

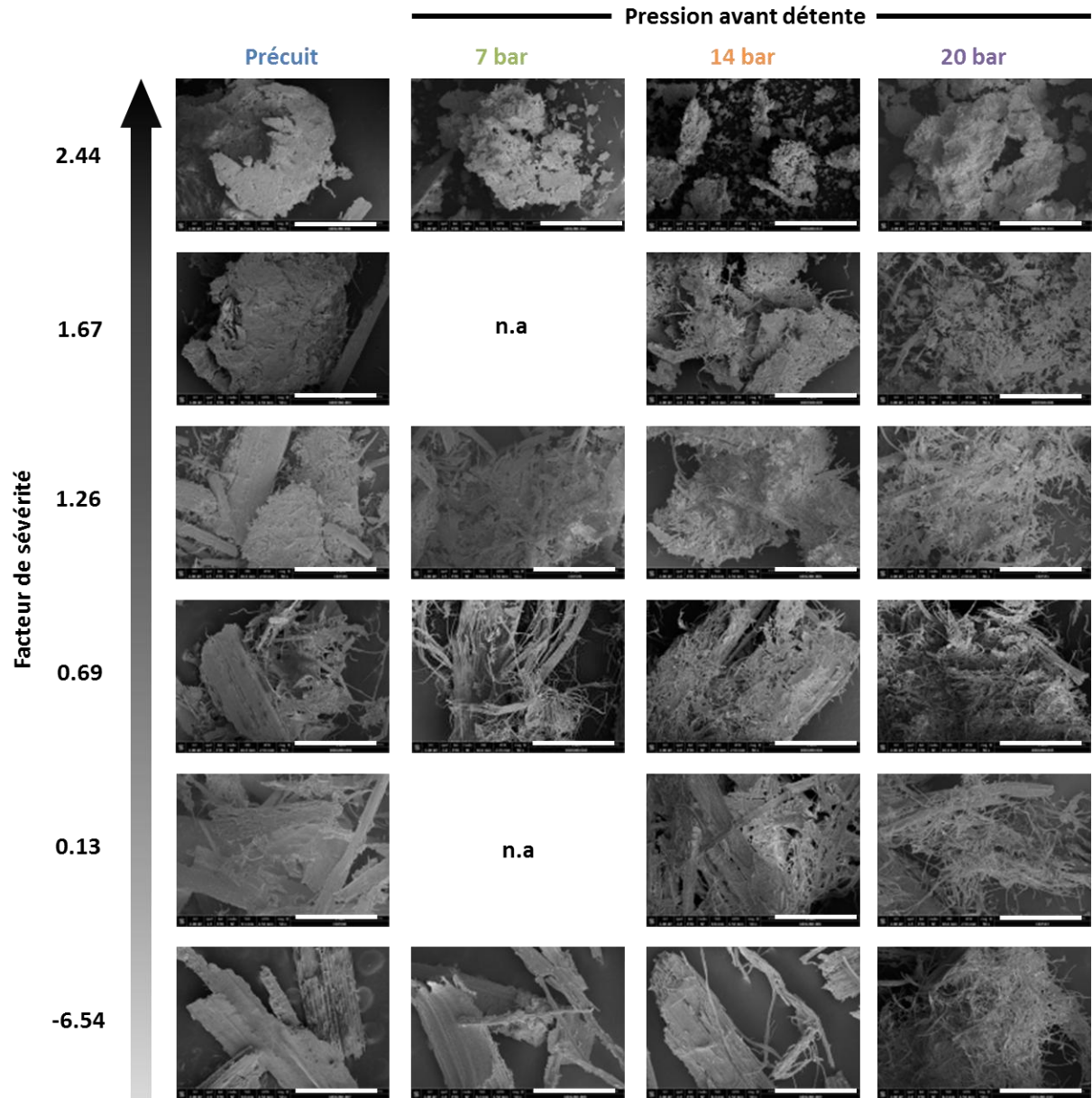


Figure IV.8 : Images par microscopie électronique à balayage des substrats pré-cuits et des substrats pré-cuits et explosés (Grossissement de 50 ; barre = 1 mm)

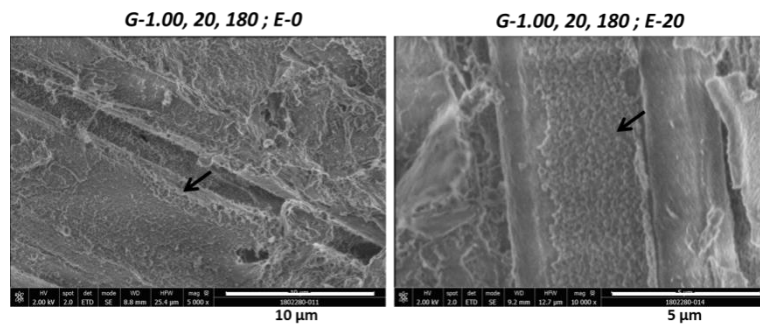


Figure IV.9 : Présence de gouttelettes d'humines sur le substrat fortement prétraité (G-1.00,20,180) non explosé et explosé à 20 bar

IV.4.B.Modification de la porosité de la paille de blé prétraitée

L'analyse par physisorption d'azote permet d'obtenir des informations sur l'état de porosité des différents échantillons (surface spécifique et volume poreux). Le lecteur est renvoyé au Chapitre I (cf. I.3.C.1) et au Chapitre III (cf. III.5.C) pour davantage de détails sur l'intérêt de cette méthode ainsi que sur la préparation des échantillons.

En ce qui concerne la distribution poreuse des échantillons, le volume mésoporeux (pour des diamètres de pores allant de 2 à 50 nm) augmente avec la sévérité de la cuisson à l'acide dilué (augmentation des aires cumulées), mais le diamètre poreux moyen reste inchangé (environ 10 nm) (Figure IV.10 – lignes bleues). Les mêmes remarques peuvent être faites lorsqu'une détente explosive croissante est appliquée et cela quelle que soit la sévérité de la cuisson employée en amont (Figure IV.10 – lignes vertes, oranges et violettes). Il peut être supposé que l'augmentation des sévérités de cuisson et de détente pour les substrats contenant encore une proportion non négligeable de xylane (Figure IV.10/A et B) permet de libérer des pores initialement présents mais obstrués, ou qu'elle entraîne la création de pores ayant la même taille et provenant de l'hydrolyse des hémicelluloses.

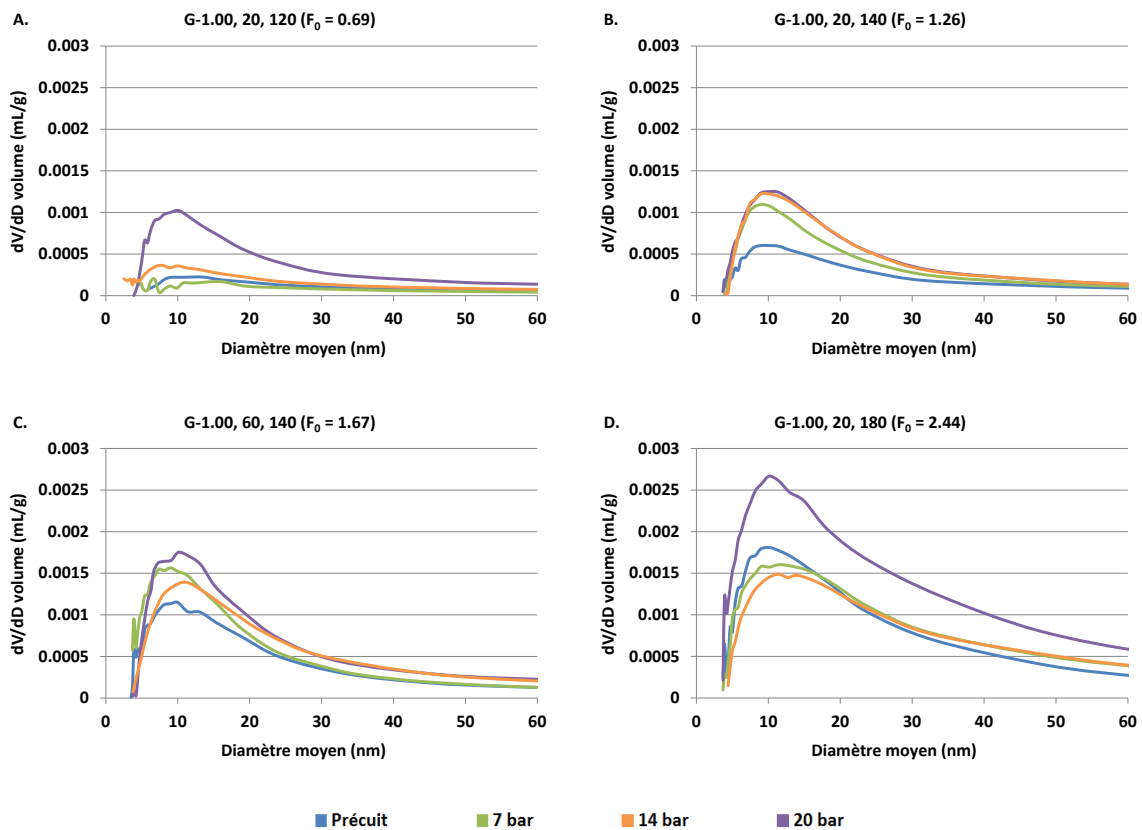


Figure IV.10 : Distribution du volume poreux pour les substrats précuits et pour les substrats précuits + explosés

La surface spécifique augmente, quant à elle, fortement avec l'augmentation du facteur de sévérité de cuisson et passe de 1 à $9.3 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pour la paille native et *G-1.00, 20, 180* respectivement (Figure IV.11/A – colonnes bleues). De plus, pour chaque famille de substrats précuits, l'application d'une détente, de plus en plus forte, conduit également à l'augmentation de cette surface. Par exemple, pour une sévérité de cuisson de 1.26 (*G-1.00, 20, 140*), la surface spécifique est de 3.4, 5.1, 6.6 et 6.7

$\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ respectivement pour le substrat précuit puis pour les substrats précuits et explosés à 7, 14 et 20 bar. Comme discuté dans le Chapitre III, cette augmentation de surface peut être attribuée, dans un premier temps, à l'hydrolyse des hémicelluloses ($F_0 \leq 1.67$) puis à l'hydrolyse de la cellulose ($F_0 > 1.67$) comme le montre la Figure IV.11/B. Cependant, il a été vu que pour une sévérité de cuisson de 1.26, 1.67 et 2.44, l'application d'une détente explosive ne conduisait pas à un changement de la composition chimique des substrats et ne devrait donc pas conduire à une augmentation de la surface. Il semble donc logique de supposer que cette augmentation soit aussi due à l'effet purement mécanique de la détente explosive qui conduit au défibrage des brins de pailles.

Enfin, en étudiant l'influence de la surface spécifique sur le rendement à l'hydrolyse enzymatique (Figure IV.11/C), il est possible de distinguer 4 phases :

- Pour les séries « paille native » ($F_0 = -6.54$) et *G-1.00, 20, 100* ($F_0 = 0.13$), une amélioration de la réactivité est observé avec l'application d'une pression croissante avant détente alors que la surface spécifique n'est pas encore mesurable et fixée à $1 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ arbitrairement (limite de détection de la mesure). Par exemple, la réactivité augmente de 15.1 à 43.9 %pds pour la paille native non explosée et explosée à 20 bar respectivement. Pour ces deux séries, il a été vu que la teneur en xylane était fortement réduite lorsque les substrats étaient explosés à 20 bar, ce qui permet une meilleure accessibilité de la cellulose aux enzymes. De plus, dans ce cas de figure, il semble que la physisorption d'azote montre sa limite quant à la mesure de la surface spécifique.
- Pour la série *G-1.00, 20, 120* ($F_0 = 0.69$), la teneur en xylane passe de 19 à 13.6 %pds avec l'augmentation de la pression appliquée avant la détente. Dans le même temps, la surface spécifique et le rendement en glucose à l'hydrolyse enzymatique augmentent de 2.3 à $5.3 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ et de 33.8 à 54.8 %pds respectivement. Dans cette deuxième phase, il semblerait que l'hydrolyse des hémicelluloses conduise à l'augmentation de la surface spécifique, donc probablement de la surface cellulosique accessible aux enzymes, ce qui permet une amélioration de la réactivité des substrats.
- Pour les séries *G-1.00, 20, 140* ($F_0 = 1.26$) et *G-1.00, 60, 140* ($F_0 = 1.67$), il a été vu que les teneurs en xylane sont très faibles et que la teneur en cellulose n'évolue pas avec l'application d'une détente explosive. Les rendements à l'hydrolyse enzymatique sont similaires entre le substrat précuit et les substrats précuits puis explosés (prise en compte de l'incertitude de 5 %). Dans le même temps, la surface spécifique augmente de 3.4 à 7.1 et de 5.6 à $8.2 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ pour les séries *G-1.00, 20, 140* et *G-1.00, 60, 140* respectivement quand la pression avant détente augmente de 0 à 20 bar. Dans ce cas, il semble que la détente explosive libère de la surface spécifique grâce au défibrage des brins de paille ou en permettant d'avoir accès à des pores initialement présents mais obstrués (Figure IV.11/C). Cependant cette nouvelle surface n'apparaît pas être « utile » à l'hydrolyse enzymatique.
- Pour la série *G-1.00, 20, 180* ($F_0 = 2.44$), une forte diminution de la réactivité est observée alors que la surface spécifique continue d'augmenter. Cette augmentation de surface peut également être attribuée au défibrage des brins de paille. A l'inverse la surface spécifique de $15.7 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ mesuré pour le substrat ayant subi la détente explosive à 20 bar semble surprenante. Il est possible que la détente ait entraîné la dispersion des humines à la surface de substrat ce qui augmente de la surface (Figure IV.9). A l'inverse, la surface cellulosique diminue probablement à cause du masquage par les humines, ce qui entraîne une baisse de la réactivité des substrats.

La surface spécifique est un bon indicateur pour décrire l'effet des deux étapes du prétraitement par explosion à la vapeur sur le substrat (cuisson acide et détente explosive). Cependant, cette caractéristique semble être intimement liée à la teneur en xylane (et par extension en hémicelluloses) et à la présence ou non d'humines. La même conclusion, présentée dans le Chapitre III, peut donc être faite ici. En effet, les variations de la surface spécifique pourraient s'expliquer simplement en faisant la distinction entre surface totale et « surface cellulosique accessible aux enzymes » qui ne représenterait alors qu'une sous-partie de la surface totale.

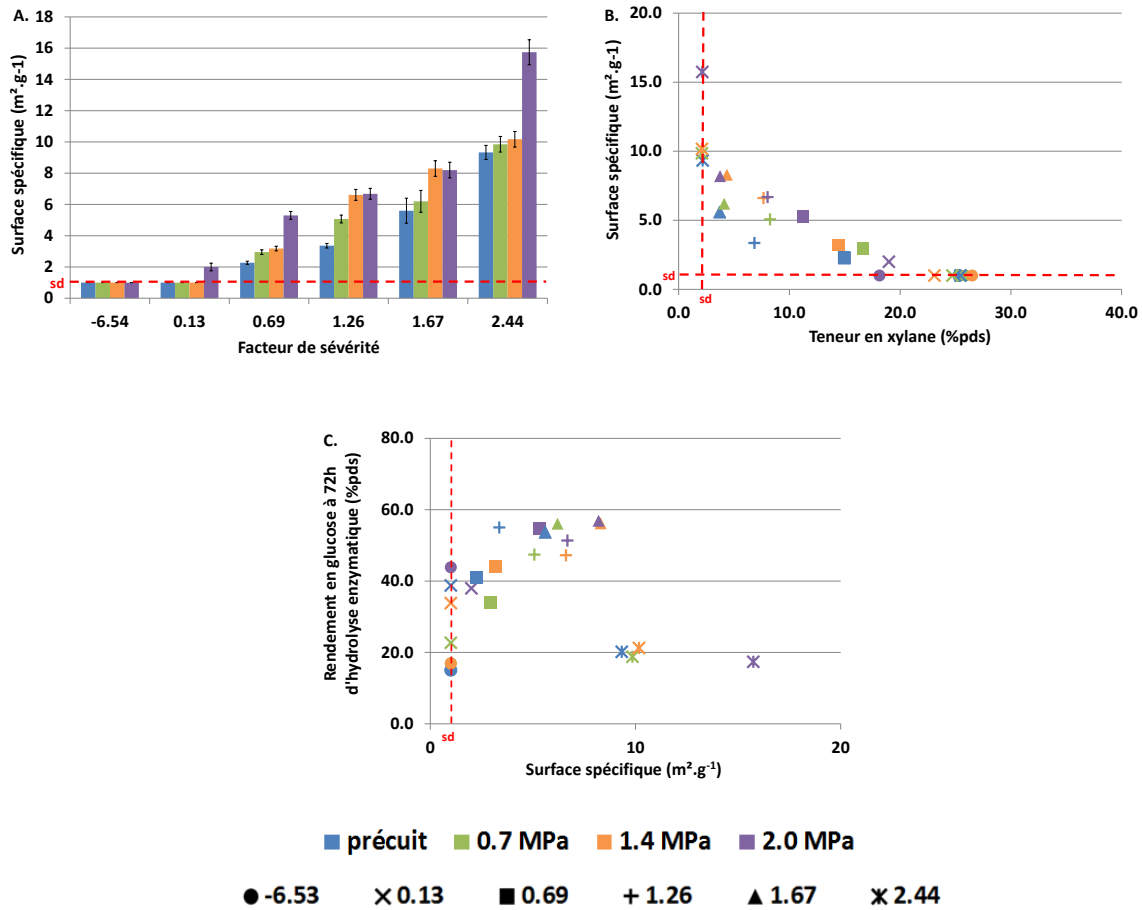


Figure IV.11 : Evolution de la surface spécifique en fonction des conditions opératoires de prétraitement (A) ; Evolution de la surface spécifique en fonction de la teneur en xylane (B) ; Surface spécifique en fonction du rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique (C)

IV.5. Marquage de la cellulose et surface accessible aux enzymes

Parmi les principaux descripteurs analysés (cf. § III.5 et IV.4), il a été vu que la surface spécifique était un descripteur pertinent de l'impact des conditions opératoires de prétraitement mais également de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats lignocellulosiques. Cependant, cette surface spécifique correspond à la surface totale et non à la surface cellulosique accessible aux enzymes, qui n'en représente alors qu'une sous-partie. La mise en relation entre la surface spécifique et le rendement à l'hydrolyse enzymatique des substrats s'avère donc délicate et il serait intéressant de pouvoir se focaliser uniquement sur la surface cellulosique. C'est pourquoi, dans le cadre de la thèse de J. Passicouset et de la présente étude, une technique de caractérisation par marquage et microscopie confocale a été développée afin de caractériser différentes pailles prétraitées par explosion à la vapeur en termes de surface cellulosique accessible aux enzymes.

IV.5.A. Etat de l'art et mise en place de la méthode

A notre connaissance, aucune technique analytique n'a été proposée dans la littérature pour accéder quantitativement à la mesure de surface cellulosique accessible aux enzymes. Par contre, un certain nombre d'études ont déjà porté sur l'observation de tissus lignocellulosiques, en utilisant la microscopie confocale à balayage laser avec, comme objectif, la compréhension du fonctionnement de la dégradation enzymatique des substrats.

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM, confocal laser scanning microscopy) est une technique qui permet d'obtenir des séries de coupes optiques¹³ d'échantillons en utilisant le principe de la fluorescence : un électron d'un atome est excité (absorption) par une source de lumière (un photon d'énergie de longueur d'onde donnée) et, après un certain temps, l'électron excité émet un photon de plus grande longueur d'onde (donc de plus basse énergie) et revient à son état stable. Avec cet outil et l'utilisation de marqueurs fluorescents (fluorophores), il est possible de distinguer la cellulose, la lignine, mais également les enzymes liées à la cellulose (*Luterbacher et al. (2013)* ; *Luterbacher et al. (2015)*). La principale difficulté de l'approche réside dans le choix des marqueurs, qui doivent être aussi spécifiques que possible, mais sans modifier les propriétés chimiques de la surface. La safranine est le marqueur le plus largement utilisé (*Donaldson et al. (2008)* ; *Sant'Anna and Souza (2012)* ; *Sant'Anna et al. (2013)*) mais d'autres marqueurs tels que le calcofluor (*Xue et al. (2013)*), le congo red (*Donaldson and Vaidya (2017)*), le bleu alcian, le CBM (*Moran-Mirabal (2013)*), la coloration fasga (safranine + bleu alcian) (*Méchin et al. (2005)*), le DTAF (*Luterbacher et al. (2013)*), l'Alexa Fluor 488 (*Zhu et al. (2011)*) ou encore l'Axela 647 (*Luterbacher et al. (2013)*) ont également été étudiés.

Afin de développer une méthode permettant de caractériser la biomasse lignocellulosique et de pouvoir évaluer une surface cellulosique, une étude préliminaire a été réalisée en amont afin d'optimiser deux paramètres de la méthode considérés comme primordiaux : le type de marqueur et la préparation des échantillons. En ce qui concerne le marqueur, au regard de la littérature et de la disponibilité commerciale, la safranine, le bleu alcian, le congo red et la coloration fasga ont été testés sur des mélanges mécaniques de cellulose Avicel et de lignine Protobind 1000 (ratio massique 1 pour

¹³Images nettes, sans flou parasite

1). Parmi ces 4 marqueurs, la safranine est apparue comme la plus performante en termes de discrimination entre la cellulose et la lignine mais aussi en termes de qualité d'images. Pour ce qui est de la préparation des coupes, le choix s'est porté sur la congélation d'une goutte d'échantillon avant découpe sur cryo-ultramicrotome. Après cette étude, un protocole complet a ainsi pu être mis en place ; il est détaillé dans le paragraphe suivant.

IV.5.B.Mode opératoire sélectionné

IV.5.B.1.Préparation de l'échantillon

Environ 30 mg de substrat lyophilisé est mis en suspension dans 1 mL d'eau distillée pendant une nuit. A l'aide d'une pipette pasteur, le mélange est ensuite déposé sous la forme d'une grosse goutte sur un support « petit clou » à température ambiante. La goutte est ensuite rapidement congelée pour éviter une sédimentation des particules puis placée dans un cryo-ultramicrotome LEICA Ultra Cut équipé d'un module cryogénique EMFCS. Des coupes de 15 µm sont ensuite réalisées à différentes profondeurs de la goutte et sont déposées sur une lame de microscopie, côte à côte. Après sublimation, la lame est prête pour être marquée.

IV.5.B.2.Marquage de l'échantillon à la safranine

Une goutte de solution aqueuse de safranine à 1%pds est déposée sur la coupe pendant 10 min. Après imprégnation, l'excès de colorant est éliminé avec du papier absorbant puis des gouttes d'eau sont déposées puis éliminées à leur tour de la lame afin de la nettoyer. La lame est finalement placée à l'étuve à 80°C pendant 1h.

IV.5.B.3.Observation des échantillons

Les échantillons sont observés à l'aide d'un microscope ZEISS LSM 800 (plateforme de microscopie CTµ, Villeurbanne). Les conditions d'analyse ont été optimisées afin d'obtenir un bon signal de fluorescence sans saturation (Tableau IV.4). Les surfaces cellulosesques apparaissent alors en vert tandis que les surfaces ligneuses apparaissent en rouge.

Tableau IV.4 : Conditions d'analyse par microscopie confocale : longueurs d'excitation et d'émission ainsi que puissance du laser d'excitation pour des images en zoom $\times 10$

| | |
|------------------------------------|---|
| Observation de la cellulose | Exc. : 488 nm Acq. : 510-550 nm Puissance laser: 1% |
| Observation de la lignine | Exc. : 640 nm Acq. : 640-700 nm Puissance laser: 5% |

IV.5.C.Résultats et discussion

Pour cette étude, quatre échantillons d'intérêt ont été sélectionnés : la paille native explosée à 7 et 20 bar et le substrat *G-1.00, 20, 140* explosé lui-aussi à 7 et 20 bar. En effet, il a été vu que l'application d'une détente explosive sur des substrats faiblement précuits permettait une meilleure réactivité à l'hydrolyse enzymatique alors que, sur des substrats plus sévèrement précuits, la détente n'avait pas d'effet. Il est donc intéressant d'étudier ces deux familles de substrats.

Dans la Figure IV.12, les images montrent que la paille native explosée à 7 bar est peu déstructurée et présente de grosses fibres quasiment intactes. Des petites particules encore très fibrillaires sont également présentes. De plus, il apparaît que la surface des particules est majoritairement composée de lignine (rouge). Pour la paille native explosée à 20 bar, les grosses fibres ne sont plus présentes et les plus petites particules sont encore très fibrillaires et majoritairement recouvertes de lignine. Qualitativement, il semble toutefois que cet échantillon présente plus de particules cellulosiques que la paille explosée à 7 bar (augmentation de la présence de zones vertes). Ces observations sont cohérentes au regard de la composition chimique des substrats. En effet, la teneur en cellulose et celle en xylane sont respectivement augmentées et diminuées pour la paille explosée à 20 bar par rapport à celle explosée à 7 bar (Figure IV.4). Pour la paille précuite à 140°C durant 20 min à 1 %pds d'H₂SO₄ puis explosée à 7 bar, des particules de morphologie fibrillaire plutôt ligneuses et des particules sans morphologie particulière plutôt cellulosiques sont présentes. Qualitativement, cet échantillon semble présenter plus de particules cellulosiques que les deux échantillons précédents, ce qui est cohérent avec un prétraitement plus sévère. Lorsque ce substrat précuit est explosé à 20 bar, il apparaît que les particules ont subi un défibrage poussé menant à une multiplicité de petites particules fibrillaires majoritairement cellulosiques. Qualitativement, il est cependant difficile de conclure quant à l'importance des particules cellulosiques dans cet échantillon comparativement à l'échantillon obtenu avec une détente explosive de 7 bar.

Au vu des résultats, il est possible de conclure que la quantité de cellulose accessible augmente avec la sévérité de la cuisson acide (paille native versus *G-1.00, 20, 140*), ce qui a pour effet d'augmenter la réactivité en hydrolyse enzymatique du substrat. De plus, il est apparu que la détente explosive (20 bar) sur l'échantillon *G-1.00, 20, 140* a pour effet de diminuer la taille des particules via un défibrage mais que cette détente ne rendait pas la cellulose plus accessible ce qui expliquerait pourquoi la réactivité du substrat n'est pas améliorée.

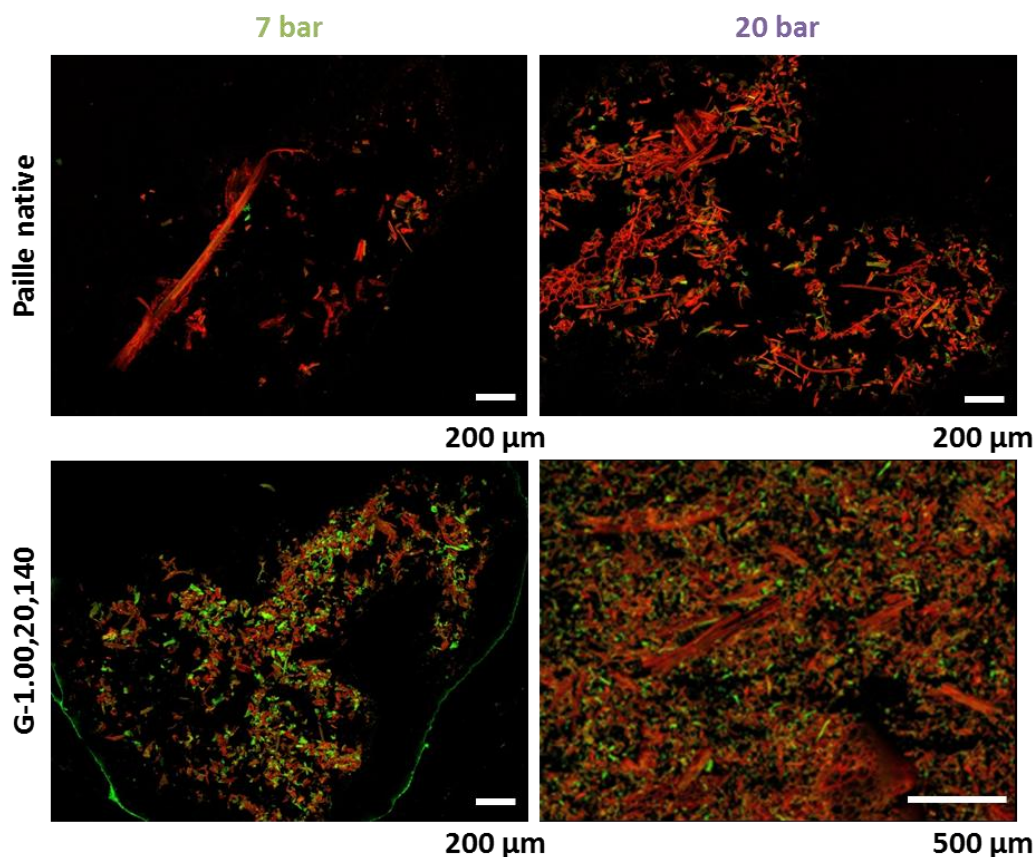


Figure IV.12 : Image en microscopie confocale à balayage laser avec coloration à la safranine de la paille native et précuite à 140°C durant 20 min à 1%pds d'H₂SO₄ et explosés à 7 et 20 bar

Cette étude a confirmé l'intérêt de la microscopie confocale pour caractériser différentes pailles prétraitées par explosion à la vapeur, puisqu'elle permet de distinguer des morphologies et des tailles de particules différentes selon la sévérité et la nature du prétraitement. Il a été vu, de manière qualitative, que la quantité de cellulose accessible augmentait avec la sévérité de la cuisson acide, ce qui a pour effet d'augmenter la réactivité en hydrolyse enzymatique du substrat. Par ailleurs, ces observations ont permis d'expliquer les effets de la détente explosive qui ont lieu durant le prétraitement par explosion à la vapeur : la détente explosive affecte la morphologie des particules mais ne modifie pas la quantité de cellulose accessible aux enzymes, ce qui explique les résultats de réactivité pour les substrats précuits et ne possédant plus d'hémicelluloses (ici *G-1.00, 20, 140*).

Un traitement d'image pourrait être envisagé afin d'obtenir un rapport surfacique entre la cellulose et la lignine mais ce point n'a pu être réalisé dans le cadre de cette thèse pour des raisons de temps. Pour le moment, cette analyse a montré toute sa potentialité en permettant une description qualitative de l'état des surfaces lignocellulosiques mais elle nécessite encore de nombreux développements pour devenir quantitative.

IV.6. Conclusion générale de l'étude

Dans cette étude, une méthodologie expérimentale inédite, consistant à séparer physiquement la phase de cuisson acide de la phase de détente, a été mise en place afin de mieux comprendre l'impact spécifique de la détente explosive durant un prétraitement par explosion à la vapeur. Pour ce faire, de la paille de blé 20 min a été précuite selon 5 jeux différents de conditions opératoires de cuisson, ce qui a permis de générer 6 substrats (5 + paille native) aux caractéristiques chimiques variées. Afin de limiter au maximum la reprise des réactions d'auto-hydrolyse dans la phase de détente explosive, tous les substrats ayant subi une cuisson acide ont été neutralisés puis lavés afin d'éliminer les acides (acide sulfurique et acide acétique notamment). Ces 6 substrats ont ensuite été traités par une étape de détente explosive pour laquelle 3 dépressurisations ont été testées systématiquement (7, 14 et 20 bar). Les 24 échantillons produits ont finalement été caractérisés, en termes de composition chimique, de réactivité et de propriété de surface.

Dans le cas de la paille de blé et dans les conditions de test appliquées, il a été vu que deux tendances bien distinctes se dégageaient en fonction de la teneur résiduelle en hémicelluloses du substrat subissant la détente.

Premièrement, pour des substrats possédant une teneur résiduelle faible en hémicelluloses, il a été vu que la détente explosive n'entraînait pas d'amélioration de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique, et cela, malgré une légère augmentation de la surface spécifique. La détente ne permettrait donc pas d'augmenter la surface accessible de la cellulose aux enzymes et cet aspect a été parfaitement illustré à l'aide de la microscopie optique à balayage laser. En comparaison à la littérature, ces observations sont en accord avec *Brownell et al. (1986)*. A l'inverse, *Pielhop et al. (2016)* constatent une amélioration de la réactivité avec l'augmentation de la pression avant détente alors que la teneur en hémicelluloses est résiduelle. Il apparaît donc que, dans ce cas précis, la détente explosive conduise à un effet positif complémentaire lié probablement à l'éclatement de la biomasse qui entraîne une augmentation de la surface accessible de la cellulose aux enzymes.

Deuxièmement, pour des substrats précuits mais contenant encore une proportion non négligeable d'hémicelluloses, il est apparu que l'application d'une détente explosive conduisait à une reprise des réactions d'auto-hydrolyse et ce malgré les précautions prises afin de les limiter. Cette variation de la composition chimique des substrats entraîne une amélioration de leur réactivité avec l'augmentation de la pression avant détente. Dans ces cas particuliers, le découplage des phénomènes de cuisson acide et de détente n'a donc pas été possible et aucune conclusion claire ne peut être dégagée quant à l'action spécifique de la détente explosive sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique.

Pour finir, cette étude a permis de mieux appréhender et comprendre l'impact spécifique de la détente explosive sur la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique. Cependant le découplage des deux phénomènes n'est pas parfait et un doute persiste pour les substrats contenant encore des hémicelluloses avant l'opération de détente. Des prélèvements sur des outils continus pourraient être envisagés afin de s'assurer de l'absence d'impact de la détente explosive. En marge de cette étude, la microscopie à balayage laser a montré son utilité afin d'évaluer qualitativement la surface accessible de la cellulose aux enzymes. Cependant cette technique nécessite encore des ajustements avant de mettre en place une mesure quantitative pertinente et représentative de la surface cellulosique.

IV.7.Références

- Brownell et al. (1986)* Brownell H. H., Yu E. K. and Saddler J. N. (1986) **Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop.** *Biotechnology and bioengineering* **28**: 792–801.
- Donaldson and Vaidya (2017)* Donaldson L. and Vaidya A. (2017) **Visualising recalcitrance by colocalisation of cellulase, lignin and cellulose in pretreated pine biomass using fluorescence microscopy.** *Scientific Reports* **7**: 1–14.
- Donaldson et al. (2008)* Donaldson L., James H., Stefan J. (2008) **Safranin fluorescent staining of wood cell walls.** *Biotechnic & Histochemistry* **1**: 161–171.
- Luterbacher et al. (2015)* Luterbacher J. S., Moran-Mirabal J. M., Burkholder E. W. and Walker L. P. (2015) **Modeling enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates using fluorescent confocal microscopy II: pretreated biomass.** *Biotechnology and bioengineering* **112**: 32–42.
- Luterbacher et al. (2013)* Luterbacher J. S., Walker L. P. and Moran-Mirabal J. M. (2013) **Observing and modeling BMCC degradation by commercial cellulase cocktails with fluorescently labeled *Trichoderma reesei* Cel7A through confocal microscopy.** *Biotechnology and bioengineering* **110** : 108–117.
- Maache-Rezzoug et al. (2011)* Maache-Rezzoug Z., Pierre G., Nouviaire A., Maugard T. and Rezzoug S. A. (2011) **Optimizing thermomechanical pretreatment conditions to enhance enzymatic hydrolysis of wheat straw by response surface methodology.** *Biomass and Bioenergy* **35**: 3129–3138.
- Méchin et al. (2005)* Méchin V., Argillier O., Rocher F. et al. (2005) **In search of a maize ideotype for cell wall enzymatic degradability using histological and biochemical lignin characterization.** *Journal of agricultural and food chemistry* **53**: 5872–5881.
- Michalowicz et al. (1991)* Michalowicz G., Toussaint B. and Vignon M. R. (1991) **Ultrastructural Changes in Poplar Cell Wall during Steam Explosion Treatment.** *Holzforschung* **45** : 175–179.
- Moran-Mirabal (2013)* Moran-Mirabal J. M. (2013) **The study of cell wall structure and cellulose–cellulase interactions through fluorescence microscopy.** *Cellulose* **20**: 2291–2309.
- Pielhop et al. (2016)* Pielhop T., Amgarten J., von Rohr, P. R. and Studer M. H. (2016) **Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility.** *Biotechnology for biofuels* **9**: 152.

- Prasad et al. (2007) Prasad S. , Singh A. , Jain N. and Joshi H. C. (2007) **Ethanol Production from Sweet Sorghum Syrup for Utilization as Automotive Fuel in India.** *Energy & Fuels* **21** : 2415–2420.
- Sant' Anna and Souza (2012) Sant' Anna C. and Souza W. de (2012) **Microscopy as a tool to follow deconstruction of lignocellulosic biomass.** *Advances in Science and Technology* **1**: 639–649.
- Sant'Anna et al. (2013) Sant'Anna C., Costa L. T., Abud Y. et al. (2013) **Sugarcane cell wall structure and lignin distribution investigated by confocal and electron microscopy.** *Microscopy research and technique* **76**: 829–834.
- Selig et al. (2007) Selig M. J., Viamajala S., Decker S. R. et al. (2007) **Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Biotechnology progress* **23**: 1333–1339.
- Stevenson (1994) Stevenson F. J. (1994) **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions.** Wiley. New York.
- Tanahashi (1990) Tanahashi M. (1990) **Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood.** *Wood research bulletin of the Wood Research Institute Kyoto* **77**: 49–117.
- Toussaint et al. (1991) Toussaint B., Excoffier G. and Vignon M. R. (1991) **Effect of steam explosion treatment on the physico-chemical characteristics and enzymic hydrolysis of poplar cell wall components.** *Animal Feed Science and Technology* **32**: 235–242.
- Vignon et al. (1995) Vignon M. R., Garcia-Jaldon C. and Dupeyre D. (1995) **Steam explosion of woody hemp chènevotte.** *International Journal of Biological Macromolecules* **17** : 395–404.
- Xue et al. (2013) Xue J., Bosch M. and Knox J. P. (2013) **Heterogeneity and glycan masking of cell wall microstructures in the stems of Miscanthus x giganteus, and its parents M. sinensis and M. sacchariflorus.** *PloS one*: **8**.
- Zhu et al. (2011) Zhu P., Moran-Mirabal J. M., Luterbacher J. S., Walker L. P. and Craighead H. G. (2011) **Observing Thermobifida fusca cellulase binding to pretreated wood particles using time-lapse confocal laser scanning microscopy.** *Cellulose* **18**: 749–758

CHAPITRE V : ETUDE SUR LES HUMINES

Résumé

Dans les Chapitres III et IV de ce manuscrit, il a été vu que des composés insolubles se déposaient sur les substrats prétraités lorsque des conditions opératoires sévères étaient appliquées, ce qui occasionnait une baisse drastique de leur réactivité à l'hydrolyse enzymatique. L'objectif de ce chapitre consiste à mieux comprendre l'origine de la formation de ces composés appelés humines ou pseudo-lignine dans la littérature. Pour ce faire et afin de simplifier la démarche expérimentale, il a été choisi d'étudier tout d'abord l'influence des trois composés majoritaires de la biomasse lignocellulosique (cellulose, hémicelluloses et lignine) en utilisant 3 substrats modèles : la cellulose Avicel, le xylane d'épis de maïs Roth et la lignine de paille de blé Protobind. Chacun de ces substrats modèles ont alors subi une cuisson acide à 180°C durant 60 min à 1 %pds d'H₂SO₄, ces conditions étant jugées suffisamment sévères pour permettre la formation d'humines. Pour étudier les effets synergiques potentiels, les mêmes substrats ont ensuite été mélangés deux à deux avant d'opérer l'étape de cuisson. Finalement le mélange des 3 substrats modèles a été opéré pour compléter et clôturer cette première étude. Dans un second temps et afin de se rapprocher d'un substrat plus réaliste, une étude sur de la pâte à papier blanchie a été réalisée et les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus sur la paille de blé.

PLAN DU CHAPITRE

| | |
|---|------------|
| V.1. Introduction | 181 |
| V.2. Etude sur les substrats modèles | 182 |
| V.2.A. Stratégie expérimentale | 182 |
| V.2.B. Cuisson acide des substrats modèles pris isolément | 184 |
| V.2.B.1. Cellulose Avicel | 184 |
| V.2.B.2. Xylane d'épis de maïs Roth | 187 |
| V.2.B.3. Lignine de paille de blé Protobind | 189 |
| V.2.C. Cuisson acide des mélanges de substrats modèles par paire | 191 |
| V.2.C.1. Cellulose Avicel et lignine de paille de blé Protobind | 191 |
| V.2.C.2. Cellulose Avicel et xylane d'épis de maïs Roth | 194 |
| V.2.C.1. Xylane d'épis de maïs Roth et lignine de paille de blé Protobind | 197 |
| V.2.D. Cuisson acide du mélange des trois substrats modèles | 200 |
| V.2.E. Conclusion intermédiaire | 204 |
| V.3. Etude sur un substrat délignifié | 206 |
| V.3.A. Stratégie expérimentale | 206 |
| V.3.A.1. Description de la pâte à papier | 206 |
| V.3.A.2. Choix des conditions opératoires de cuisson acide | 206 |
| V.3.B. Détermination des rendements expérimentaux et réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique | 207 |
| V.3.B.1. Bilan sur le glucose et le xylose | 207 |
| V.3.B.2. Evolution des rendements en glucose et en xylose | 208 |
| V.3.B.3. Evolution de la teneur en composés solubles et insolubles | 209 |
| V.3.B.4. Réactivité des substrats prétraités à l'hydrolyse enzymatique | 210 |
| V.3.C. Caractéristiques physico-chimiques | 211 |
| V.3.C.1. Modification morphologique de la pâte à papier prétraitée | 211 |
| V.3.C.2. Modification chimique | 213 |
| V.3.C.3. Modification de la porosité de la pâte à papier prétraitée | 214 |
| V.3.C.4. Profils de dégradation thermique des substrats | 215 |
| V.4. Conclusion | 217 |
| V.5. Références | 218 |

V.1.Introduction

Les prétraitements chimiques ou physico-chimiques, en conditions d'auto-hydrolyse ou en présence d'acide, permettent majoritairement l'hydrolyse des hémicelluloses afin de rendre la cellulose plus accessible aux enzymes. Il a été vu que, pour des conditions opératoires de plus en plus sévères, les hémicelluloses se dégradent rapidement en monomères puis en produits de dégradation. Si les conditions de prétraitement sont encore plus poussées, il a été observé la formation de composés de dégradation « ultime », nommés humines, qui conduisaient à une diminution drastique de la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique. La présence des humines a ainsi été décrite dans différentes études, généralement de manière indirecte, grâce à leur caractère insoluble qui conduisait à une augmentation de la teneur en lignine Klason (*Donohoe et al. (2008)* ; *Sievers et al. (2009)* ; *Sannigrahi et al. (2011)*). Leurs mécanismes de formation, leur nature chimique et leur impact sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique restent cependant encore peu étudiés dans la littérature car l'objectif de la majorité des articles consiste principalement à optimiser les conditions opératoires afin d'obtenir les meilleurs rendements en sucres totaux après prétraitement ou après hydrolyse enzymatique sans chercher à étudier les phénomènes sous-jacents. Ces derniers points apparaissent donc comme nécessaires à approfondir.

Afin d'étudier la formation des humines et leur impact sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique, il a été choisi de travailler, dans un premier temps, sur des substrats modèles qui soient représentatifs des trois composants majoritaires (cellulose, hémicelluloses et lignine) d'une biomasse lignocellulosique : la cellulose Avicel, le xylane d'épis de maïs et la lignine de paille de blé. Ces 3 substrats modèles ont alors subi, chacun à leur tour, une étape de cuisson acide dans des conditions sévères de prétraitement afin de favoriser la formation des humines. Ensuite, les mêmes substrats ont été mélangés deux à deux avant d'être à nouveau prétraités dans les mêmes conditions, cette fois-ci pour étudier les effets synergiques potentiels. Finalement une cuisson acide du mélange complet, constitué des 3 substrats modèles, a été opérée pour parachever l'étude.

Dans un second temps, afin de se rapprocher d'un substrat plus réaliste, une pâte à papier (substrat délignifié contenant de la cellulose et des hémicelluloses) a été précuite à des sévérités croissantes de prétraitement et comparée aux résultats obtenus sur de la paille de blé dans des conditions identiques.

L'objectif de cette étude étant de mieux comprendre la formation des humines et leur impact sur l'hydrolyse enzymatique, les caractérisations physico-chimiques se sont principalement focalisées sur la fraction solide qui est récupérée après prétraitement.

V.2. Etude sur les substrats modèles

V.2.A. Stratégie expérimentale

L'objectif de cette étude est de comprendre l'influence des constituants majoritaires de la biomasse lignocellulosique sur la formation des humines. Il a donc été choisi de travailler sur trois substrats modèles représentatifs des fractions cellulosique, hémicellulosique et ligneuse d'une biomasse :

- la cellulose Avicel PH101 (Sigma Aldrich) qui est une cellulose très cristalline souvent utilisée dans la littérature
- le xylane d'épis de maïs (Roth) qui se rapproche le plus de la composition des hémicelluloses de paille de blé
- la lignine Protobind qui provient de l'extraction de la lignine d'une paille de blé.

La composition chimique des substrats modèles utilisés dans cette étude est fournie dans le Tableau V.1. Les potentiels en galactose, mannose et arabinose ne sont pas donnés ici car les valeurs sont en dessous du seuil de détection. Les résultats d'analyse montrent que la cellulose Avicel est très pure (95.7 %pds de cellulose sur base sèche). Le xylane d'épis de maïs est, quant à lui, moins homogène puisqu'il possède une quantité non négligeable d'unités glucose (13.2 %pds sur base sèche) en plus de ses unités xylose (92.0 %pds sur base sèche). Enfin la lignine de paille de blé Protobind est principalement constituée de lignine insoluble (84.5 %pds sur base sèche).

La séparation des fractions solide et liquide après cuisson étant réalisée sur des filtres en quartz à 11 μm , il a été nécessaire de réaliser des blancs sur chacun des substrats modèles afin d'en évaluer la fraction « réellement » solide (c'est-à-dire non soluble et ne passant pas un filtre 11 μm). Pour ce faire, chaque substrat modèle a été introduit dans une quantité d'eau suivant un ratio massique de 1 pour 10. Le mélange a été maintenu 1 h à 50°C puis filtré sur Büchner en utilisant un filtre en quartz de 11 μm . Les résultats montrent que la cellulose Avicel PH101 et la lignine Protobind sont fortement insolubles et constituées de particules de taille supérieure à 11 μm puisque les fractions récupérées sur le filtre sont respectivement de 99.97 et 94.25 %pds. A l'inverse, le xylane d'épis de maïs semble se solubiliser facilement car le filtre ne retient que 1.89 %pds.

Tableau V.1 : Analyse compositionnelle des substrats modèles

| | | Cellulose Avicel PH101 | Xylane d'épis de maïs Roth | Lignine de paille de blé Protobind |
|--|-------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| Potentiel glucose/MS | %pds | 106.33 ±2.93 | 13.18 ±1.32 | sd* |
| Potentiel xylose/MS | %pds | sd* | 91.96 ±5.12 | sd* |
| Teneur en composés insolubles/MS | %pds | sd* | sd* | 84.49 ± 0.69 |
| Teneur en cendres/MS | %pds | 0.13 ± 0.01 | 0.19± 0.04 | 1.63± 0.09 |
| Masse de solides récupérés après filtration (filtre 11µm) | %pds | 99.97 ± 0.10 | 1.89 ±0.76 | 94.25 ±0.22 |

* seuil limite de détection

Pour étudier l'influence de ces 3 substrats modèles et dans l'optique d'une comparaison finale à de la paille de blé, ces derniers ont été introduits dans les différents mélanges réactionnels (400 g à 10 %MS) en conservant les proportions relatives présentes dans la paille de blé de l'étude (Tableau V.2). Au total, sept cuissons acides ont ainsi été réalisées, 3 en utilisant les substrats modèles seuls, 3 en les couplant deux à deux et la dernière en utilisant le mélange des trois. La quantité de liqueur d'imprégnation a, quant à elle, toujours été fixée à 360 mL pour chaque cuisson. En conséquence, la teneur en matière sèche des mélanges réactionnels varie d'un essai à l'autre. Par exemple, pour le mélange mécanique cellulose + lignine, 16.61 g de cellulose Avicel, 6.04 g de lignine Protobind et 360 mL de liqueur d'imprégnation ont été introduits dans le réacteur avant de réaliser l'opération de cuisson : la teneur en matière sèche du mélange réactionnel a donc été de 6.31 %pds.

Tableau V.2 : Quantités introduites de chaque substrat modèle

| | Mélange de référence basé sur la paille de blé | | | Mélange de substrats modèles | | |
|-----------|--|--|-------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | Equivalent polymérique /MS (%pds) | Masse dans 40 g de mélange à 10%MS (g) | | Masse de cellulose Avicel* (g) | Masse de xylane Roth* (g) | Masse de lignine Protobind* (g) |
| Cellulose | 39.82 | 15.93 | C | 16.65 | - | - |
| | | | X | - | 9.96 | - |
| Xylane | 24.43 | 9.77 | L | - | - | 6.11 |
| | | | C+L | 16.61 | - | 6.04 |
| Lignine | 14.43 | 5.77 | C+X | 16.68 | 9.96 | - |
| | | | X+L | - | 9.90 | 6.02 |
| | | | C+X+L | 16.62 | 9.86 | 6.11 |

*Prise en compte de la MS des substrats modèles pour la cellulose Avicel (95.50 %pds MS) pour le xylane Roth (97.87 %pds MS) et pour la lignine Protobind (95.21 %pds MS)

Afin de favoriser la formation des humines, les conditions opératoires des 7 cuissons acides ont été fixées à 180°C durant 60 min à 1 %pds d'H₂SO₄. Tous les prétraitements ont été réalisés de la même manière que dans l'étude de cuisson acide (Chapitre III) ; le lecteur est renvoyé au paragraphe II.2.A de ce manuscrit pour plus de détails. A l'inverse, le post-traitement a dû être adapté, notamment afin d'améliorer la séparation solide/liquide des mélanges après cuisson. Cette dernière a donc été réalisée par filtration sur Büchner en utilisant un filtre en quartz de 11 µm et le lavage du solide a été réalisé sur un outil Soxhlet.

L'objectif de cette thèse étant de comprendre la relation entre la morphologie et la réactivité des substrats lignocellulosiques après prétraitement, les analyses se sont portées sur une caractérisation poussée de la fraction solide récupérée après cuisson. La fraction liquide a donc été exclusivement analysée en HPLC et HPLiC (cf. § II.4.A.1) afin d'obtenir les quantités de chaque sucre sous leurs différentes formes solubles (oligomérique soluble, monomérique et dégradée).

V.2.B.Cuisson acide des substrats modèles pris isolément

V.2.B.1.Cellulose Avicel

Pour la cellulose Avicel seule, la cuisson réalisée conduit à l'hydrolyse quasi totale de la fraction cellulosique (83.7 % de conversion) en oligomère de glucose solubles (0.41 g – valeur mesurée), en glucose (2.28 g – valeur mesurée) et en 5-HMF (0.22 g – valeur mesurée) et autres produits non identifiés (9.83 g – valeur obtenue par bilan massique), dont 2.86 g se retrouve dans la fraction solide (valeur obtenue par hydrolyse acide) et 6.97 g dans la fraction liquide (valeur déterminée par différence) (Tableau V.3). Le résidu solide, obtenu après hydrolyse acide du substrat lavé, représente les humines précipitées sur la surface du solide encore présent après prétraitement ; il

ne correspond qu'à 29.1 %pds des composés non identifiés. La majorité (70.9 %) sont donc des composés présents dans la fraction liquide qui pourraient regrouper des composés solubles ou des composés agglomérés sous la forme de particules dont la taille est inférieure à 11 µm.

Tableau V.3 : Bilan glucose exprimé en masse sur la cuisson de la cellulose Avicel

| | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
|-----------|-----------|-------------------------|---|--------------------------|---------|-------|-------------------------|
| | Cellulose | Cellulose | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de glucose | Glucose | 5-HMF | Composés non identifiés |
| Masse (g) | 15.22 | 5.67 | | 9.55* | | | |
| | | 2.48 | 2.86 | 0.41 | 2.28 | 0.22 | 6.97* |

* déterminée par différence

L'observation par microscopie électronique à balayage (MEB) de la cellulose Avicel montre que ce substrat est initialement composé de fibres de cellulose bien visibles dont la surface est lisse. Après cuisson, ces fibres disparaissent et la surface du substrat apparaît peluchée et rugueuse à cause de l'apparition de microsphères présentes sur l'intégralité de la surface du substrat (Figure V.1).

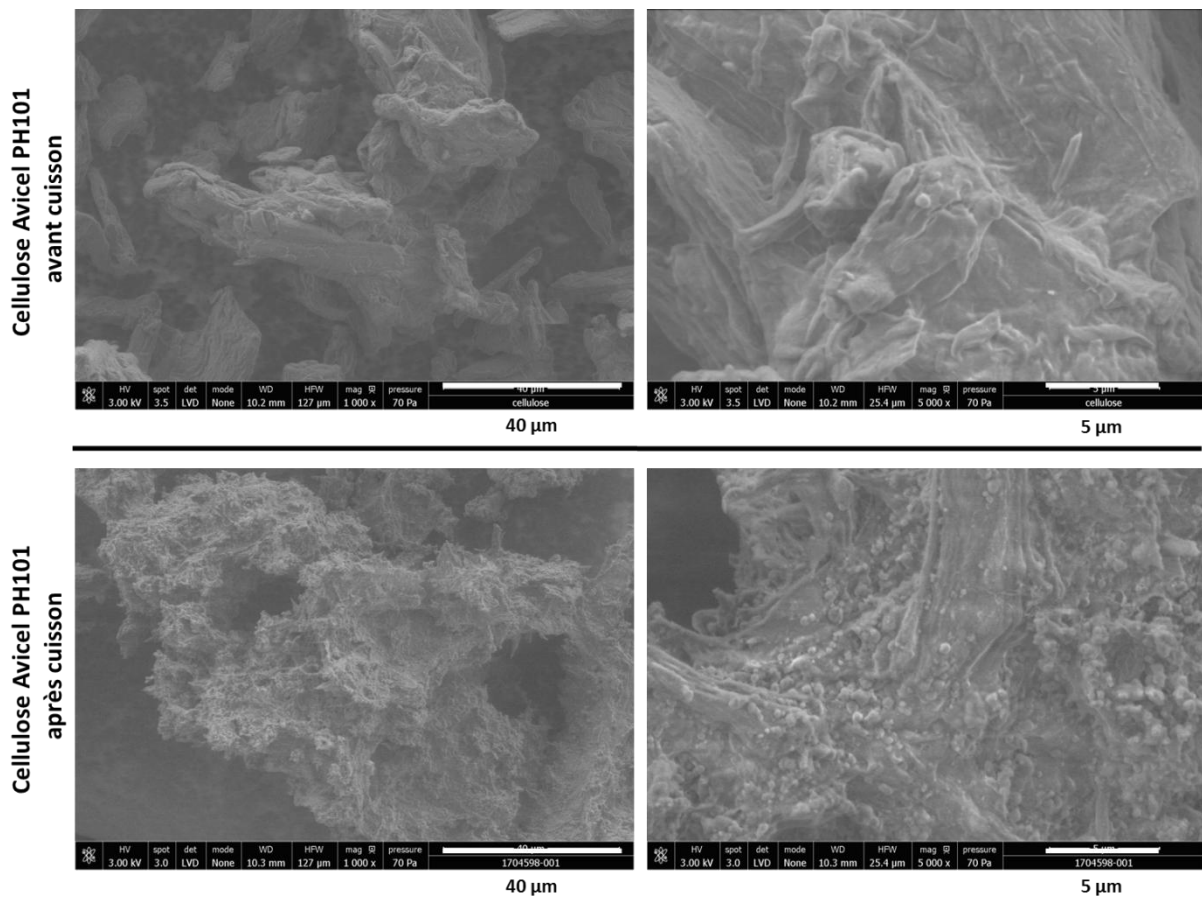


Figure V.1 : Images de microscopie électronique à balayage de la cellulose Avicel avant et après cuisson

En ce qui concerne la surface spécifique mesurée par physisorption d'azote, la cuisson conduit à une augmentation drastique de la surface qui atteint la valeur de $24 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Dans le même temps, le volume mésoporeux, non déterminable sur la cellulose Avicel avant cuisson car trop faible, augmente fortement avec l'apparition bien visible d'une population de pores de 7 nm (Figure V.2/A). Il est probable que cette population de pores soit directement liée à la porosité des microsphères ou encore aux interstices qui se créent entre elles.

La comparaison des spectres infrarouges de la cellulose Avicel avant et après cuisson montrent que deux bandes, observées à 1600 cm^{-1} et 1700 cm^{-1} , sont apparues lorsque le substrat a été prétraité. Ces deux bandes peuvent être attribuées à des liaisons C=O ou C-C conjuguées et C=O respectivement (Figure V.2/B). De plus, un massif, compris entre 860 et 1130 cm^{-1} , est présent pour la cellulose Avicel native et prétraitée. Ce massif peut être attribué aux sucres présents dans la cellulose native mais aussi à ceux présents dans la cellulose prétraitée. Cette observation est en accord avec l'analyse compositionnelle réalisée précédemment (2.48 g de cellulose encore présente dans les 5.67 g de substrat lavé séché récupéré).

Finalement, l'analyse thermogravimétrique (Figure V.2/C et D) montre que la cellulose Avicel sans cuisson possède deux pics pour la perte de masse à 335 et 490°C , ces pics étant caractéristiques de la cellulose. D'après *Kaloustian et al. (1996)*, le premier pic de perte de masse représente la libération des produits volatils issus de la décomposition de la cellulose (gaz, alcools, aldéhydes, cétones et acides) avec une formation en simultanée de charbon, ce dernier subissant par la suite une combustion réductrice entraînant l'apparition du second pic. Par contre, la comparaison du signal à celui de la cellulose Avicel ayant subi la cuisson montre que le prétraitement induit une décomposition plus précoce (à partir de 250°C) avec un étalement plus marqué suggérant une plus grande hétérogénéité de la cellulose Avicel prétraitée par rapport à son équivalent non prétraité.

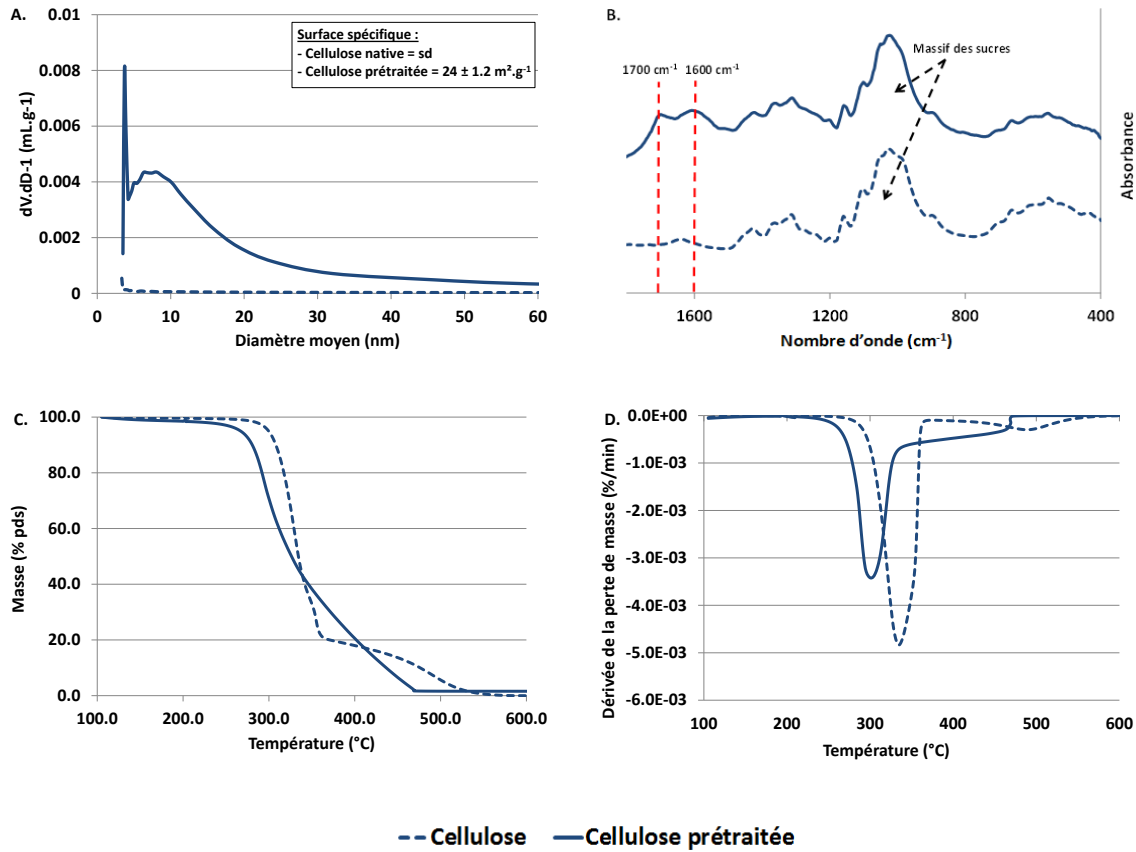


Figure V.2 : Analyses physico-chimiques de la cellulose Avicel avant et après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)

V.2.B.2.Xylane d'épis de maïs Roth

Le même type de démarche a été effectué sur le xylane d'épis de maïs Roth en lui appliquant les mêmes conditions de cuisson acide. Il est alors possible de constater que la méthodologie expérimentale mise en place ne permet d'analyser que 31.0 %pds de la quantité de xylane initialement introduite. En effet, dans les conditions de cuisson testées, la totalité du xylane a été convertie (0.0 g de xylane résiduel) en oligomérique de xylose (0.14 g), en xylose (0.02 g) et en furfural (1.98 g) (Tableau V.4). Après filtration, seulement 0.3 g de substrat prétraité a pu être récupéré (soit 3.8 % de la masse introduite). Comme le substrat prétraité ne contient plus de xylane, la fraction solide récupérée est donc uniquement composée d'humines insolubles agglomérées sous forme de particules de taille supérieure à 11 μ m. Le complément à 100 (soit 5.44 g) peut être considéré comme des humines solubles, qui pourraient regrouper des composés solubles ou des composés agglomérés sous la forme de particules dont la taille est inférieure à 11 μ m ; cette fraction représente 69.1 %pds de la masse introduite.

Tableau V.4 : Bilan xylose exprimé en masse sur la cuisson du xylane d'épis de maïs Roth

| | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
|-----------|--------|-------------------------|---|--------------------------|--------|----------|--------------------------|
| | Xylane | Xylane | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de xylose | Xylose | Furfural | Composés non identifiés* |
| Masse (g) | 7.88 | 0.30 | | 7.58* | | | |
| | | 0.00 | 0.30 | 0.14 | 0.02 | 1.98 | 5.44* |

* par différence

Au vu des faibles quantités de solide récupéré, il a été nécessaire de réaliser l'opération de cuisson 4 fois de suite pour avoir suffisamment de matière pour les caractérisations physicochimiques présentées ci-après. En microscopie MEB (Figure V.3), le xylane d'épis de maïs Roth apparaît, avant cuisson, sous la forme d'un amas de sphères de tailles variées (5 à 70 µm environ), avec un aspect lisse ou fripé. Après cuisson, cette structure n'est plus visible, ce qui est logique vu que la conversion du xylane est complète. Par contre, la structure de base est remplacée par des agrégats de particules de plus petites tailles et possédant une rugosité de surface importante.

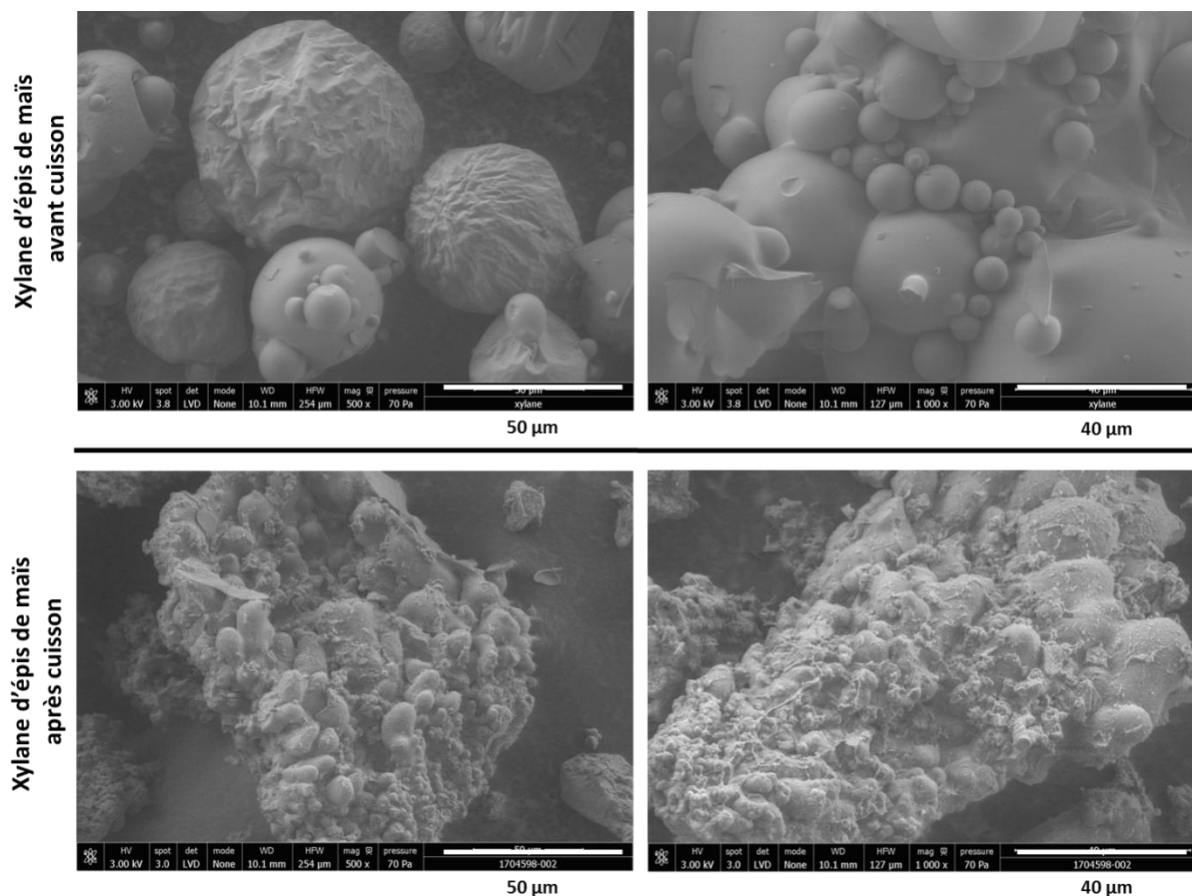


Figure V.3 : Images de microscopie électronique à balayage pour le xylane d'épis de maïs Roth avant et après cuisson

Comme pour la cellulose, la cuisson acide du xylane d'épis de maïs Roth conduit à une forte augmentation de la surface spécifique et du volume mésoporeux. En effet la surface spécifique avant cuisson est très faible et passe, après cuisson, à une valeur de $10\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ avec une population de pores dont le diamètre est d'environ $11\ \mu\text{m}$ (Figure V.4/A). En ce qui concerne l'analyse FTIR, son exploitation indique également que le substrat récupéré après cuisson possède de manière plus prononcée des fonctions chimiques de type C=O ou C-C conjugué ($1600\ \text{cm}^{-1}$) et C=O ($1700\ \text{cm}^{-1}$). De plus, le massif des sucres n'est plus présent pour le substrat lavé récupéré après prétraitement ce qui est pertinent au regard de l'analyse compositionnelle décrite ci-dessus (Figure V.4/B). Enfin l'analyse thermogravimétrique (Figure V.4/C et D), montre que l'empreinte thermique du xylane d'épis de maïs Roth a complètement disparu après cuisson et que le nouveau massif couvrant la plage de 240 à 480°C est sûrement représentatif des humines insolubles.

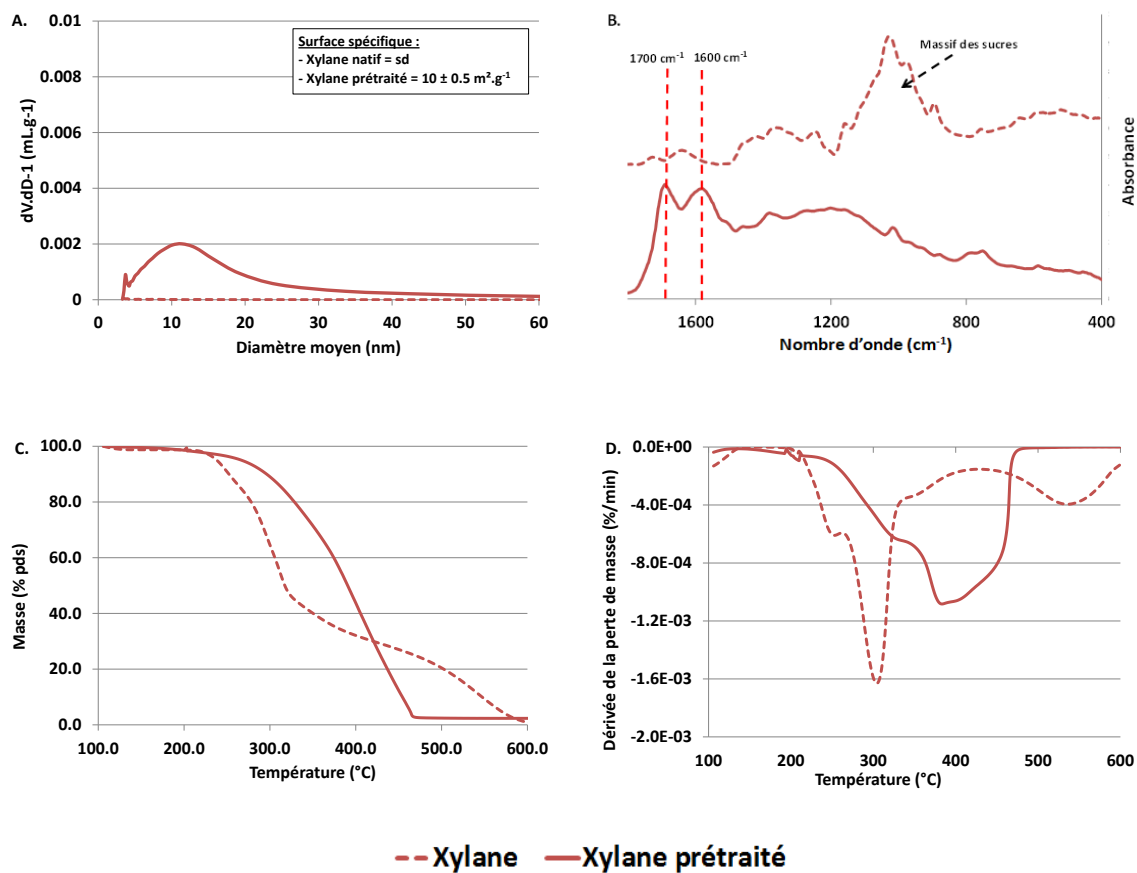


Figure V.4 : Analyses physico-chimiques pour le xylane d'épis de maïs Roth avant et après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)

V.2.B.3. Lignine de paille de blé Protobind

Dans le cas de la lignine de paille de blé Protobind, 5.98 g sec ont été prétraités. Après cuisson, 4.89 g de substrat lavé et sec ont été récupérés. Par différence, 1.09 g se sont donc solubilisés, soit 18.2 % pds de la masse introduite (Tableau V.5). Ce résultat est en accord avec les travaux de *Selig et al.* (2007) qui indiquent qu'une partie de la lignine se solubilise partiellement dans l'eau dès 130°C .

Tableau V.5 : Bilan lignine exprimé en masse sur la cuisson de la lignine de paille de blé Protobind

| | Charge | Effluent - Phase solide | Effluent - Phase liquide |
|-----------|--------|-------------------------|--------------------------|
| Masse (g) | 5.98 | 4.89 | 1.09* |

* par différence

En ce qui concerne la caractérisation de la fraction solide, l'analyse par microscopie MEB montre que la morphologie de la lignine Protobind est semblable avant et après cuisson. Cependant, des surfaces lisses semblent plus présentes sur la lignine prétraitée (Figure V.5).

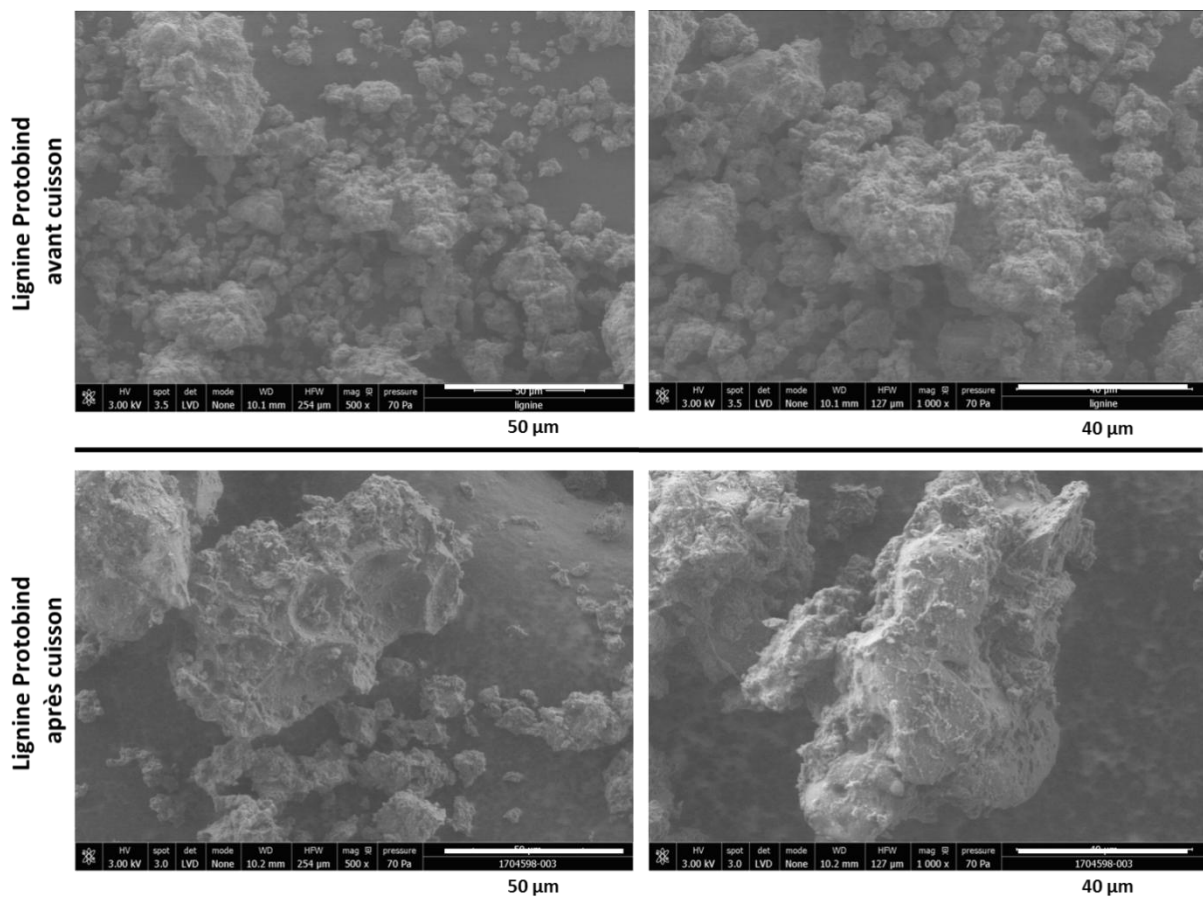


Figure V.5 : Images de microscopie électronique à balayage de la lignine Protobind avant et après cuisson

Par physisorption d'azote, la mesure de la surface spécifique de la lignine Protobind indique que cette dernière diminue après cuisson en passant de 13 à 6 m².g⁻¹, ce qui est en accord avec les images MEB qui montrent un lissage de la surface. De plus, la distribution volumique des pores est différente avec une réduction du diamètre moyen des pores qui passe de 68 à 38 nm lors de la cuisson (Figure V.6/A). L'analyse infrarouge montre quant à elle que les spectres sont semblables, ce qui suggère que les fonctions chimiques de la lignine ne sont pas impactées par le prétraitement (Figure V.6/B). A l'inverse, les deux thermogrammes sont légèrement différents ce qui laisse penser que la lignine a tout de même été un peu impactée par le prétraitement. Ils indiquent aussi que la dégradation

de la lignine Protobind, qu'elle soit native ou prétraitée, se fait sur une large plage de température (Figure V.6/C et D).

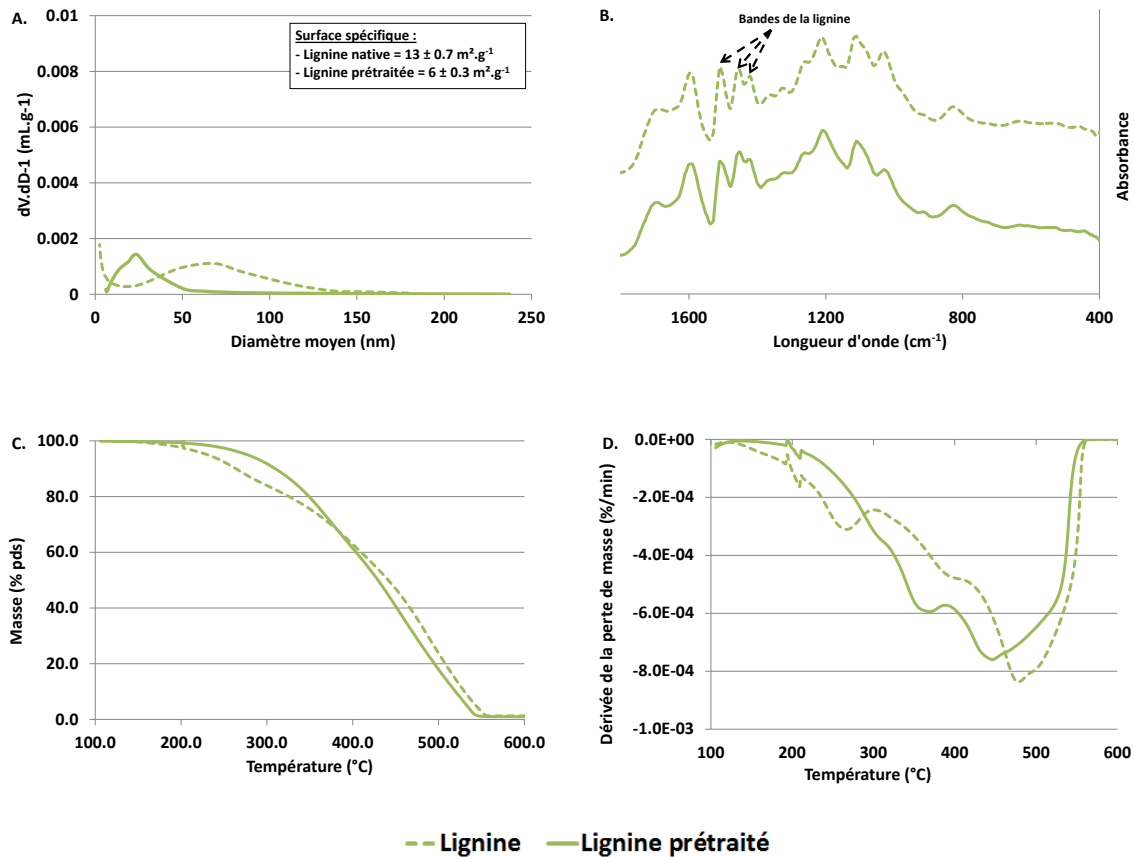


Figure V.6 : Analyses physico-chimiques de la lignine Protobind avant et après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)

V.2.C. Cuisson acide des mélanges de substrats modèles par paire

V.2.C.1. Cellulose Avicel et lignine de paille de blé Protobind

Le mélange de cellulose Avicel et de lignine de paille de blé Protobind a été réalisé en introduisant 15.24 et 5.75 g sec de chaque substrat respectivement. Dans le Tableau V.6, il est montré que la cellulose Avicel a suivi la même dégradation après cuisson du mélange que lorsqu'elle avait été prétraitée de manière isolée. En effet, même si il existe une variation des quantités de cellulose (2.48 et 1.58 g), d'oligomères de glucose (0.41 et 0.19 g), de glucose (2.28 et 3.35 g) et de 5-HMF (0.22 et 0.18 g) entre la cellulose seule et le mélange cellulose + lignine après cuisson, ces différences ne sont pas significatives. A l'inverse, seulement 7.32 g de substrat sec sont récupérés après prétraitement sur les 20.99 g introduits initialement ce qui est faible par rapport à la masse attendue qui aurait dû être d'environ 10.6 g (5.67 g provenant de la cellulose et 4.89 g provenant de la lignine). Etonnamment, il est possible que la présence de lignine ait ralenti la formation d'humines ayant précipité sur le solide.

Tableau V.6 : Bilan du mélange de cellulose Avicel + lignine Protobind exprimé en masse

| Cas de la cellulose Avicel prétraitée seule | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
|--|-------------------|-------------------------|---|--------------------------|---------|-------|---------------------------|
| | Cellulose | Cellulose | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de glucose | Glucose | 5-HMF | Composés non identifiés |
| Masse (g) | 15.22 | 5.67 | | 9.55* | | | |
| | | 2.48 | 2.86 | 0.41 | 2.28 | 0.22 | 6.97* |
| Cas de la lignine Protobind prétraitée seule | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| Masse (g) | 5.98 | 4.89 | | 1.09* | | | |
| Cas du mélange cellulose +lignine prétraité | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| | Cellulose+Lignine | Cellulose | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de glucose | Glucose | 5-HMF | Composés non identifiés * |
| Masse (g) | 15.24 + 5.75 | 7.32 | | 13.67* | | | |
| | | 1.56 | 5.19 | 0.19 | 3.35 | 0.18 | 10.52* |

* par différence

Comme pour tous les autres cas précédents, la fraction solide récupérée a été observée en microscopie MEB (Figure V.7). La présence de microsphères est à nouveau observée à la surface du mélange après cuisson. Cependant, comme l'échantillon prétraité est très homogène, il n'est pas possible de savoir si ces sphères ont précipité préférentiellement sur la surface cellulosique ou sur la surface ligueuse qui sont encore présentes après cuisson.

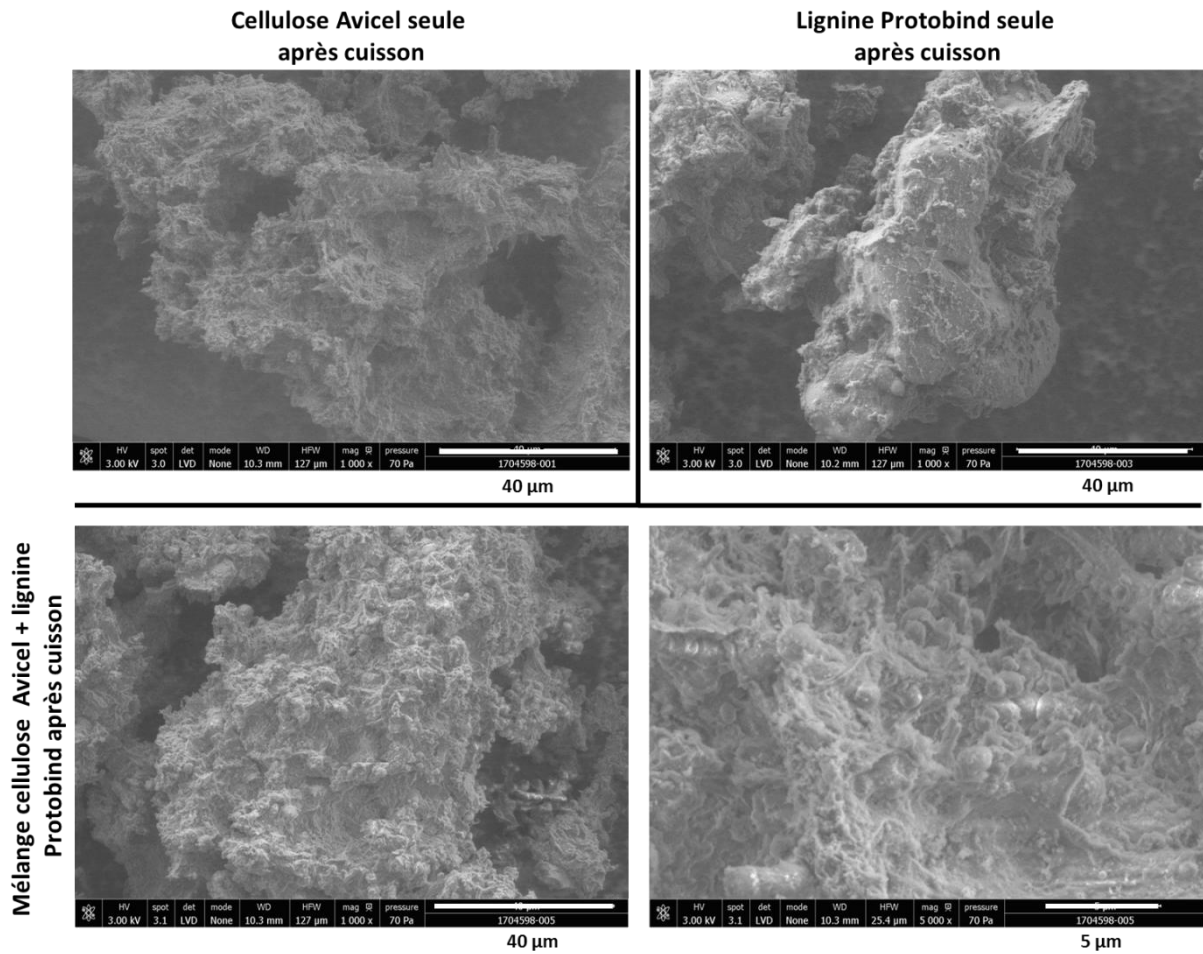


Figure V.7 : Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de lignine Protobind après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément

La surface spécifique du mélange prétraité est de $13 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$; elle est donc intermédiaire entre celle de la cellulose Avicel prétraitée seule ($24 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et de la lignine Protobind prétraitée seule ($6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). La même observation peut être faite pour la distribution du volume de pores ou le diamètre moyen est de 13 nm pour le mélange contre 7.3 et 23.7 nm pour la cellulose Avicel et la lignine Protobind prétraitées seules respectivement (Figure V.8/A). L'analyse infrarouge montre que le substrat récupéré après prétraitement contient les fonctions chimiques représentatives des deux substrats initiaux et les bandes caractéristiques des humines sont bien présentes à 1600 et 1700 cm^{-1} (Figure V.8/B). Enfin, l'analyse thermogravimétrique montre 3 pics bien distincts de perte de masse pour le mélange cellulose + lignine. Comme le 1^{er} pic et le 3^{ème} pic peuvent être attribués respectivement à la cellulose et à la lignine prétraités, il semblerait que le second, aux alentours de 360°C , corresponde aux humines (Figure V.8/C et D).

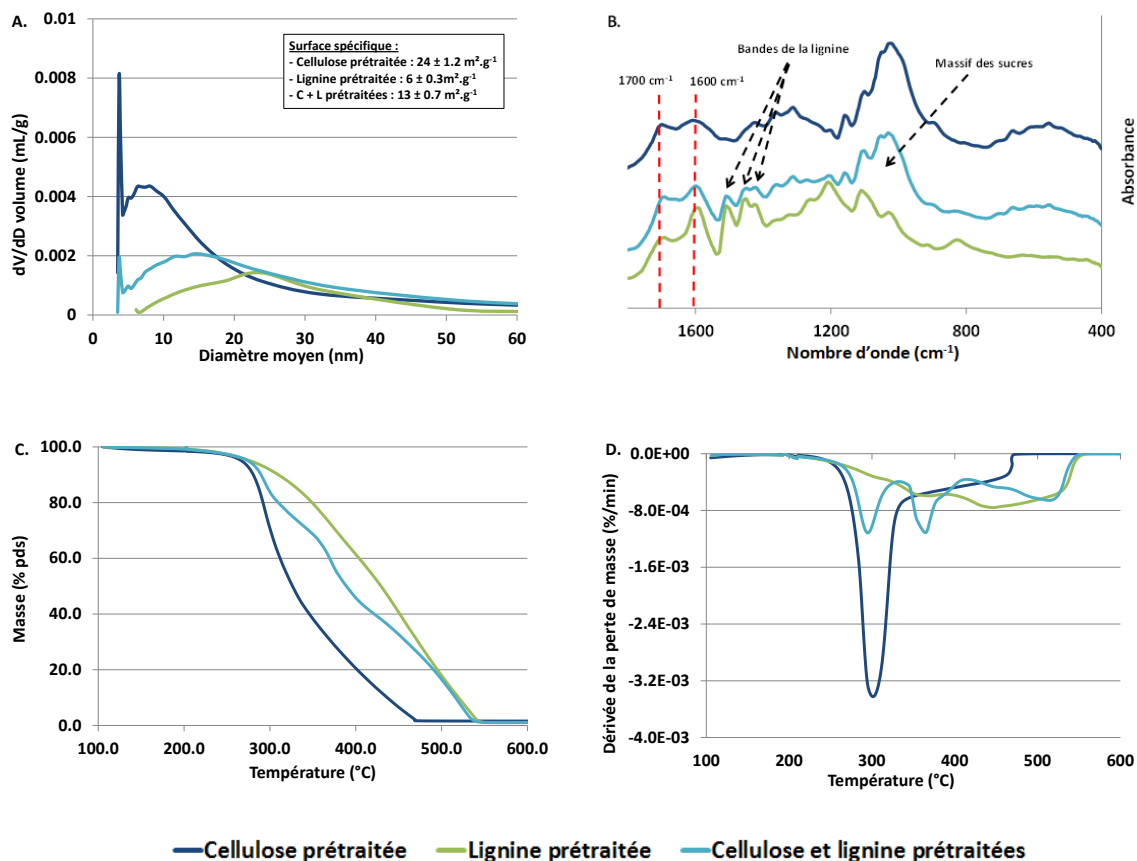


Figure V.8 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de lignine Protobind après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)

V.2.C.2. Cellulose Avicel et xylane d'épis de maïs Roth

Le mélange cellulose Avicel + xylane Roth a été réalisé en introduisant dans le mélange réactionnel 16.40 et 8.25 g sec de chaque substrat respectivement. Comme pour le mélange cellulose + lignine, la cellulose a suivi la même dégradation que lorsqu'elle est prétraitée de manière isolée. La même remarque peut aussi être faite pour le xylane en étudiant les masses de produits formés (Tableau V.7). Si l'on se concentre sur la quantité de substrat lavé récupéré après prétraitement, le mélange cellulose + xylane permet une récupération de 9.10 g sec (soit 36 %pds de la masse introduite) alors que la masse attendu aurait dû être d'environ 5.8 g (5.67 g provenant de la cellulose et 0.3 g provenant du xylane). Il est probable que la présence de cellulose Avicel non converti, donc d'une fraction solide substantielle dans le mélange, permette de capter et d'agglomérer une partie des humines présentes initialement dans la phase liquide. Les humines, majoritairement formées par la dégradation du xylane, se formeraient alors dans la phase liquide et s'agglomèreraient sur un support solide si ce dernier est présent. Dans le cas de la cuisson du xylane seul, les humines formées n'ont pas de support solide pour s'agglomérer, d'où les faibles masses récupérées dans la fraction solide. Dans le cas de la cuisson du mélange cellulose + xylane, la cellulose non converti joue le rôle de support solide et capte une partie des humines formées. D'où les valeurs plus élevées.

Tableau V.7 : Bilan du mélange de cellulose Avicel + xylane Roth exprimé en masse réelle

| Cas de la cellulose Avicel prétraitée seule | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
|---|-----------|---------------------------------|---|---|---------|----------|---------------------------|
| | Cellulose | Cellulose | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de glucose | Glucose | 5-HMF | Composés non identifiés * |
| Masse (g) | 15.22 | 5.67 | | 9.55* | | | |
| | | 2.48 | 2.86 | 0.41 | 2.28 | 0.22 | 6.97* |
| Cas du xylane Roth prétraité seul | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| | Xylane | Xylane | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de xylose | Xylose | Furfural | Composés non identifiés * |
| Masse (g) | 7.88 | 0.30 | | 7.58* | | | |
| | | 0.00 | 0.30 | 0.14 | 0.02 | 1.98 | 5.44* |
| Cas du mélange cellulose +xylane prétraité | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| | 24.65 | 9.10 dont 5.90 de résidu solide | | 15.55* dont 9.99 g de composés non identifiés | | | |
| Masse (g) | Cellulose | Cellulose | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de glucose | Glucose | 5-HMF | Composés non identifiés * |
| | 16.40 | 2.62 | Non déterminable | 0.31 | 3.43 | 0.23 | Non déterminable |
| Masse (g) | Xylane | Xylane | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de xylane | Xylane | Furfural | Composés non identifiés * |
| | 8.25 | 0.19 | Non déterminable | 0.43 | 0 | 1.16 | Non déterminable |

*par différence

Dans le cas particulier de ce mélange, des fibres de cellulose sont encore visibles dans le mélange prétraité et ces dernières sont recouvertes de particules sphériques de différentes formes (Figure V.9). Ces observations sont en accord avec l'analyse chimique. En effet, le substrat prétraité contient encore de la cellulose résiduelle et le xylane Roth a été totalement converti. Il est alors logique de penser que les humines, issues de la dégradation ultime du glucose et du xylose, ont précipité uniquement sur les fibres de cellulose encore non converties.

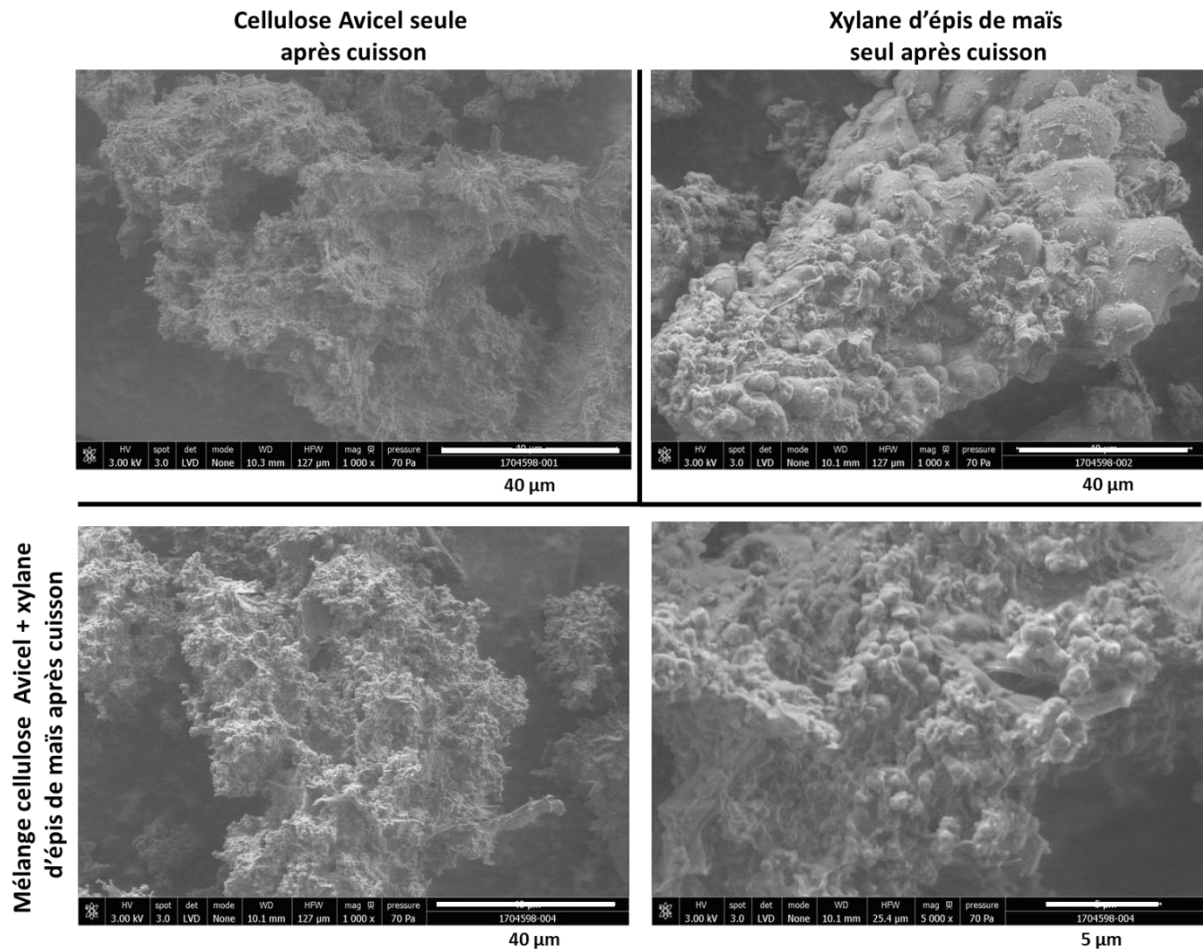


Figure V.9 : Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de xylane Roth après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément

Comme pour le mélange cellulose Avicel + lignine Protobind décrit précédemment, le mélange cellulose Avicel + xylane Roth possède, après cuisson, une surface spécifique intermédiaire de $17 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ entre celle de la cellulose Avicel seule ($24 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et celle du xylane Roth seul ($10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). La même observation peut être faite pour la distribution du volume de pores, même si la différence est moins marquée que pour le mélange cellulose Avicel + lignine Protobind (Figure V.10/A). L'analyse infrarouge montre que le mélange après cuisson contient les fonctions chimiques représentatives des deux substrats prétraités isolément, car le massif des sucres est visible et les bandes caractéristiques des humines sont bien présentes à 1600 et 1700 cm^{-1} (Figure V.10/B). Enfin, comme pour l'infrarouge, l'analyse thermogravimétrique indique que le mélange prétraité possède les caractéristiques des deux substrats prétraités seules et un épaulement est visible aux alentours de 340°C qui pourrait être assimilé aux humines (Figure V.10/C et D). Comme pour le mélange cellulose + lignine, un pic à 360°C est également visible.

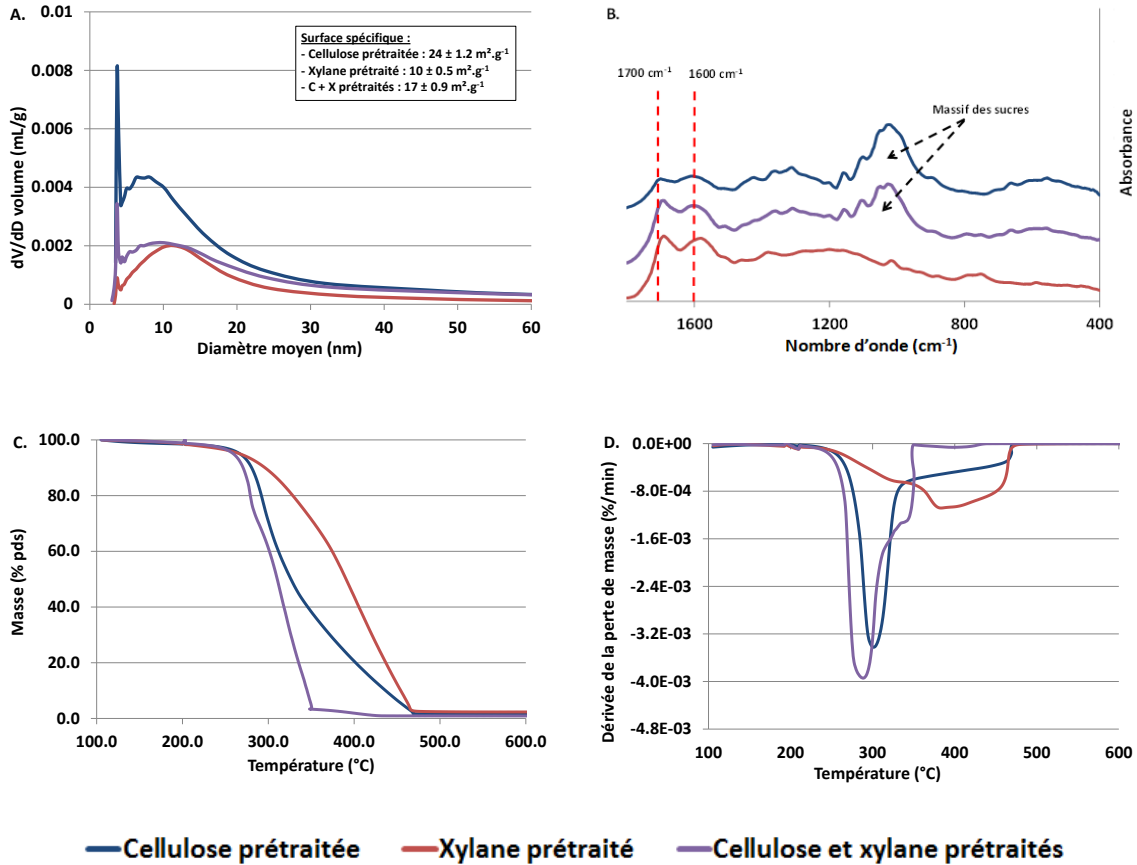


Figure V.10 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de cellulose Avicel et de xylane Roth après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)

V.2.C.1. Xylane d'épis de maïs Roth et lignine de paille de blé Protobind

Le mélange xylane d'épis de maïs Roth et de lignine de paille de blé Protobind a été réalisé en introduisant 8.12 et 5.73 g sec de chaque substrat respectivement. Dans le Tableau V.8, il apparaît que la dégradation du xylane durant la cuisson est similaire s'il est prétraité seul ou mélangé avec de la lignine (à l'incertitude expérimentale près). A l'inverse, la quantité de substrat lavé récupéré est de 10.63 g ce qui est largement au-dessus des 5.19 g attendu (4.89 g provenant de la lignine et 0.3 provenant du xylane). Le mélange de ces deux substrats entraîne donc une augmentation de la quantité de substrat prétraité récupéré après prétraitement et conduit également à une production d'humine solide précipité sur le substrat plus importante. En effet, si l'hypothèse est faite que 4.89 des 7.73 g de résidu solide proviennent de la lignine, alors la quantité d'humines précipités sur le substrat est de 2.83 g, soit 20 % pds de la masse totale introduite et 34.8 % de la masse de xylane introduit (soit 10 fois plus que dans le cas du xylane prétraité seul). A nouveau, il est probable que la présence de lignine ait favorisé la fixation des humines sur sa surface.

Tableau V.8 : Bilan du mélange de lignine Protobind + xylane Roth exprimé en masse réelle

| Cas du xylane Roth prétraité seul | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
|--|------------------|-------------------------|---|--------------------------|--------|----------|---------------------------|
| | Xylane | Xylane | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de xylane | Xylane | Furfural | Composés non identifiés |
| Masse (g) | 7.88 | 0.30 | | 7.58 | | | |
| | | 0.00 | 0.30 | 0.14 | 0.02 | 1.98 | 5.44 |
| Cas de la lignine Protobind prétraitée seule | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| Masse (g) | 5.98 | 4.89 | | 1.09* | | | |
| Cas du mélange xylane +lignine prétraité | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| | Xylane + lignine | Xylane | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de xylane | Xylane | Furfural | Composés non identifiés * |
| Masse (g) | 8.12 + 5.73 | 10.63 | | 3.24* | | | |
| | | 0.00 | 7.73 | 0.00 | 0.00 | 1.80 | 4.32* |

* par différence

Pour ce mélange, des particules sphériques de différentes tailles apparaissent à la surface de la lignine (Figure V.11). Il est pertinent de penser que les humines provenant du xylane ont précipité sur la lignine durant le prétraitement.

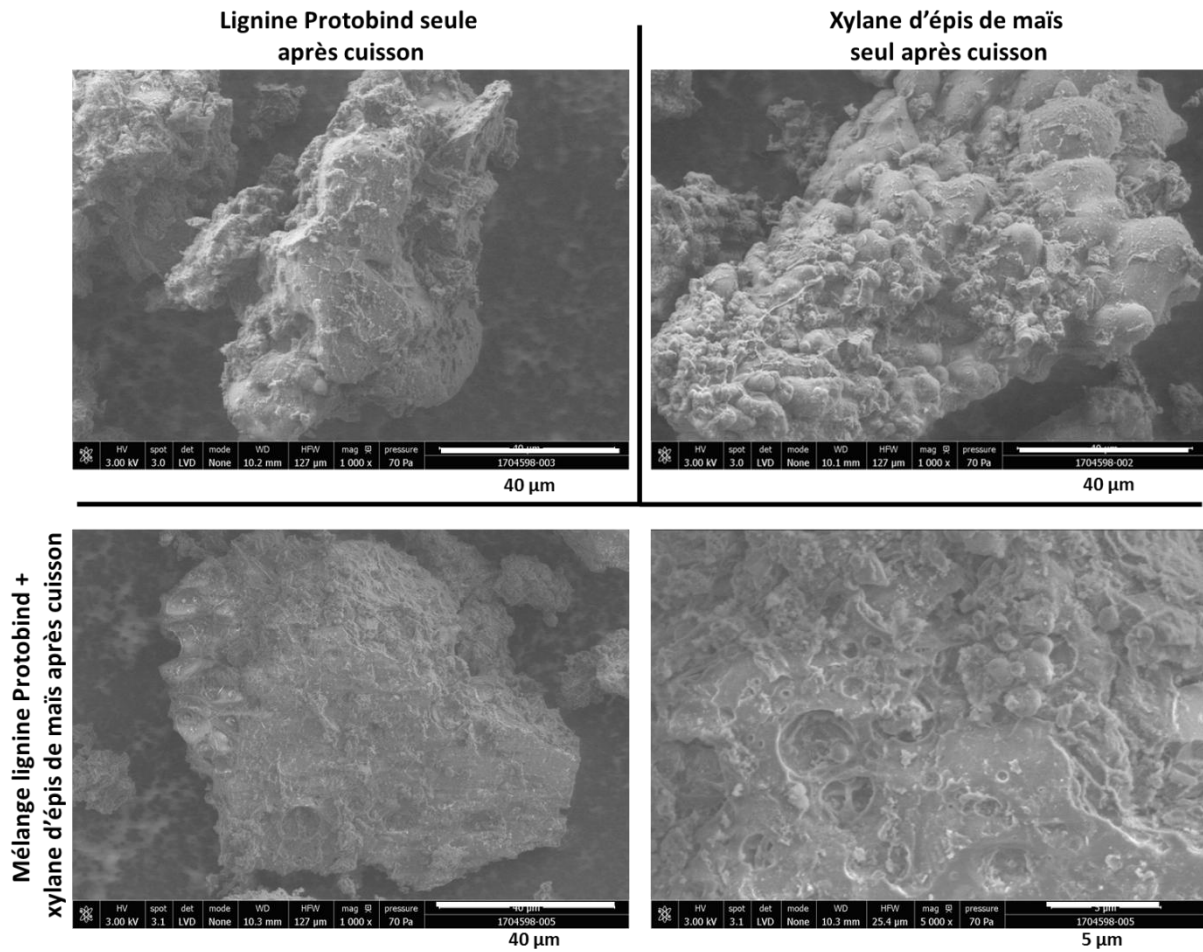


Figure V.11 : Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément

Pour ce mélange réactionnel, l'analyse par physisorption d'azote n'a pas pu être réalisée car la quantité de substrat nécessaire à l'analyse n'était pas disponible. A l'inverse, l'analyse infrarouge montre que le substrat récupéré après prétraitement est semblable au spectre de la lignine prétraitée isolément malgré le fait que les bandes à 1600 et 1700 cm^{-1} soient plus importantes pour le mélange xylane Roth + lignine Protobind (Figure V.12/B) que pour la lignine Protobind seule. Enfin, l'analyse thermogravimétrique indique également que le mélange mécanique possède les caractéristiques des deux substrats prétraités seuls (Figure V.12/C et D).

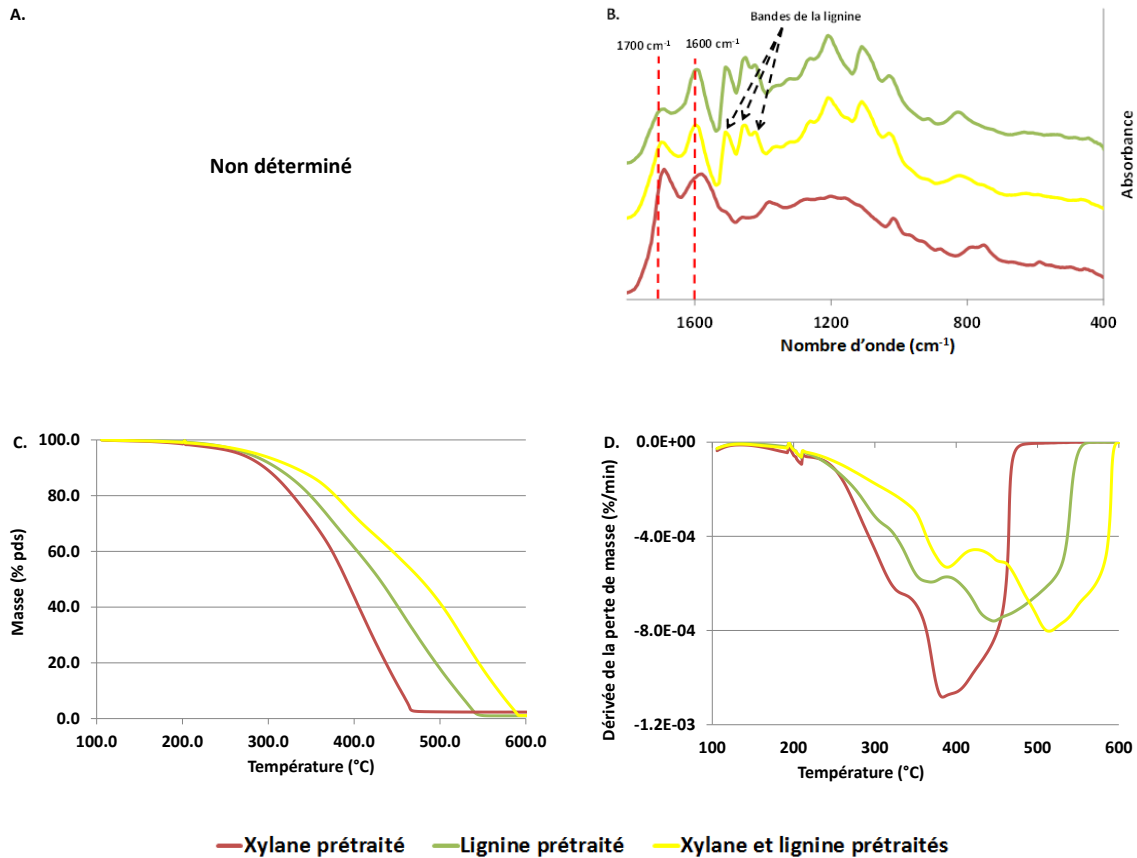


Figure V.12 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)

V.2.D.Cuisson acide du mélange des trois substrats modèles

Le mélange cellulose Avicel + xylane Roth + lignine Protobind a été réalisé en introduisant 16.36, 8.13 et 5.77 g sec respectivement. Comme pour les mélanges contenant de la cellulose d'une part et, soit du xylane, soit de la lignine d'autre part, il apparaît que la cellulose Avicel a suivi la même dégradation que lorsqu'elle est prétraitée de manière isolée (Tableau V.9). De plus, il apparaît que 13.13 g de substrat lavé séché sont récupérés sur les 30.26 g introduits initialement ce qui est élevé par rapport à la masse attendue qui aurait dû être d'environ 10.86 g (5.67 g, 0.3 g, 4.89 g pour la cellulose, le xylane et la lignine prétraités respectivement). Comme précisé pour le mélange cellulose + xylane, il est possible que ces deux composés entraînent une formation et/ou un dépôt plus important d'humines qui précipitent sur le substrat (qui contient alors des fibres de cellulose encore non converties et la lignine). Enfin, il apparaît que 42.0 %pds du mélange introduit correspond à des composés solubles non identifiés et il est impossible de savoir s'il s'agit de molécules de dégradation secondaire ou de macromolécules provenant de la condensation/polymérisation des sucres sous leurs formes monomérique ou dégradée. Cependant, il est probable que ces composés soient présents dans le jus de cuisson, soit sous forme soluble, soit agglomérés en particules de taille inférieure à 11 µm.

Tableau V.9 : Bilan du mélange de lignine Protobind + xylane Roth + cellulose Avicel exprimé en masse réelle

| Cas de la cellulose Avicel prétraitée seule | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
|--|-----------|-------------------------------------|---|--|---------|----------|---------------------------|
| | Cellulose | Cellulose | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de glucose | Glucose | 5-HMF | Composés non identifiés * |
| Masse (g) | 15.22 | 5.67 | | 9.55* | | | |
| | | 2.48 | 2.86 | 0.41 | 2.28 | 0.22 | 6.97* |
| Cas du xylane Roth prétraité seul | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| | Xylane | Xylane | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de xylose | Xylose | Furfural | Composés non identifiés * |
| Masse (g) | 7.88 | 0.30 | | 7.58* | | | |
| | | 0.00 | 0.30 | 0.14 | 0.02 | 1.98 | 5.44* |
| Cas de la lignine Protobind prétraitée seule | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| | | | | | | | |
| Masse (g) | 5.98 | 4.89 | | 1.09* | | | |
| Cas du mélange cellulose +xylane + lignine prétraité | Charge | Effluent - Phase solide | | Effluent - Phase liquide | | | |
| | 30.26 | 13.13 g dont 11.63 de résidu solide | | 17.13 g* dont 12.71 de composés non identifiés | | | |
| Masse (g) | Cellulose | Cellulose | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de glucose | Glucose | 5-HMF | Composés non identifiés * |
| | 16.36 | 1.98 | Non déterminable | 0.32 | 2.24 | 0.22 | Non déterminable |
| Masse (g) | Xylane | Xylane | Résidu solide après HA du substrat lavé | Oligomère de xylane | Xylane | Furfural | Composés non identifiés * |
| | 8.13 | 0.28 | Non déterminable | 0.42 | 0 | 1.22 | Non déterminable |

*par différence

Pour ce mélange mécanique, des fibres de cellulose et des fragments assimilables à la lignine sont visibles et recouverts de particules sphériques. Ces particules ont des formes différentes qui semblent provenir de la transformation ultime, soit du xylane, soit de la cellulose. En effet, le xylane produit plutôt des gouttes de plusieurs tailles et accolées les unes aux autres alors que la cellulose

produit des petites sphères plus individualisées. (Figure V.13). Ces observations sont en accord avec la littérature (*Girisuta et al. (2006)*; *Yao et al. (2007)*; *Titirici et al. (2008)*; *Patil and Lund (2011)*; *van Zandvoort et al. (2013)*).

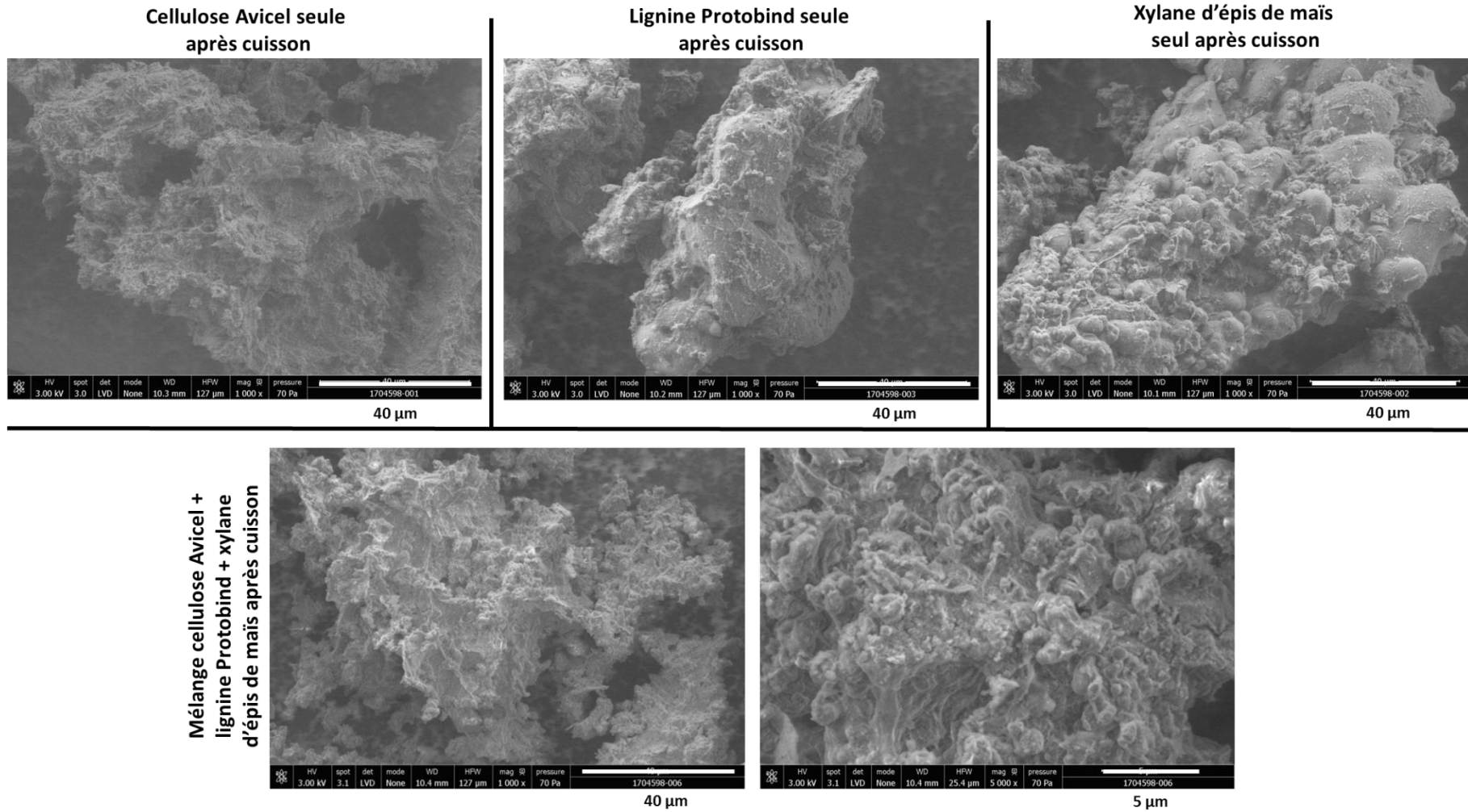


Figure V.13 : Images de microscopie électronique à balayage pour le mélange mécanique de cellulose Avicel, de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson et comparaison avec les mêmes substrats prétraités isolément

La physisorption d'azote, l'analyse FTIR et l'analyse thermogravimétrique ont également été réalisées sur le mélange complexe (Figure V.14). Comme pour les mélanges réalisés deux à deux, le prétraitement du mélange des trois substrats modèles produit un substrat prétraité qui possède les caractéristiques des substrats prétraités isolément. C'est le cas par exemple pour l'analyse infrarouge où le massif des sucres est bien visible ainsi que les trois bandes caractéristiques de la lignine. De plus les deux bandes à 1600 et 1700 cm^{-1} des humines sont bien présentes. Enfin pour l'analyse thermogravimétrique, un épaulement à 380°C semble provenir des humines comme cela a été discuté précédemment (340°C pour le mélange xylane + cellulose / 360°C pour le mélange cellulose + lignine)

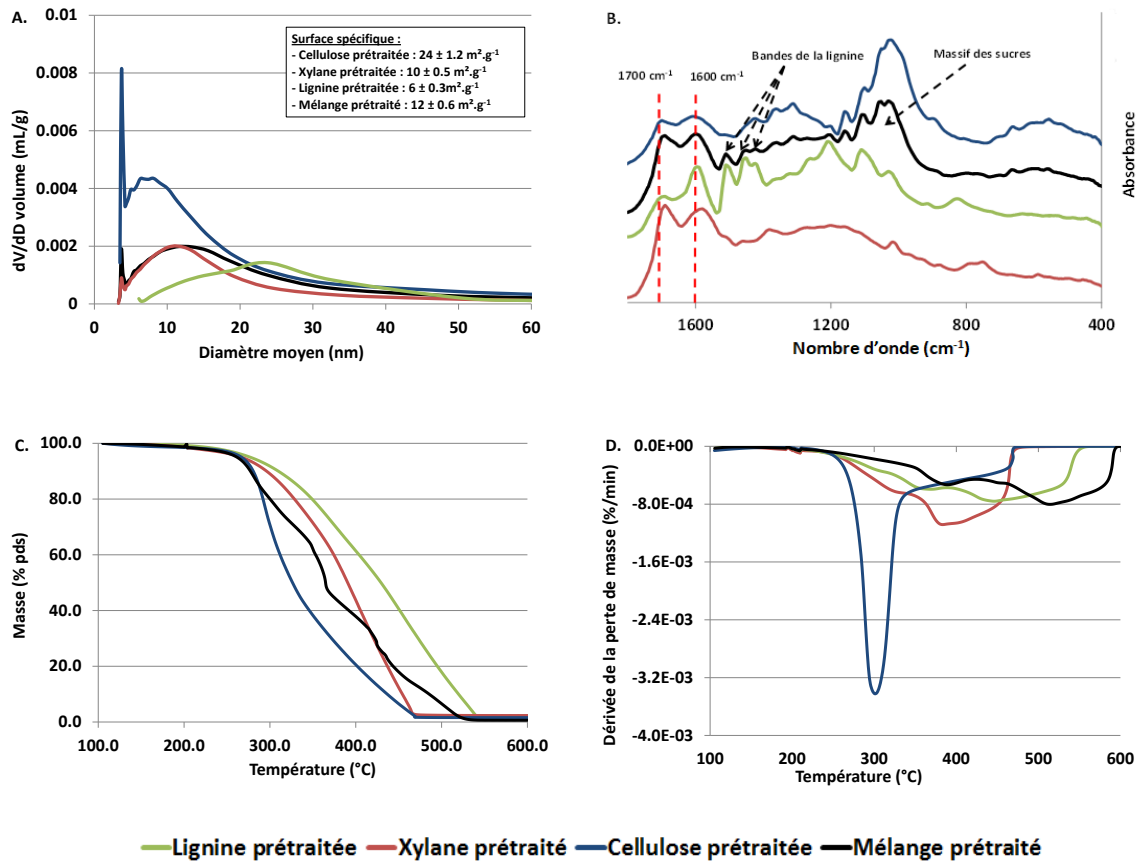


Figure V.14 : Analyses physico-chimiques pour le mélange mécanique de cellulose Avicel, de xylane Roth et de lignine Protobind après cuisson (A/ Distribution du volume poreux ; B/ Spectres infrarouges ; C/ Perte de masse avec l'augmentation de la température ; D/ Dérivée de la perte de masse avec l'augmentation de la température)

V.2.E.Conclusion intermédiaire

La méthodologie expérimentale mise en place dans cette étude a permis de caractériser les humines déposées sur la fraction solide résiduelle mais également de mieux comprendre les mécanismes de formation de ces dernières durant un prétraitement à l'acide dilué réalisé dans des conditions opératoires sévères. En effet, les analyses infrarouges ont montré que les humines étaient composées de structures aromatique et aliphatique, ce qui a confirmé les observations réalisées par Sun and Li (2004) ; Yao et al. (2007) ; Titirici et al. (2008) ; Patil and Lund (2011), (2011) et Hu et al. (2012). Ensuite, il a été vu que la formation et le dépôt des humines sur le solide créent de la porosité

et entraînent une augmentation de la surface spécifique et ce qu'elles soient issues de la dégradation ultime du xylane ou de cellulose. Pour des substrats lignocellulosiques, cette propriété a déjà pu être observée dans la littérature (Guo et al (2008); Kristiani et al. (2013)). Enfin, l'analyse thermogravimétrique a montré que les humines étaient thermiquement plus stables que la cellulose mais moins qu'une partie de la lignine. Ainsi, un pic à 380°C serait potentiellement assimilable aux humines précipitées. Cependant tous ces résultats sont à tempérer car ils ne concernent que la fraction des humines qui se sont déposées sur la fraction solide résiduelle du substrat de départ ou qui se sont agglomérées sous forme de particules suffisamment grandes pour être filtrées. La proportion de ces composés ne représente en effet qu'une proportion, certes non négligeable, des produits de dégradation totaux non déterminés (entre 42 et 70 %pds).

En ce qui concerne les mécanismes de formation des humines (Figure V.15), la lignine ne semble pas être la source primaire de production des humines, à l'inverse de la cellulose et du xylane comme l'ont également montré Sannigrahi et al. (2011) et Meng and Ragauskas (2017). Quantitativement, la cellulose seule produit davantage d'humines qui sont récupérées dans la fraction solide que le xylane seul. En effet, la lignine semble favoriser le dépôt d'humines lorsqu'elle est en présence de xylane mais pas en présence de cellulose. Enfin le mélange xylane + cellulose entraîne une production importante des humines et il semblerait que la cellulose encore non hydrolysée se conduise comme un support de captation tout comme la lignine. Il est donc difficile de savoir si ces composés fonctionnent de manière synergique ou bien si la présence d'un substrat (lignine ou cellulose non hydrolysée) facilite le dépôt des humines.

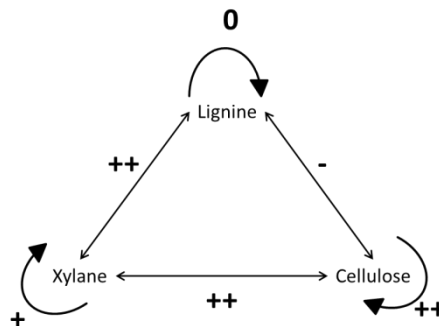


Figure V.15 : Représentation schématique des mécanismes de formation des humines présentes dans la fraction solide

V.3. Etude sur un substrat délignifié

Dans la partie précédente, la formation des humines durant la cuisson acide a été étudiée par l'intermédiaire de substrats modèles (cellulose Avicel, xylane d'épis de maïs Roth, lignine de paille de blé Protobind). Afin de se rapprocher un peu plus d'un substrat lignocellulosique classique comme la paille de blé, il a été décidé de travailler sur un substrat délignifié et de comparer les analyses obtenues à celles réalisées sur une paille de blé. Le choix du substrat s'est porté sur de la pâte à papier blanche issue de bois de feuillus et fournie sous forme de feuilles de pâte rigide (format A4) par le Laboratoire Génie des Procédés Papetiers (LGP2) de Grenoble.

V.3.A. Stratégie expérimentale

V.3.A.1. Description de la pâte à papier

La composition chimique de la pâte à papier est donnée dans le tableau ci-dessous. Les potentiels en sucres et la teneur en lignine insoluble ont été déterminés après hydrolyse acide (cf. § II.4.A.3). Dans ce cas particulier, une légère réadaptation du protocole a dû être réalisée. En effet, les ramettes n'ont pas pu être directement broyées à 1 mm à cause des risques de surchauffe du broyeur Retsch. Il a donc été choisi de mélanger, au mixeur plongeant, 40 g de substrat dans 360 mL d'eau distillée avant de faire sécher l'ensemble à 45°C durant 24 h. Le substrat sec obtenu a ensuite pu être broyé plus facilement à 1 mm pour pouvoir effectuer l'hydrolyse acide et la caractérisation compositionnelle.

L'analyse compositionnelle confirme que le substrat est bien délignifié et qu'il est enrichi en cellulose. La proportion d'hémicelluloses est également non négligeable et principalement composée de xylane, ce qui est normal étant donné que la pâte a été fabriquée à partir de bois de feuillus riches en xylanes. Les teneurs en galactane, arabinane et mannane étant faibles, il a été choisi de ne pas traiter ces polymères dans la suite de cette étude.

Tableau V.10 : Analyse compositionnelle de la pâte à papier

| | | |
|--------------------------------|------|--------------|
| Teneur en MS | %pds | 98.7 ± 0.02 |
| Teneur en glucane/MS | %pds | 70.65 ± 0.72 |
| Teneur en xylane/MS | %pds | 12.84 ± 0.23 |
| Teneur en galactane/MS | %pds | 4.50 ± 0.56 |
| Teneur en arabinane/MS | %pds | 0.55 ± 0.02 |
| Teneur en mannane/MS | %pds | 3.78 ± 0.42 |
| Teneur en lignine insoluble/MS | %pds | 0 |

V.3.A.2. Choix des conditions opératoires de cuisson acide

Dans l'étude de cuisson acide présentée dans le Chapitre III, il a été vu qu'à partir d'un facteur de sévérité (F_0) de 1.53, les bilans en glucose et xylose ne bouclaient plus à 100 %. C'est pourquoi, il

avait été suspecté dans ce même chapitre que les composés ultimes de dégradation, nommés humines, se formaient à partir de cette sévérité. Afin de limiter le nombre d'expérimentations, trois jeux de conditions opératoires ont été sélectionnés en plus des conditions opératoires du point central de cuisson :

- $F_0 = 1.53$, le point central (140°C - 60min - 1 %pds d'H₂SO₄)
- $F_0 = 2.00$ (180°C - 10min - 1 %pds d'H₂SO₄)
- $F_0 = 2.23$ (180°C - 20min - 1 %pds d'H₂SO₄)
- $F_0 = 2.67$ (180°C - 60min - 1 %pds d'H₂SO₄)

Le prétraitement par cuisson acide ainsi que le post-traitement (neutralisation, séparation solide-liquide, lavage) de la pâte à papier ont été réalisés de la même manière que pour la paille de blé (cf. §II.2.A), à l'exception de la préparation du mélange réactionnel. En effet, afin de ne pas détériorer le moteur d'agitation de l'outil de cuisson, les ramettes ont été coupées grossièrement en carré de 1×1 cm puis le mélange réactionnel à 10 %pds MS a été réalisé (40 g sec de substrat + 360 mL de liqueur d'imprégnation). Le mélange a ensuite été mélangé jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène à l'aide d'un mixeur plongeant. Le prétraitement de cuisson acide a été réalisé après 15 h d'imprégnation sous agitation.

V.3.B.Détermination des rendements expérimentaux et réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique

V.3.B.1.Bilan sur le glucose et le xylose

Les cuissons acides ont été effectuées sur des mélanges de 400 g à 10 %pds MS de pâte à papier. A partir des caractéristiques compositionnelles de cette dernière, les quantités de glucose et de xylose introduites dans l'autoclave U868 ont pu être déterminées :

- masse de glucose potentiel : 31.60 ± 0.34 g
- masse de xylose potentiel : 5.87 ± 0.06 g

Les bilans bruts des deux sucres majoritaires sont présentés dans la Figure V.16. Dans un premier temps, les bilans effectués sur la fraction glucose et sur la fraction xylose suivent les mêmes tendances que pour la paille de blé. En effet, plus la sévérité de prétraitement est élevée et plus les bilans sont mauvais. En comparant ces derniers à ceux de la paille de blé prétraitée aux mêmes conditions opératoires, il apparaît que les bilans bruts en glucose sont moins bons, avec une différence d'environ 20 % pour des facteurs de sévérité supérieurs à 1.53. Cette différence est probablement due à la nature du substrat. En effet, comme la pâte à papier ne contient pas de lignine, la cellulose pourrait être potentiellement plus accessible et donc plus sensible à la catalyse acide ce qui conduirait à la formation plus rapide des différents produits, dont les humines. En ce qui concerne le xylane, les bilans apparaissent meilleurs pour la pâte à papier que pour la paille de blé, ce qui paraît contradictoire avec l'explication précédente sur la fraction glucose. Cependant il est possible que les xylanes présents dans la pâte à papier (qui sont en fait les xylanes résiduels qui n'ont pas été convertis par les traitements de fabrication de la pâte à papier) soient très réfractaires à l'hydrolyse acide, comparés aux xylanes de la paille de blé. Ce point expliquerait alors la différence comportementale de la pâte à papier et de la paille de blé en termes de réactivité à l'hydrolyse acide entre la cellulose et le xylane, et donc en termes de bilans sucre.

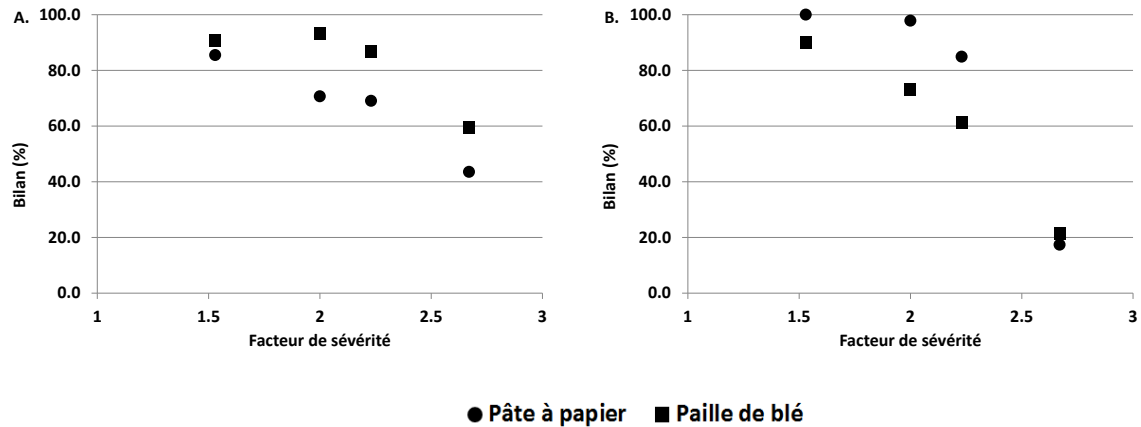


Figure V.16 : Résultats expérimentaux bruts pour les bilans matières du glucose (A) et du xylose (B) en fonction du facteur de sévérité

V.3.B.2. Evolution des rendements en glucose et en xylose

Comme pour la paille de blé, les rendements en glucose et en xylose sous leurs différentes formes ont été calculés sur les quatre pâtes à papier prétraitées (Figure V.17). De plus, les rendements théoriques en humines ont été déterminés par différence à 100.

Pour ces deux sucres, il apparaît que les évolutions des rendements sont semblables entre la pâte à papier (points) et la paille de blé (ligne continue). En effet, la cinétique de dégradation des polysaccharides sous leurs formes oligomérique, puis monomérique et enfin dégradée est beaucoup plus rapide pour le xylane que pour la cellulose. De plus, pour un facteur de sévérité d'environ 1.53, le xylane est quasiment totalement hydrolysé et le rendement en xylose monomérique dans le jus de cuisson est probablement optimal (≈ 73 %pds). A cette sévérité, les conditions opératoires sont suffisamment sévères pour commencer à dégrader la cellulose en oligomère puis en monomère. Ensuite pour le facteur de sévérité le plus élevé testé ($F_0=2.67$), 56.4 %pds du glucose et 56.6 %pds du xylose introduits initialement ne sont pas quantifiés par les techniques d'analyse utilisées et ont donc été attribués aux humines, qui peuvent se retrouver soit dans la phase liquide, soit précipitées sur le solide (phase solide). Enfin, la seule différence majeure, entre la pâte à papier et la paille de blé, apparaît pour le furfural, produit de dégradation du xylane. En effet, le rendement en furfural passe de 62.4 à 32.4%pds pour un facteur de sévérité de 2.23 et 2.67 respectivement. La contribution du furfural dans la formation des humines est donc évidente, comme cela a déjà été montré par *van Zandvoort et al. (2013)* ou encore *Yamamoto et al. (1990)*.

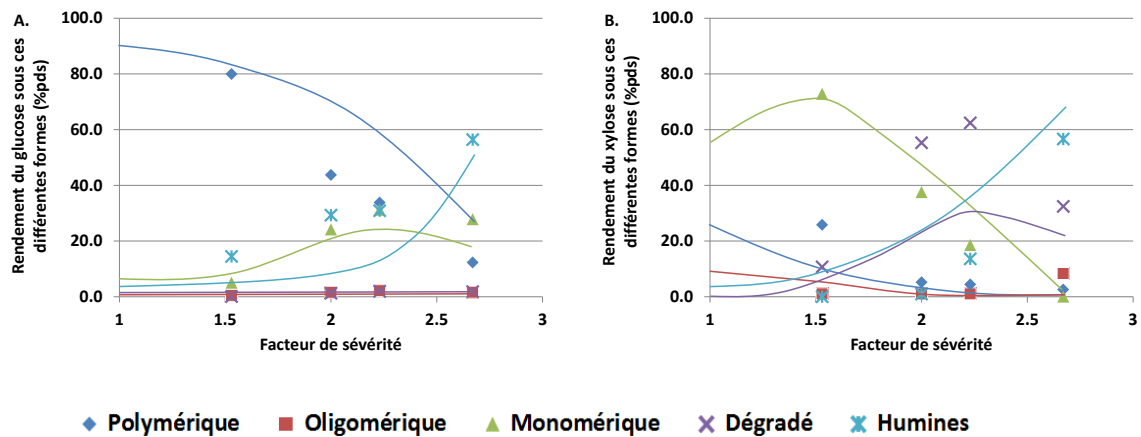


Figure V.17 : Rendements des sous-produits de la cellulose et du xylane présents dans la pâte à papier en fonction du facteur de sévérité (ligne continue = tendances observées sur la paille de blé)

V.3.B.3. Evolution de la teneur en composés solubles et insolubles

L'hydrolyse acide des substrats prétraités permet d'obtenir la composition chimique en polysaccharides mais également la teneur en composés insolubles nommés « lignine Klason » dans la littérature. Pour la caractérisation d'un substrat natif, cette fraction est considérée comme de la lignine insoluble. A l'inverse, pour des substrats prétraités par cuisson acide ou par explosion à la vapeur, il a été montré que cette fraction augmentait avec la sévérité de prétraitement (*Donohoe et al. (2008)* ; *Sievers et al. (2009)* ; *Sannigrahi et al. (2011)*). Cette fraction doit donc intégrer la lignine insoluble initialement présente mais aussi d'autres composés qui se sont formés durant le prétraitement.

Comme le montre la Figure V.18, la teneur en fraction insoluble a été déterminée sur les 4 pâtes à papier prétraitées ainsi que sur la paille de blé prétraitée aux mêmes facteurs de sévérité. Pour la pâte à papier, la teneur en composés insolubles passe ainsi de 0 à 50.2%pds pour le substrat natif ($F_0 = -6.52$) et le substrat prétraité le plus sévèrement ($F_0 = 2.67$). Cette augmentation est due à la formation d'humines qui se forment à fortes sévérités et se déposent, totalement ou partiellement, sur la fraction résiduelle solide. Cependant, cette augmentation drastique semble ne démarrer qu'à partir d'un facteur de sévérité de 1.53. En effet à sévérité plus basse, les teneurs en matières insolubles sont inférieures à 1 %pds.

Pour la paille de blé prétraitée, la fraction insoluble croît elle-aussi de manière exponentielle et passe de 18.8 à 57.3 %pds pour la paille native et la paille prétraitée la plus sévèrement ($F_0 = 2.67$). Comme précisé précédemment, la teneur de 18.8%pds pour la paille native correspond à la lignine insoluble. En faisant l'hypothèse que la quantité de lignine insoluble reste identique avec l'augmentation de la sévérité malgré un réarrangement de la lignine au sein de la matrice lignocellulosique (*Selig et al. (2007)*), il est possible de déterminer la quantité d'humines en soustrayant cette teneur initiale aux teneurs en insolubles obtenues pour les 4 jeux de conditions opératoires. La teneur en humines dans la paille de blé passe alors de 11.7 à 38.5 %pds pour un facteur de sévérité de 1.53 et 2.69 respectivement.

Comme la pâte à papier apparaît plus sensible à la catalyse acide que la paille de blé, on peut suspecter que la formation des humines va être plus ou moins importante en fonction de la nature du substrat, notamment en présence ou non de lignine.

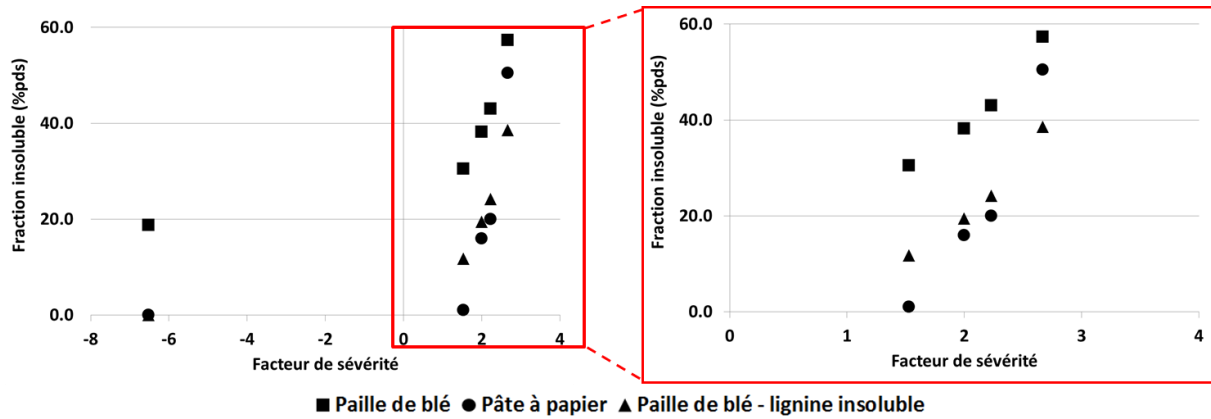


Figure V.18 : Fraction insoluble des substrats prétraités en fonction du facteur de sévérité

En s’intéressant aux bilans massiques des pâtes à papier prétraités (Tableau V.11), il apparaît que la quantité de substrat lavé séché récupérée après prétraitement diminue drastiquement avec l’augmentation de la sévérité de prétraitement. A l’inverse la quantité en composés solubles, déterminée à l’aide des analyses explicitées dans le chapitre II, augmente de 7.97 à 16.41 g pour un facteur de sévérité de 1.53 et 2.23 respectivement, puis diminue pour un facteur de sévérité de 2.67. Ces résultats sont cohérents avec les résultats présentés dans le paragraphe V.2.B.2. En effet pour un F_0 de 2.67, la quantité en glucose monomérique et en furfural diminue fortement. Dans le même temps, la masse totale (solide + liquide) diminue avec l’augmentation de la sévérité, et la teneur en composés solubles non quantifiés passe de 17.75 à 46.08 %pds. Il est donc nécessaire de faire la différence entre le résidu solide appelé « humines » et les composés non quantifiés présents dans le jus de cuisson. Ces composés non identifiés sont sûrement des intermédiaires réactionnels qui sont soit des intermédiaires de la formation des humines solides, soit des humines elles-mêmes mais encore solubles ou agglomérées sous la forme de particules de petite taille.

Tableau V.11 : Bilans massiques des pâtes à papier prétraitées

| Facteur de sévérité | | - | 1.53 | 2.00 | 2.23 | 2.67 |
|--|--|------|------|------|------|------|
| Bilan cuisson | Masse totale de substrat lavé séché récupéré après prétraitement | g | 24.9 | 18.0 | 15.3 | 8.8 |
| | Masse de composés déterminés dans le jus de cuisson | g | 7.9 | 14.4 | 16.4 | 12.7 |
| | Masse totale | g | 32.9 | 32.4 | 31.7 | 21.6 |
| Proportion humines solubles et précipitées sur le substrat | Teneur en résidu solide dans le substrat lavé séché | %pds | 0.1 | 15.9 | 20.0 | 50.5 |
| | Quantité d'humines dans le substrat lavé séché | g | 0.0 | 2.9 | 3.1 | 4.5 |
| | Teneur en composé soluble non quantifié | %pds | 17.8 | 19.0 | 20.7 | 46.1 |
| | Quantité d'humines dans le jus de cuisson | g | 7.1 | 7.6 | 8.3 | 18.4 |

V.3.B.4. Réactivité des substrats prétraités à l’hydrolyse enzymatique

Le protocole d’hydrolyse standard, décrit dans le paragraphe II.4.B de ce manuscrit, a permis d’obtenir les rendements en glucose à 72 h pour les hydrolyses enzymatiques effectuées sur les 4 pâtes à papier prétraitées (Figure V.19). Les résultats montrent que le rendement en glucose après 72h augmente dans un premier temps et passe de 68.7 à 90.7 % pour la pâte à papier native et un facteur de sévérité de 1.53 respectivement. Pour un facteur de sévérité de 2.67, le rendement chute fortement pour atteindre seulement 20.9 %.

Si les réactivités de la pâte à papier sont comparées avec celles de la paille de blé obtenues dans le Chapitre III, il apparaît évident que la pâte à papier est beaucoup plus réactive à l'hydrolyse enzymatique que la paille de blé. En effet, le rendement enzymatique à 72 h est de 68.7 % pour la pâte à papier native, comparativement au 15.1 % pour la paille de blé native. Cette différence de réactivité est toujours bien visible pour les cuissons aux facteurs de sévérité de 1.53, 2.00 et 2.23. A l'inverse, pour une sévérité de 2.67, les rendements en glucose sont similaires et d'environ 20 %. Cette observation qui peut paraître surprenante est sûrement due à la composition chimique du substrat prétraité. En effet, même si les hydrolyses enzymatiques sont réalisées à iso-concentration en cellulose, la proportion d'humines dans le mélange réactionnel est plus importante pour la pâte à papier que pour la paille de blé (50.5 et 38.5 %pds respectivement) ce qui laisse supposer qu'à partir d'une certaine proportion d'humines, ces dernières sont extrêmement préjudiciables à l'hydrolyse enzymatique.

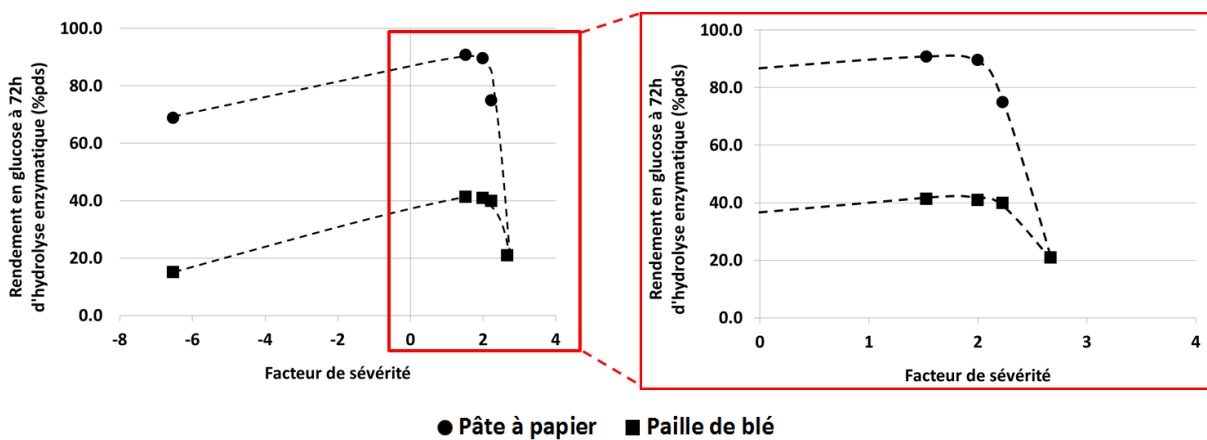


Figure V.19 : Réactivité des substrats à 72h d'hydrolyse enzymatique en fonction du facteur de sévérité

V.3.C.Caractéristiques physico-chimiques

Afin d'effectuer des analyses complémentaires, les différents lots de pâte à papier prétraitée et la pâte à papier native ont été lyophilisés de la même manière que la paille de blé (cf. III.5.C). Dans un premier temps, les échantillons ont été analysés en microscopie électronique à balayage (MEB), en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), en physisorption d'azote et, pour finir, par analyse thermogravimétrie (ATG).

V.3.C.1.Modification morphologique de la pâte à papier prétraitée

Les 4 substrats prétraités ainsi que le substrat natif sont visualisables sur la Figure V.20. Comme dans l'étude sur la paille de blé, un assombrissement du substrat est observé avec l'augmentation de la sévérité de prétraitement, sûrement dû à la production de composés de dégradation qui se condensent et/ou polymérisent sur le substrat (Stevenson (1994)). Cette hypothèse peut être corrélée avec l'augmentation drastique de la teneur en humines (fraction insoluble) lorsque la sévérité du prétraitement augmente.

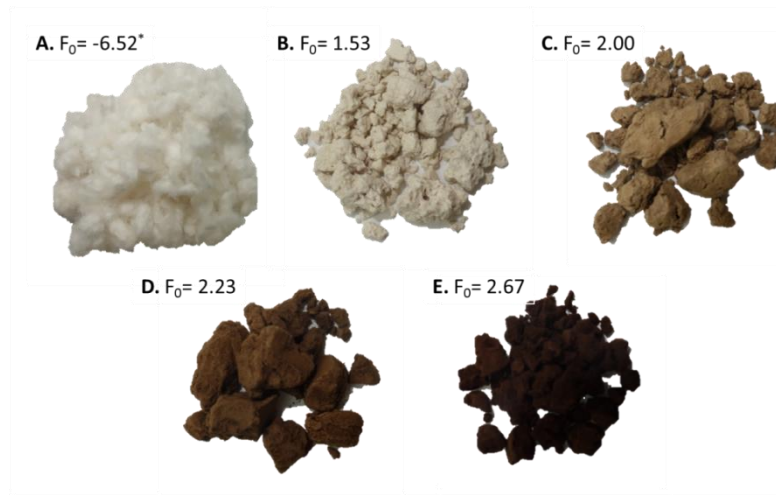


Figure V.20 : Les différents échantillons produits par cuisson acide de la pâte à papier blanchie

L'analyse par microscopie MEB avec un grossissement de 2500 permet d'observer la déstructuration fibrillaire induite par le prétraitement de cuisson acide mais également la modification surfacique du substrat (Figure V.21). En effet, pour la pâte à papier native, la surface est lisse et les fibres de celluloses sont bien visibles. Par la suite, les fibres diminuent et un aspect rugueux commence à apparaître avec l'augmentation de la sévérité. Ainsi, pour un facteur de sévérité de 2.0 (Figure V.21/C), des petites sphères (≈ 10 nm) apparaissent à la surface du substrat. Avec l'augmentation de la sévérité (Figure V.21/D), ces microsphères commencent à recouvrir complètement la surface des fibres. Enfin, pour la plus forte sévérité testée (Figure V.21/E), les fibres ne sont plus visibles et seules les sphères restent apparentes. Ces sphères, d'environ 10 nm, peuvent être attribuées aux humines (ou pseudo-lignine) qui se forment à forte sévérité, se condensent, au moins en partie, sur le substrat et inhibent la réactivité à l'hydrolyse enzymatique (*Girisuta et al. (2006), (2007) ; Patil and Lund (2011) ; van Zandvoort et al. (2013).*

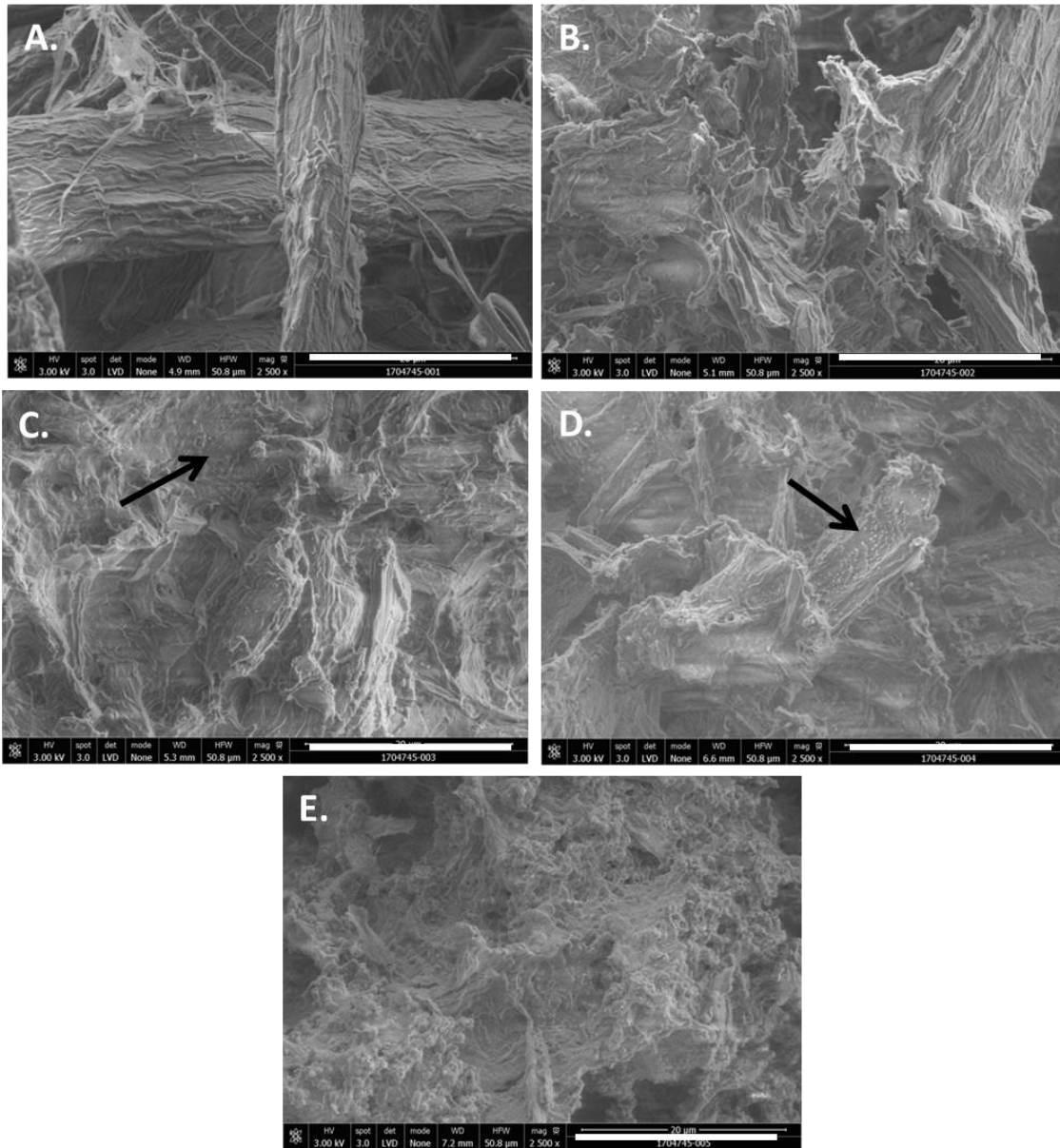


Figure V.21 : Images MEB de la pâte à papier brute et prétraitées aux 4 jeux de conditions opératoires (A/ $F_0 = -6.52$; B/ $F_0 = 1.53$; C/ $F_0 = 2.00$; D/ $F_0 = 2.23$; E/ $F_0 = 2.67$) (barre d'échelle de 20 μm)

V.3.C.2. Modification chimique

Pour mieux comprendre la chimie des humines, une analyse infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en mode Réflectance Totale Atténuée (ATR) a été réalisée et les résultats sont présentés sur la Figure V.22. La comparaison des différents spectres indique tout d'abord, la disparition de la bande à 1250 cm^{-1} qui est présente uniquement dans le substrat natif, cette bande pouvant être attribuée à des liaisons C-C ou C-O. Au vu de la caractérisation chimique présentée précédemment (cf. V.2.B.1), cette bande est spécifique des hémicelluloses qui se dégradent prioritairement durant le prétraitement de cuisson acide. Ensuite, 3 nouvelles bandes à 1510 , 1600 et 1700 cm^{-1} apparaissent. Ces bandes peuvent quant à elles être attribuées à des fonctions chimiques qui correspondent respectivement aux liaisons C=C aromatique, C=O ou C-C conjugué et C=O (acide carboxylique saturé). Il apparaît donc clairement que les humines sont en partie composées de

molécules aromatiques et aliphatiques. Enfin, une bande moins spécifique à 1100 cm^{-1} apparaît aussi avec l'augmentation de la sévérité de prétraitement, cette bande pouvant être attribuée à des groupements C-C. Cependant cette fonction chimique est également présente dans le substrat natif et même si l'étirement de la bande suppose une augmentation de la proportion de cette fonction au sein du substrat, aucune quantification n'est possible.

En comparaison avec les spectres IR de la paille de blé (Figure II.9/B), il apparaît que les trois bandes les plus caractéristiques de l'apparition des humines (1510 , 1600 et 1700 cm^{-1}) sont également présentes dans la paille native. La principale différence entre ces 2 familles de substrats étant la présence ou non de lignine, il est intéressant de voir que les fonctions chimiques qui sont présentes dans la lignine et les humines sont similaires. Cependant, les proportions de chaque groupement ne peuvent pas être déterminées car cette technique d'analyse n'est pas quantitative.

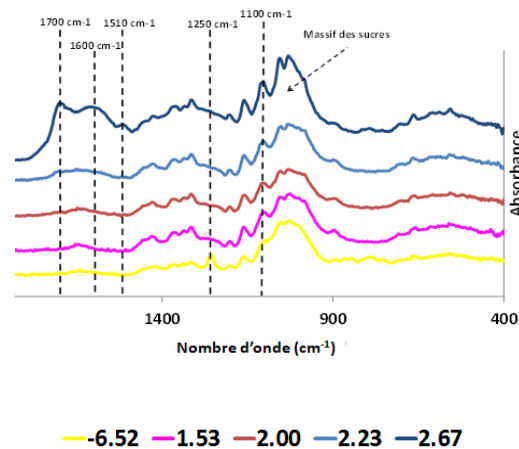


Figure V.22 : Spectres infrarouges du substrat natif et des substrats prétraités aux 4 jeux de conditions opératoires

V.3.C.3. Modification de la porosité de la pâte à papier prétraitée

En ce qui concerne la surface spécifique, elle augmente fortement avec l'augmentation du facteur de sévérité et atteint $12.7\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ pour une sévérité de 2.67 (Figure V.23/A). Pour un facteur de sévérité supérieur à 1.53, cette augmentation de la surface spécifique peut être attribuée à l'hydrolyse des hémicelluloses, puis à l'hydrolyse de la cellulose. Cependant, à partir d'un facteur de sévérité de 2.00, la présence d'humines est sûrement la cause principale de l'augmentation de la surface, du fait de leur dépôt à la surface des substrats prétraités. En effet, comme vu précédemment sur les images MEB, la rugosité de surface est d'autant plus importante que la sévérité de prétraitement est élevée. Ensuite, si l'on s'intéresse à la relation entre la surface spécifique et la teneur en résidu solide des substrats prétraités (Figure V.23/B), il apparaît que l'augmentation de la surface spécifique pour ces sévérités testées est bien en relation avec l'augmentation de la teneur en résidu solide, donc en humines. Enfin la comparaison des deux substrats montre que la paille de blé prétraitée contient en relatif moins de résidu solide mais que sa surface spécifique est plus importante avec l'augmentation de la sévérité de prétraitement. Cette surface spécifique plus importante peut être attribuée à l'hydrolyse des hémicelluloses.

Enfin en ce qui concerne la distribution volumique poreuse (Figure V.23/C), il apparaît que les observations sont similaires à celles de la paille de blé. En effet, avec l'augmentation du facteur de

sévérité, le volume mésoporeux (2 à 50 nm) augmente mais le diamètre poreux moyen reste inchangé (environ 10 nm).

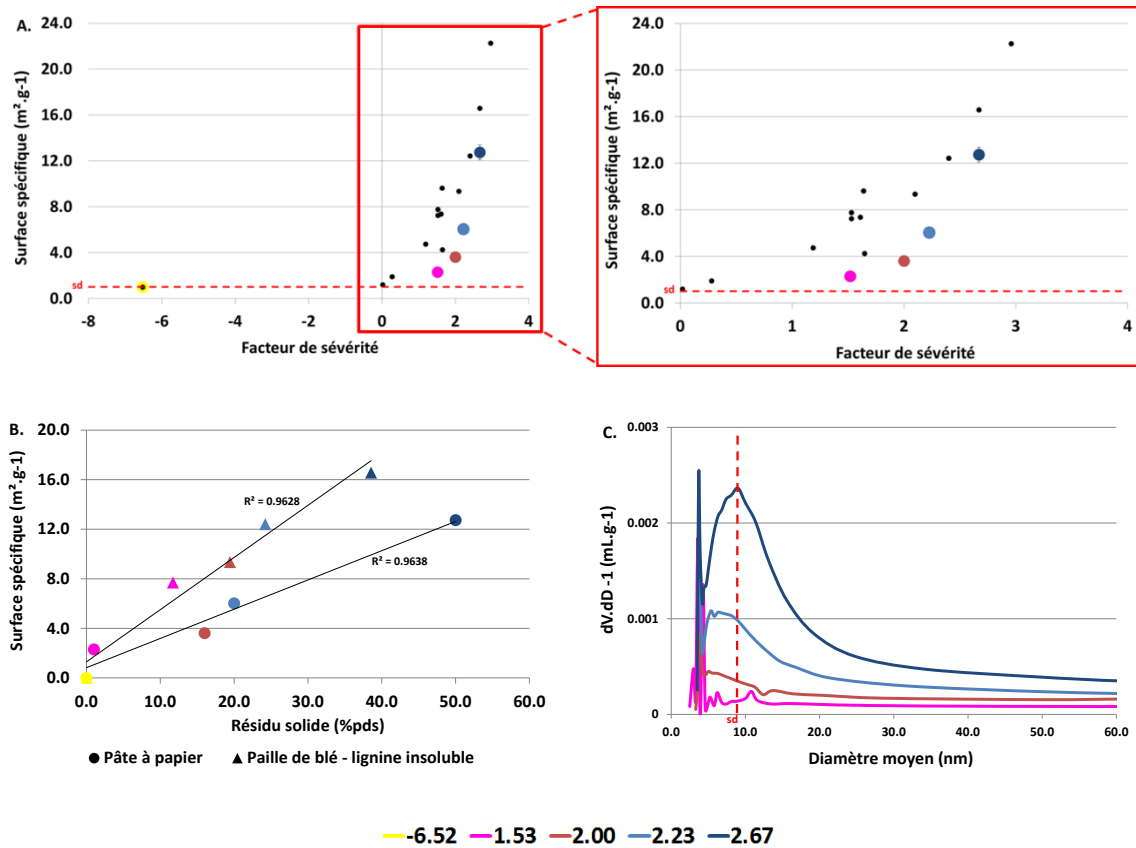


Figure V.23 : Surface spécifique de la pâte à papier en fonction du facteur de sévérité (A), évolution de la surface spécifique en fonction de la teneur en résidu solide (B) et distribution du volume poreux des échantillons (C)

V.3.C.4. Profils de dégradation thermique des substrats

Dans le cas de la pâte à papier native, la perte de masse indique la présence de deux pics bien distincts à 328 et 451°C (Figure V.24). D'après Kaloustian *et al.* (1996), le premier représente la libération des produits volatils issus de la décomposition de la cellulose (gaz, alcools, aldéhydes, cétones et acides) avec une formation en simultanée de charbon, ce dernier subissant par la suite une combustion réductrice entraînant l'apparition du second pic. Avec l'application d'un prétraitement de plus en plus sévères, il est intéressant de voir que les deux pics se décalent petit à petit vers des températures plus faibles, mais également que, pour une sévérité de 2.67, une seule perte de masse est visible et s'étale sur une plage de température plus importante. Un épaulement à 360°C est cependant observable et pourrait être dû aux humines.

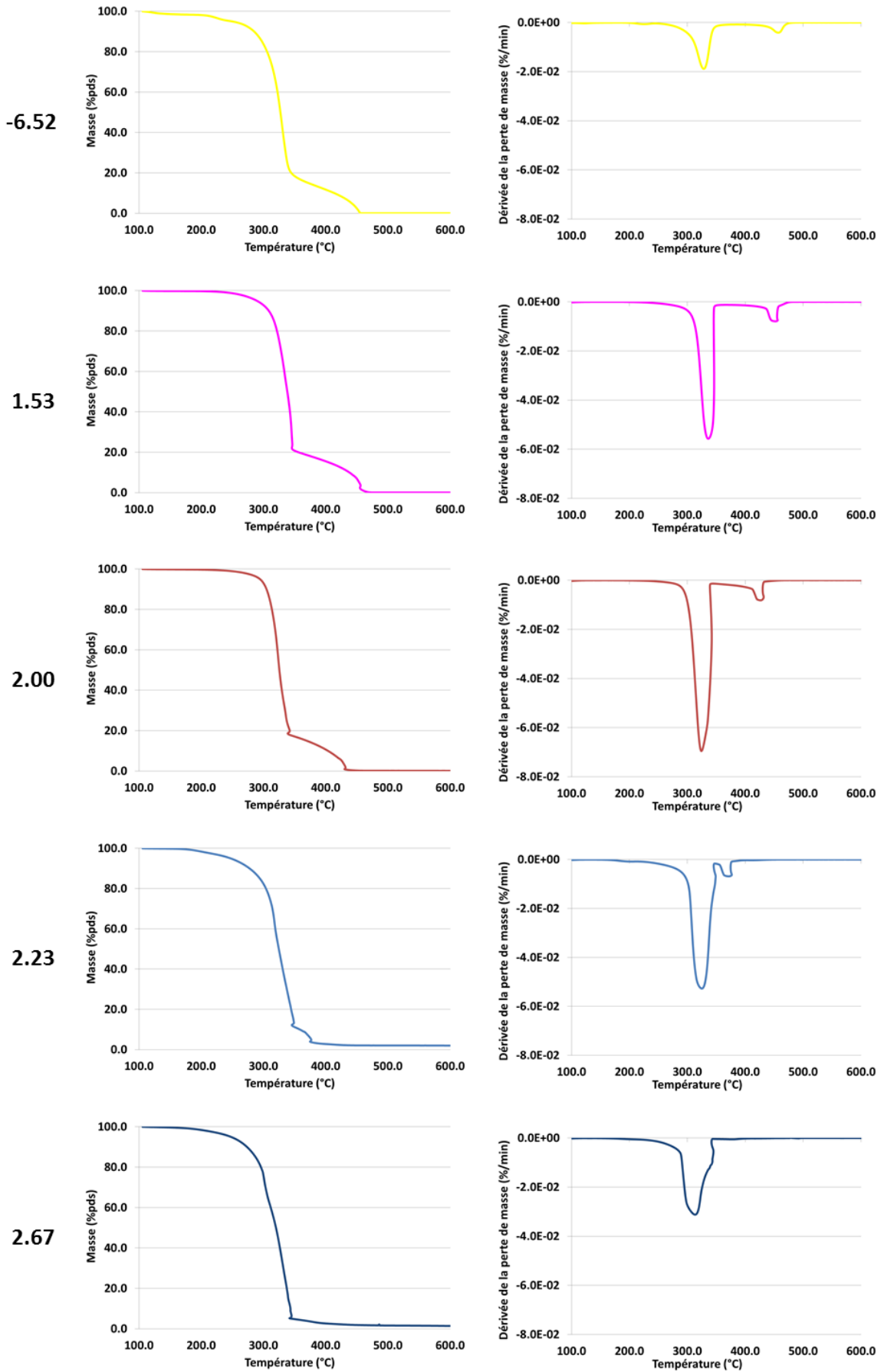


Figure V.24 : Spectres ATG (gauche) et dérivés (droite) des substrats natif et prétraités

V.4.Conclusion

L'étude sur les humines a fait l'objet de 2 études distinctes, l'une s'intéressant à la cuisson acide de différents substrats modèles, l'autre à la cuisson acide d'une pâte à papier.

Dans le cas des substrats modèles, il est apparu que le xylane ayant subi une cuisson acide sévère produit peu d'humines sous formes solides supérieures à 11 μm lorsqu'il est prétraité seul, à l'inverse de la cellulose. La morphologie des humines formés à partir de ces 2 polysaccharides est également différente. Lorsque les substrats modèles sont mélangés deux à deux, il semble que la lignine favorise la présence d'humines dans la fraction solide, probablement en captant sur sa surface les humines présentes dans la phase liquide. Les analyses physico-chimiques réalisées sur l'ensemble des substrats prétraités ont montré que les humines insolubles étaient constituées de composés aromatiques et aliphatiques et permettaient une augmentation drastique de la surface spécifique du substrat ainsi que du volume mésoporeux (2 à 50 nm).

L'étude sur la pâte à papier (substrat délignifié) a confirmé que la formation des humines était possible en absence de lignine et que ces composés insolubles induisaient une diminution drastique de la réactivité du substrat à l'hydrolyse enzymatique. De plus, il a été vu que la méthodologie expérimentale appliquée afin de quantifier les quantités en sucres sous leurs formes polymériques jusqu'à leurs produits de dégradation, ne permettait pas de faire boucler les bilans et cela même en prenant en compte la quantité de résidu solide. Ce point confirme donc qu'une partie des humines formées restent dans la phase liquide.

V.5.Références

- Donohoe *et al.* (2008) Donohoe B. S., Decker S. R., Tucker M. P., Himmel M. E. and Vinzant T. B. (2008) **Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment.** *Biotechnology and bioengineering* **101**: 913–925.
- Girisuta *et al.* (2006) Girisuta B., Janssen, L. P. B. M. and Heeres H. J. (2006) **A kinetic study on the decomposition of 5-hydroxymethylfurfural into levulinic acid.** *Green Chemistry* **8**: 701.
- Girisuta *et al.* (2007) Girisuta B., Janssen, L. P. B. M. and Heeres H. J. (2007) **Kinetic Study on the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Cellulose to Levulinic Acid.** *Industrial & Engineering Chemistry Research* **46**: 1696–1708.
- Guo *et al.* (2008) Guo G. L., Chen W. H., Chen W. H., Men L. C. and Hwang W.S. (2008) **Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production.** *Bioresource Technology* **99**: 6046–6053.
- Hu *et al.* (2012b) Hu F., Jung S. and Ragauskas A. (2012) **Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis.** *Bioresource Technology* **117**: 7–12.
- Kaloustian *et al.* (1996) Kaloustian J., Pauli A. M. and Pastor J. (1996) **Caracterisation par analyse thermique de la lignine, de la cellulose et de quelques uns de ses derives etherifies.** *Journal of Thermal Analysis* **46** : 91–104.
- Kristiani *et al.* (2013) Kristiani A., Abimanyu H., Setiawan A. H., Sudiarmanto and Aulia F. (2013) **Effect of Pretreatment Process by Using Diluted Acid to Characteristic of oil Palm's Frond.** *Energy Procedia* **32**: 183–189.
- Meng and Ragauskas (2017) Meng X. and Ragauskas A. (2017) **Pseudo-Lignin Formation during Dilute acid Pretreatment for Cellulosic Ethanol.** *Recent Advances in Petrochemical Science* **1**, 1-5.
- Patil and Lund (2011) Patil S. K. R. and Lund C. R. F. (2011) **Formation and Growth of Humins via Aldol Addition and Condensation during Acid-Catalyzed Conversion of 5-Hydroxymethylfurfural.** *Energy & Fuels* **25**: 4745–4755.
- Sannigrahi *et al.* (2011) Sannigrahi P., Kim D. H., Jung S. and Ragauskas A. (2011) **Pseudo-lignin and pretreatment chemistry.** *Energy Environ. Sci.* **4**: 1306–1310.

- Selig et al. (2007)* Selig M. J., Viamajala S., Decker S. R. et al. (2007) **Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Biotechnology progress* **23**: 1333–1339.
- Sievers et al. (2009)* Sievers C., Musin I., Marzioletti T. et al. (2009) **Acid-Catalyzed Conversion of Sugars and Furfurals in an Ionic-Liquid Phase.** *ChemSusChem* **2**: 665–671.
- Stevenson (1994)* Stevenson F. J. (1994) **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions.** 2nd edn. Wiley, New York.
- Sun and Li (2004)* Sun X. and Li Y. (2004) **Colloidal carbon spheres and their core/shell structures with noble-metal nanoparticles.** *Angewandte Chemie* **43**: 597–601.
- Titirici et al. (2008)* Titirici M. M., Antonietti M. and Baccile N. (2008) **Hydrothermal carbon from biomass: A comparison of the local structure from poly- to monosaccharides and pentoses/hexoses.** *Green Chemistry* **10**: 1204.
- van Zandvoort et al. (2013)* van Zandvoort I., Wang Y., Rasrendra C. B. et al. (2013) **Formation, molecular structure, and morphology of humins in biomass conversion: influence of feedstock and processing conditions.** *ChemSusChem* **6**: 1745–1758.
- Yamamoto et al. (1990)* Yamamoto K., Asada T., Nishide H. and Tsuchida E. (1990) **The Preparation of Poly(dihydroxyphenylene) through the Electro-Oxidative Polymerization of Hydroquinone.** *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **63**: 1211–1216.
- Yao et al. (2007)* Yao C., Shin Y., Wang L. Q. et al. (2007) **Hydrothermal Dehydration of Aqueous Fructose Solutions in a Closed System.** *The Journal of Physical Chemistry* **111**: 15141–15145.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire avait pour objectif d'étudier l'impact d'un prétraitement par explosion à la vapeur sur les caractéristiques d'une biomasse lignocellulosique, que cela soit en termes de composition, de morphologie ou de réactivité à l'hydrolyse enzymatique. Le prétraitement par explosion vapeur pouvant schématiquement être découpé en deux phases (cuisson et détente), il a été choisi une approche expérimentale en deux temps afin de découpler expérimentalement ces dernières et donc de discriminer au mieux les phénomènes chimiques (réactions de dépolymérisation) des phénomènes physiques (détente explosive). Pour des raisons de cohérence et de disponibilité, ce travail a été réalisé sur la même paille de blé qui a ensuite servi de substrat de référence pour l'ensemble de la thèse.

Pour initier cette approche, une première campagne expérimentale a été opérée à IFPEN (Chapitre III), dans le but d'étudier l'étape de cuisson acide qui a lieu au sein d'un réacteur d'explosion à la vapeur, en s'affranchissant de l'étape de détente explosive. Cette campagne a été réalisée, au sein des laboratoires d'IFPEN sur le site de Lyon, en utilisant un réacteur autoclave batch de 0.9 L pour effectuer les cuissons acides de paille de blé. Le plan expérimental appliqué a permis l'obtention d'une importante base d'échantillons (29 substrats prétraités) possédant des caractéristiques physico-chimiques variées, grâce à l'utilisation d'un large domaine de conditions opératoires (température de 100 à 180°C, temps de séjours de 0 à 120 min, teneur en acide de 0 à 1 %pds d'H₂SO₄). Cette campagne a aussi permis de mettre au point un protocole poussé de post-traitement afin de calculer un bilan matière complet et déterminer les rendements de transformation des polysaccharides en sucres sous leurs différentes formes (polymérique, oligomérique, monomérique, dégradée). Une approche analytique multi-techniques et multi-échelles a finalement été opérée sur certains des substrats prétraités obtenus en s'appuyant sur les travaux de la thèse de J. Passicouset. Cette approche a ainsi permis d'éliminer certains descripteurs couramment mis en avant dans la littérature, mais qui décrivent finalement uniquement l'impact du prétraitement de cuisson acide sans faire de lien avec la réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats obtenus. C'est le cas, par exemple, de la taille des particules, du diamètre poreux, ou encore de l'indice de cristallinité. A contrario, d'autres descripteurs tels que la composition chimique ou la surface spécifique semblent mieux décrire l'impact de la cuisson acide sur la qualité des substrats prétraités, tout en étant directement en lien avec la réactivité à l'hydrolyse enzymatique.

Une fois les protocoles expérimentaux stabilisés et la campagne de cuisson réalisée, le travail de thèse s'est focalisé sur l'impact spécifique de la détente explosive (cf. chapitre IV). L'idée sous-jacente a consisté à préparer, en amont, des substrats précuits et à les introduire dans un outil batch d'explosion vapeur pour leur faire subir une détente explosive tout en limitant au maximum les risques de redémarrage des réactions d'hydrolyse. C'est ainsi que plusieurs lots de paille de blé ont été précuits dans un réacteur autoclave de 8 L, puis lavés et essorés avant d'être introduits dans un outil d'explosion vapeur batch de 50L pour subir différents niveaux de détente explosive. Ces expérimentations ont été réalisées à l'Université de Liège-Gembloux et ont généré 28 échantillons avec de fortes variations du niveau de détente (de 0 à 22 bar). L'analyse de ces échantillons, identique à celle opérée dans l'étude de cuisson acide, a permis de mieux appréhender et comprendre l'impact spécifique de la détente explosive sur la réactivité des substrats à l'hydrolyse enzymatique. Cependant, malgré le protocole utilisé, le découplage des deux phénomènes n'a pas toujours été optimal et un doute subsiste quant au redémarrage des réactions d'hydrolyse pour les substrats précuits contenant encore une teneur non négligeable d'hémicelluloses avant l'opération de détente. En effet, dans ces cas

particuliers, l'application d'une détente explosive, même avec toutes les précautions prises, a entraîné une variation de la composition chimique des substrats par hydrolyse acide des polysaccharides et une amélioration de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique a été observée avec l'augmentation de la pression avant détente. Dans ces conditions, le découplage des phénomènes de cuisson acide et de détente n'a donc pas été possible et aucune conclusion claire n'a pu être dégagée quant à l'action spécifique de la détente explosive sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique. A l'inverse, il a été vu que, pour de la paille de blé précuite contenant une teneur résiduelle en hémicelluloses, la détente explosive n'entraînait pas d'amélioration de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique, et cela, malgré une légère augmentation de la surface spécifique. Ce point semble donc valider l'hypothèse que la détente explosive, en tant que telle, n'a pas de réel effet sur les caractéristiques et la réactivité des substrats lorsque ces derniers ont été suffisamment dégradés par l'étape de cuisson. Par contre, aucune conclusion ne peut être donnée dans le cas de substrats ayant subi une pré-cuisson partielle car il n'a pas été possible de discriminer expérimentalement les deux phénomènes de cuisson et de détente.

Une troisième et dernière étude a été réalisée en fin de thèse afin d'étudier la formation des humines (cf. chapitre V), qui sont des composés mal connus se formant durant la cuisson acide lorsque les conditions opératoires appliquées conduisent à de fortes sévérités de prétraitement. Ces humines joueraient un rôle très important dans l'évolution de la réactivité à l'hydrolyse enzymatique car il a été observé durant la campagne de cuisson acide que leur formation était concomitante avec une très forte perte de réactivité. Peu de travaux de la littérature ont étudié les réactions de formation des humines, et souvent en utilisant les sucres simples comme réactifs de départ. L'objectif de cette dernière étude a donc consisté à compléter ces approches, notamment en observant l'influence des composés majoritaires de la biomasse (cellulose, hémicelluloses, lignine) dans le processus de formation des humines. Une partie complémentaire a aussi été réalisée en comparant le comportement de la paille de blé à celui d'un substrat délignifié (pâte à papier blanche) après avoir subi une cuisson sévère. C'est ainsi que de la cellulose Avicel, du xylane d'épis de maïs Roth et de la lignine Protobind ont été prétraités dans des conditions opératoires drastiques de cuisson (180°C, 60 min, 1%pds d'H₂SO₄), d'abord séparément, puis deux par deux et finalement tous ensemble afin d'étudier leur impact respectif et les effets synergiques potentiels. Les résultats ont montré que la lignine en tant que telle n'était pas source de formation des humines et que ces dernières ne se formaient qu'en présence de cellulose ou d'hémicelluloses. Par contre, la lignine et la cellulose (fraction non convertie) joueraient un rôle très important en captant sur leur surface une partie des humines formées (sphères observées en microscopie MEB). Le masquage des surfaces cellulosiques par les humines seraient alors à l'origine des pertes de réactivité.

Perspectives

En prolongement de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Tout d'abord, l'ensemble des expérimentations a été réalisé uniquement sur de la paille de blé et en utilisant des outils batch pour étudier la cuisson acide et la détente explosive. Il serait donc intéressant de compléter ces données expérimentales en étudiant d'autres familles de biomasse, comme le bois de feuillus ou de résineux. En effet, ces substrats ne possèdent pas les mêmes proportions en composés majoritaires (cellulose, hémicelluloses, lignine) et la nature de ces derniers peut être différente. De plus, il serait pertinent de s'assurer de la validité des résultats obtenus dans ce travail sur les outils d'explosion à la vapeur fonctionnant en continu, notamment en réalisant des prélèvements au sein-même de ces derniers à l'aide d'une chambre de prélèvement pouvant être isolée et dépressurisée lentement selon le besoin.

Ensuite, certaines des techniques analytiques utilisées dans cette thèse ont montré un fort potentiel qu'il conviendrait de continuer à développer dans le futur. Par exemple, il a été montré durant la thèse l'intérêt de la microscopie à balayage laser couplée à l'utilisation de marqueurs fluorophores afin d'évaluer qualitativement les surfaces cellulosiques et les surfaces ligneuses. Cependant, ce travail devrait être poursuivi pour que cette dernière puisse permettre l'obtention d'une mesure qui soit quantitative et représentative. De plus, pour le moment, la technique analytique actuelle a été développée sur des substrats modèles contenant uniquement de la cellulose et/ou de la lignine. Or, la présence d'hémicelluloses pourrait interférer dans la mise en place des mesures sur des substrats plus réalistes. Ce point devrait faire l'objet d'une étude particulière.

Finalement des études plus poussées sur les humines pourraient être envisagées afin de mieux comprendre leur influence sur la réactivité à l'hydrolyse enzymatique des substrats prétraités, voire sur leur structure chimique. En ce qui concerne l'influence des humines sur la réactivité, un doute persiste quant à savoir si les enzymes s'adsorbent de manière non productive sur les humines et/ou si leurs dépôts masquent tout ou partie de la cellulose. Un dosage enzymatique au cours du temps permettrait peut-être de discriminer l'une ou/et l'autre de ces hypothèses. En ce qui concerne l'influence sur la structure chimique, il paraît important de différencier la fraction précipitée sur le substrat de la fraction présente dans le jus de cuisson et non quantifiée par les techniques analytiques utilisées dans cette thèse. Pour les fractions solide et liquide, l'analyse de RMN 2D ou l'analyse de la chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS) pourraient respectivement être envisagées afin de connaître la composition chimique des substrats prétraités. En effet, pour la première technique analytique, les quantités de résidu solide sont connues mais l'analyse FTIR, utilisée dans ce travail, n'apparaît pas suffisante pour connaître la chimie de ces composés. Ensuite la seconde analyse pourrait permettre de connaître la formule chimique des composés présents dans le jus de cuisson ainsi que leur pourcentage massique.

ANNEXES

Résumé

Ces annexes fournissent l'ensemble des valeurs expérimentales obtenues durant ces travaux de thèse et traduites sous forme de graphiques dans les différentes parties de ce manuscrit. L'annexe A fournit les résultats relatifs aux cuissons acides, en particulier les bilans massiques entrée – sortie en exprimés en masse totale et en masse sèche, les bilans par sucre, les rendements de cuisson en termes de glucose et xylose sous leurs formes polymérique, oligomérique, monomérique et dégradée ainsi que les rendements en glucose obtenus après 72h d'hydrolyse enzymatique standard des substrats précuits (cf. III.3 et III.4.A). L'annexe B complète, quant-à-elle, les informations de l'annexe A en apportant les données expérimentales relatives aux caractérisations physico-chimiques spécifiques réalisées sur certains substrats prétraités en cuisson acide pour comprendre l'impact du prétraitement sur les propriétés physicochimiques du substrat et donc sur leur réactivité (cf. III.4.B et III.5). Enfin, l'annexe C donne les données expérimentales de l'étude expérimentale sur la détente explosive présentées dans le chapitre IV, notamment via un résumé des teneurs en cellulose et xylane, des surfaces spécifiques et des rendements à 72h en hydrolyse enzymatique standard pour les différents substrats obtenus.

Annexe A : Tableaux récapitulatifs des cuissons acides réalisées sur la paille de blé 2 mm

Tableau A.1 : Cuisson acide de la paille de blé à 0 min de temps de séjour et avec une liqueur d'imprégnation à 1.00 %pds d' H_2SO_4

| Température | | °C | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
|--------------------------------|---|------|-----|-----|-------|-----|-----|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | - | - | 0.28 | - | - |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | - | - | 98.5 | - | - |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | - | - | 97.8 | - | - |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | - | - | 97.1 | - | - |
| | Xylose | %pds | - | - | 96.5 | - | - |
| | Galactose | %pds | - | - | 90.8 | - | - |
| | Arabinose | %pds | - | - | 99.3 | - | - |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | - | - | 90.2 | - | - |
| | Glucose oligomérique | % | - | - | 4.1 | - | - |
| | Glucose monomérique | % | - | - | 2.6 | - | - |
| | 5-HMF | % | - | - | 0.2 | - | - |
| | Humines | % | - | - | 2.9 | - | - |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | - | - |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | - | - | 47.7 | - | - |
| | Xylose oligomérique | % | - | - | 32.9 | - | - |
| | Xylose monomérique | % | - | - | 16.5 | - | - |
| | Furfural | % | - | - | 0.1 | - | - |
| | Humines | % | - | - | 3.5 | - | - |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | - | - |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | - | - | 26.3 | - | - |

Tableau A.2 : Cuisson acide de la paille de blé à 10 min de temps de séjour et avec une liqueur d'imprégnation à 1.00 %pds d' H_2SO_4

| Température | | °C | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
|----------------------------|------------------------------------|------|-----|-----|-------|-------|-------|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | - | - | 0.94 | 1.48 | 2.00 |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | - | - | 99.0 | 99.5 | 99.2 |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | - | - | 98.9 | 100.5 | 95.0 |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | - | - | 97.1 | 99.6 | 93.1 |
| | Xylose | %pds | - | - | 98.8 | 94.2 | 74.7 |
| | Galactose | %pds | - | - | 91.1 | 86.3 | 85.2 |
| | Arabinose | %pds | - | - | 90.9 | 105.1 | 89.2 |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | - | - | 89.0 | 88.2 | 70.5 |
| | Glucose oligomérique | % | - | - | 2.3 | 0.0 | 0.3 |
| | Glucose monomérique | % | - | - | 5.3 | 10.0 | 21.0 |
| | 5-HMF | % | - | - | 0.8 | 1.8 | 1.6 |
| | Humines | % | - | - | 2.6 | 0.0 | 6.5 |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | - | - | 23.6 | 7.8 | 4.5 |
| | Xylose oligomérique | % | - | - | 14.4 | 0.0 | 0.0 |
| | Xylose monomérique | % | - | - | 56.5 | 80.6 | 48.5 |
| | Furfural | % | - | - | 5.0 | 6.2 | 23.8 |
| | Humines | % | - | - | 0.5 | 5.4 | 23.1 |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | - | - | 39.4 | 62.3 | 40.8 |

Tableau A.3 : Cuisson acide de la paille de blé à 20 min de temps de séjour et avec une liqueur d'imprégnation à 1.00%pds d' H_2SO_4

| Température | | °C | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
|-------------------------|------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | 0.02 | 0.53 | 1.19 | 1.64 | 2.23 |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | 99.6 | 98.4 | 98.6 | 98.7 | 99.3 |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | 104.1 | 94.9 | 100.9 | 95.8 | 86.7 |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | 103.1 | 97.7 | 96.0 | 91.9 | 86.6 |
| | Xylose | %pds | 103.9 | 93.7 | 92.9 | 84.9 | 59.6 |
| | Galactose | %pds | 98.2 | 87.1 | 94.5 | 87.36 | 73.9 |
| | Arabinose | %pds | 90.5 | 98.9 | 98.1 | 113.4 | 83.0 |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | 97.5 | 90.8 | 87.3 | 79.2 | 59.2 |
| | Glucose oligomérique | % | 3.2 | 3.0 | 1.2 | 0.0 | 0.0 |
| | Glucose monomérique | % | 2.3 | 3.6 | 6.7 | 11.7 | 25.8 |
| | 5-HMF | % | 0.1 | 0.4 | 1.2 | 1.4 | 1.8 |
| | Humines | % | 0.0 | 2.2 | 3.6 | 7.6 | 13.1 |
| | Somme | % | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | 90.5 | 39.1 | 18.8 | 2.4 | 1.7 |
| | Xylose oligomérique | % | 13.3 | 18.6 | 7.2 | 0.0 | 0.0 |
| | Xylose monomérique | % | 0.1 | 35.1 | 65.9 | 72.5 | 32.9 |
| | Furfural | % | 0.1 | 1.1 | 1.1 | 11.6 | 31.1 |
| | Humines | % | 0.0 | 6.1 | 7.0 | 13.5 | 34.3 |
| | Somme | % | 104.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | 18.9 | 27.4 | 44.0 | 68.2 | 39.3 |

Tableau A.4 : Cuisson acide de la paille de blé à 30 min de temps de séjour et avec une liqueur d'imprégnation à 1.00%pds d'H₂SO₄

| Température | | °C | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
|----------------------------|------------------------------------|------|-----|-----|-------|-----|-----|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | - | - | 1.30 | - | - |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | - | - | 99.2 | - | - |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | - | - | 100.4 | - | - |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | - | - | 99.3 | - | - |
| | Xylose | %pds | - | - | 95.4 | - | - |
| | Galactose | %pds | - | - | 108.6 | - | - |
| | Arabinose | %pds | - | - | 111.3 | - | - |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | - | - | 90.3 | - | - |
| | Glucose oligomérique | % | - | - | 0.6 | - | - |
| | Glucose monomérique | % | - | - | 7.5 | - | - |
| | 5-HMF | % | - | - | 1.3 | - | - |
| | Humines | % | - | - | 0.3 | - | - |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | - | - |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | - | - | 16.2 | - | - |
| | Xylose oligomérique | % | - | - | 5.4 | - | - |
| | Xylose monomérique | % | - | - | 71.8 | - | - |
| | Furfural | % | - | - | 2.4 | - | - |
| | Humines | % | - | - | 4.3 | - | - |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | - | - |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | - | - | 44.9 | - | - |

Tableau A.5 : Cuisson acide de la paille de blé à 60 min de temps de séjour et avec une liqueur d'imprégnation à 1.00%pds d'H₂SO₄

| Température | | °C | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
|-------------------------|------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | 0.40 | 0.97 | 1.53 | 2.10 | 2.67 |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | 99.2 | 98.3 | 98.9 | 99.2 | 98.5 |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | 99.3 | 103.0 | 95.0 | 87.0 | 87.3 |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | 96.3 | 99.3 | 92.4 | 93.9 | 59.3 |
| | Xylose | %pds | 95.1 | 93.8 | 90.5 | 71.2 | 26.0 |
| | Galactose | %pds | 81.4 | 93.8 | 91.3 | 83.2 | 43.2 |
| | Arabinose | %pds | 82.9 | 104.5 | 105.0 | 100.9 | 37.4 |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | 90.4 | 92.1 | 82.5 | 76.8 | 26.8 |
| | Glucose oligomérique | % | 3.5 | 2.1 | 2.4 | 0.0 | 2.0 |
| | Glucose monomérique | % | 2.3 | 4.8 | 6.5 | 16.4 | 18.1 |
| | 5-HMF | % | 0.1 | 0.4 | 1.1 | 0.9 | 1.9 |
| | Humines | % | 3.7 | 0.6 | 6.1 | 5.9 | 51.1 |
| | Somme | % | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | 65.3 | 29.0 | 11.0 | 1.9 | 4.6 |
| | Xylose oligomérique | % | 26.1 | 2.6 | 5.1 | 0.0 | 2.2 |
| | Xylose monomérique | % | 3.6 | 62.1 | 71.8 | 48.4 | 2.9 |
| | Furfural | % | 0.0 | 0.1 | 2.4 | 25.2 | 22.6 |
| | Humines | % | 4.9 | 6.2 | 4.3 | 24.5 | 67.7 |
| | Somme | % | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | 21.2 | 30.4 | 41.7 | 41.0 | 20.8 |

Tableau A.6 : Cuisson acide de la paille de blé à 90 min de temps de séjour et avec une liqueur d'imprégnation à 1.00%pds d'H₂SO₄

| Température | | °C | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
|----------------------------|------------------------------------|------|-----|-----|-------|-----|-----|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | - | - | 1.61 | - | - |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | - | - | 99.3 | - | - |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | - | - | 99.1 | - | - |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | - | - | 93.6 | - | - |
| | Xylose | %pds | - | - | 88.3 | - | - |
| | Galactose | %pds | - | - | 74.9 | - | - |
| | Arabinose | %pds | - | - | 84.7 | - | - |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | - | - | 84.0 | - | - |
| | Glucose oligomérique | % | - | - | 2.4 | - | - |
| | Glucose monomérique | % | - | - | 6.5 | - | - |
| | 5-HMF | % | - | - | 1.1 | - | - |
| | Humines | % | - | - | 6.1 | - | - |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | - | - |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | - | - | 8.6 | - | - |
| | Xylose oligomérique | % | - | - | 11.1 | - | - |
| | Xylose monomérique | % | - | - | 64.1 | - | - |
| | Furfural | % | - | - | 5.0 | - | - |
| | Humines | % | - | - | 11.1 | - | - |
| | Somme | % | - | - | 100.0 | - | - |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | - | - | 44.0 | - | - |

Tableau A.7 : Cuisson acide de la paille de blé à 120 min de temps de séjour et avec une liqueur d'imprégnation à 1.00%pds d' H_2SO_4

| Température | | °C | 100 | 120 | 140 | 160 | 180 |
|----------------------------|------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | 0.65 | 1.22 | 1.65 | 2.40 | 2.96 |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | 99.4 | 99.2 | 99.3 | 99.0 | 99.0 |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | 95.0 | 94.4 | 95.9 | 86.6 | 83.5 |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | 98.5 | 94.3 | 92.4 | 91.9 | 45.2 |
| | Xylose | %pds | 97.0 | 93.9 | 88.1 | 38.8 | 12.4 |
| | Galactose | %pds | 85.5 | 101.1 | 100.6 | 71.1 | 36.6 |
| | Arabinose | %pds | 81.9 | 104.7 | 108.7 | 69.2 | 25.0 |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | 91.7 | 86.2 | 81.4 | 66.9 | 18.0 |
| | Glucose oligomérique | % | 4.2 | 0.5 | 1.1 | 2.6 | 1.9 |
| | Glucose monomérique | % | 2.4 | 6.8 | 8.9 | 21.4 | 24.2 |
| | 5-HMF | % | 0.2 | 1.1 | 1.3 | 2.3 | 1.2 |
| | Humines | % | 1.5 | 5.4 | 7.3 | 6.7 | 54.7 |
| | Somme | % | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | 53.5 | 20.7 | 8.2 | 4.5 | 3.4 |
| | Xylose oligomérique | % | 27.8 | 0.0 | 4.5 | 0.1 | 4.7 |
| | Xylose monomérique | % | 15.6 | 72.1 | 68.2 | 18.2 | 0.1 |
| | Furfural | % | 0.0 | 1.1 | 8.3 | 20.7 | 33.2 |
| | Humines | % | 3.0 | 6.0 | 10.8 | 56.5 | 58.6 |
| | Somme | % | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | 26.4 | 37.4 | 40.1 | 27.7 | 12.7 |

Tableau A.8 : Cuisson acide de la paille de blé à 140°C durant 20 min et variation de la liqueur d'imprégnation d'H₂SO₄

| Température | | %pds | 0.00 | 0.25 | 0.50 | 1.00 |
|----------------------------|------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | -2.96 | -0.06 | 0.66 | 1.19 |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | 99.0 | 98.8 | 99.1 | 98.6 |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | 102.7 | 105.9 | 97.6 | 100.9 |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | 97.6 | 93.7 | 106.3 | 96.0 |
| | Xylose | %pds | 97.8 | 105.3 | 87.0 | 92.9 |
| | Galactose | %pds | 75.4 | 59.6 | 79.3 | 94.5 |
| | Arabinose | %pds | 93.5 | 68.2 | 74.0 | 98.1 |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | 95.8 | 90.5 | 100.2 | 87.3 |
| | Glucose oligomérique | % | 0.0 | 1.2 | 3.3 | 1.2 |
| | Glucose monomérique | % | 1.8 | 2.0 | 2.9 | 6.7 |
| | 5-HMF | % | 0.1 | 0.0 | 0.1 | 1.2 |
| | Humines | % | 2.4 | 6.3 | 0.0 | 3.6 |
| | Somme | % | 100.0 | 100.0 | 106.4 | 100.0 |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | 89.0 | 83.2 | 31.4 | 18.8 |
| | Xylose oligomérique | % | 7.5 | 21.8 | 13.0 | 7.2 |
| | Xylose monomérique | % | 1.3 | 0.3 | 55.1 | 65.9 |
| | Furfural | % | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 1.1 |
| | Humines | % | 2.2 | 0.0 | 0.0 | 7.0 |
| | Somme | % | 100.0 | 105.3 | 100.0 | 100.0 |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | 20.1 | 22.3 | 28.0 | 44.2 |

Tableau A.9 : Cuisson acide de la paille de blé à 180°C durant 20 min et variation de la liqueur d'imprégnation d'H₂SO₄

| Température | | %pds | 0.00 | 0.25 | 0.50 | 1.00 |
|----------------------------|------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Cuisson acide | Facteur de sévérité | - | -0.62 | 0.95 | 1.80 | 2.23 |
| | Bilan entrée – sortie masse totale | %pds | 98.0 | 95.2 | 98.6 | 99.3 |
| | Bilan entrée – sortie masse sèche | %pds | 100.3 | 95.2 | 93.9 | 86.7 |
| Bilan par sucre | Glucose | %pds | 96.7 | 93.6 | 97.6 | 86.6 |
| | Xylose | %pds | 101.4 | 86.8 | 97.8 | 59.6 |
| | Galactose | %pds | 67.3 | 88.1 | 75.4 | 73.9 |
| | Arabinose | %pds | 67.9 | 81.6 | 93.5 | 83.0 |
| Conversion / Rendements | Glucose polymérique | % | 92.5 | 86.2 | 83.8 | 59.2 |
| | Glucose oligomérique | % | 3.1 | 3.0 | 0.5 | 0.0 |
| | Glucose monomérique | % | 1.0 | 3.6 | 9.1 | 25.8 |
| | 5-HMF | % | 0.1 | 1.4 | 2.5 | 1.8 |
| | Humines | % | 3.3 | 5.8 | 4.0 | 13.1 |
| | Somme | % | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Conversion / Rendements | Xylose polymérique | % | 84.9 | 14.6 | 5.3 | 1.7 |
| | Xylose oligomérique | % | 15.0 | 23.3 | 0.0 | 0.0 |
| | Xylose monomérique | % | 1.3 | 49.2 | 73.4 | 32.9 |
| | Furfural | % | 0.8 | 5.8 | 0.0 | 31.1 |
| | Humines | % | 0.0 | 7.1 | 21.3 | 34.3 |
| | Somme | % | 102.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Hydrolyse enzymatique | Rendement en glucose à 72h | %pds | 21.2 | 29.3 | 38.5 | 39.3 |

Annexe B : Données expérimentales des caractérisations physico-chimiques réalisées sur les substrats prétraités en cuisson acide

| Référence | - | Paille native | I-1.00, 20, 100 | I-1.00, 0, 140 | I-1.00, 20, 140 | I-1.00, 60, 140 | I-1.00, 60, 140 | I-1.00, 90, 140 | I-1.00, 20, 160 | I-1.00, 120, 140 | I-1.00, 60, 160 | I-1.00, 120, 160 | I-1.00, 60, 180 | I-1.00, 120, 180 | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-------|
| Facteur de sévérité | - | -6.52 | 0.02 | 0.28 | 1.19 | 1.53 | 1.53 | 1.61 | 1.64 | 1.65 | 2.1 | 2.4 | 2.67 | 2.96 | |
| Caractéristique du substrat prétraité | Surface spécifique | m ² .g-1 | 1.0 | 1.2 | 1.9 | 4.7 | 7.2 | 7.8 | 7.4 | 9.6 | 4.3 | 9.4 | 12.4 | 16.6 | 22.3 |
| | Indice de cristallinité | % | 24.4 | 27.1 | 26.2 | 28.4 | - | 33.3 | 31.7 | 31.3 | 36.2 | 42.5 | 43.4 | 45.4 | 42.9 |
| | Diamètre moyen | µm | 1058.5 | 1028.3 | 987.8 | 908.5 | 831.2 | 919.8 | 951.1 | 905.7 | 621.6 | 426.9 | 395.8 | 457.0 | 170.0 |
| | Teneur en xylane après prétraitement | %pds | 100.0 | 90.5 | 47.7 | 18.9 | 11.0 | 11.0 | 8.6 | 2.4 | 8.2 | 1.9 | 4.5 | 4.7 | 3.5 |
| Rendement en glucose monomérique | Après hydrolyse enzymatique (72h) | % | 15.0 | 18.9 | 26.4 | 44.0 | 41.7 | 41.3 | 44.0 | 48.2 | 40.1 | 41.0 | 27.8 | 20.8 | 12.7 |
| | Après prétraitement | %pds | 0.0 | 2.3 | 2.6 | 6.7 | 8.1 | 8.9 | 6.5 | 11.7 | 8.9 | 16.4 | 21.4 | 18.1 | 24.2 |
| | Après hydrolyse enzymatique (144h) | %pds | 15.0 | 28.4 | 41.4 | 69.8 | 72.4 | 70.4 | 71.3 | 65.3 | 70.4 | 39.3 | 21.1 | 35.8 | 2.3 |
| | Somme | %pds | 15.0 | 30.8 | 43.9 | 76.5 | 80.5 | 79.4 | 77.8 | 77.1 | 79.4 | 55.8 | 42.5 | 53.9 | 26.5 |
| Rendement en xylose monomérique | Après prétraitement | %pds | 0.0 | 0.1 | 16.5 | 65.9 | 70.7 | 70.2 | 64.1 | 72.5 | 68.2 | 48.4 | 18.2 | 2.9 | 0.1 |
| | Après hydrolyse enzymatique (144h) | %pds | 2.0 | 23.7 | 17.1 | 13.6 | 9.0 | 9.4 | 3.3 | 3.9 | 6.9 | 0.8 | 0.5 | 1.4 | 0.0 |
| | Somme | %pds | 2.0 | 23.8 | 33.5 | 79.4 | 79.7 | 79.6 | 67.4 | 76.3 | 75.0 | 49.2 | 18.7 | 4.3 | 0.1 |

Annexe C : Tableaux récapitulatifs des expérimentations de détente explosive réalisées sur de la paille de blé 20 mm

Tableau C.1 : Paille native prétraitée par explosion à la vapeur

| | | Paille native | Pression avant détente (bar) | | | | | | | |
|--|---------------------------------|---------------|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | 7 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 |
| Teneur en cellulose / MS | %pds | 39.2 | 39.3 | 39.2 | 38.6 | 39.6 | 40.3 | 42.1 | 52.3 | 55.7 |
| Teneur en xylane / MS | %pds | 25.3 | 25.9 | 22.3 | 28.0 | 26.5 | 26.7 | 22.2 | 18.1 | 10.8 |
| Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique | % | 15.0 | 17.0 | 15.6 | 21.7 | 16.9 | 23.7 | 37.2 | 43.9 | 58.0 |
| Surface spécifique* | m ² .g ⁻¹ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10.0 |

* quand la limite de détection de la mesure par physisorption d'azote apparait, la valeur est fixée arbitrairement à 1 m².g⁻¹

Tableau C.2 : Détentes explosives appliquées sur de la paille de blé précuite à 100°C durant 20 min et 1 %pds d'H₂SO₄

| | | Précuit | Pression avant détente (bar) | | |
|---|-------------------------------------|---------|------------------------------|------|------|
| | | | 7 | 14 | 2 |
| Teneur en cellulose / MS | %pds | 43.2 | 43.8 | 44.2 | 54.3 |
| Teneur en xylane / MS | %pds | 29.1 | 28.5 | 26.3 | 21.9 |
| Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique | % | 38.8 | 22.5 | 33.8 | 38.0 |
| Surface spécifique * | m².g⁻¹ | 1 | 1 | 1 | 2 |

* quand la limite de détection de la mesure par physisorption d'azote apparaît, la valeur est fixée arbitrairement à 1 m².g⁻¹

Tableau C.3 : Détentes explosives appliquées sur de la paille de blé précuite à 120°C durant 20 min et 1 %pds d'H₂SO₄

| | | Précuit | Pression avant détente (bar) | | |
|---|-------------------------------------|---------|------------------------------|------|------|
| | | | 7 | 14 | 2 |
| Teneur en cellulose / MS | %pds | 52.6 | 53.4 | 56.1 | 61.2 |
| Teneur en xylane / MS | %pds | 15.0 | 16.6 | 14.5 | 11.2 |
| Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique | % | 41.0 | 33.9 | 44.1 | 54.8 |
| Surface spécifique | m².g⁻¹ | 2.3 | 3.0 | 3.2 | 5.3 |

Tableau C.4 : Détentes explosives appliquées sur de la paille de blé précuite à 140°C durant 20 min et 1 %pds d'H₂SO₄

| | | Paille native | Pression avant détente (bar) | | | | | | | |
|---|-------------------------------------|---------------|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | | 7 | 10 | 12 | 14 | 16 | 18 | 20 | 22 |
| Teneur en cellulose / MS | %pds | 59.1 | 60.6 | 62.4 | 62.6 | 63.2 | 65.9 | 61.5 | 63.9 | 62.9 |
| Teneur en xylane / MS | %pds | 6.8 | 8.3 | 7.6 | 5.8 | 7.7 | 6.2 | 6.0 | 8.0 | 5.1 |
| Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique | % | 55.0 | 47.4 | 53.4 | 55.1 | 47.2 | 55.9 | 56.7 | 51.4 | 49.0 |
| Surface spécifique | m².g⁻¹ | 3.4 | 5.1 | 7.7 | 7.5 | 6.6 | 8.0 | 7.8 | 6.7 | 8.5 |

Tableau C.5 : Détentes explosives appliquées sur de la paille de blé précuite à 140°C durant 60 min et 1 %pds d'H₂SO₄

| | | Précuit | Pression avant détente (bar) | | |
|--|---------------------------------|---------|------------------------------|------|------|
| | | | 7 | 14 | 2 |
| Teneur en cellulose / MS | %pds | 60.4 | 62.8 | 62.5 | 61.4 |
| Teneur en xylane / MS | %pds | 3.7 | 4.1 | 4.4 | 3.7 |
| Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique | % | 53.7 | 56.1 | 56.2 | 56.9 |
| Surface spécifique | m ² .g ⁻¹ | 5.6 | 6.2 | 8.3 | 8.2 |

Tableau C.6 : Détentes explosives appliquées sur de la paille de blé précuite à 180°C durant 20 min et 1 %pds d'H₂SO₄

| | | Précuit | Pression avant détente (bar) | | |
|--|---------------------------------|---------|------------------------------|------|------|
| | | | 7 | 14 | 2 |
| Teneur en cellulose / MS | %pds | 50.2 | 51.3 | 51.3 | 50.3 |
| Teneur en xylane / MS | %pds | 2.2 | 2.1 | 2.1 | 2.1 |
| Rendement en glucose à 72h d'hydrolyse enzymatique | % | 20.2 | 18.8 | 21.3 | 17.4 |
| Surface spécifique | m ² .g ⁻¹ | 9.3 | 9.9 | 10.2 | 15.7 |

RESUME

Dans un contexte de transition énergétique et de lutte contre le réchauffement climatique, la production d'éthanol de seconde génération semble une voie prometteuse. Il existe 3 étapes pour la production de ce biocarburant : le prétraitement, l'hydrolyse enzymatique et la fermentation. Actuellement, le prétraitement considéré comme le plus efficace est le prétraitement par explosion à la vapeur. Cependant, certains aspects comme les effets physico-chimiques induits par le prétraitement ainsi que leurs impacts sur les caractéristiques de la biomasse prétraitée restent encore mal compris.

Schématiquement, le prétraitement par explosion à la vapeur peut se décomposer en deux étapes : une cuisson acide réalisée à 150-200°C durant 5-30 min qui permet principalement l'hydrolyse des hémicelluloses et une détente explosive qui permet un éclatement mécanique du substrat rendant potentiellement la cellulose plus réactive. Les effets macroscopiques de ce type de prétraitement sur la biomasse lignocellulosique sont aujourd'hui bien connus mais la compréhension des différents phénomènes physico-chimiques ayant lieu en son sein reste limitée.

Ce travail de thèse se propose de mieux appréhender l'ensemble des phénomènes ayant lieu durant le prétraitement par explosion à la vapeur en s'appuyant sur une discrimination expérimentale des phénomènes chimiques (réactions de dépolymérisation) et des phénomènes physiques (détente explosive) ainsi que sur une caractérisation multi-techniques et multi-échelles. L'objectif est aussi de comprendre quelles sont les principales caractéristiques de la biomasse qui expliquent les différences de réactivité en hydrolyse enzymatique et d'expliquer l'impact du prétraitement sur ces dernières et donc sur la réactivité.

Durant la thèse, l'activité de recherche s'est articulée autour de 3 axes. Le premier, basé sur le prétraitement à l'acide dilué, s'est intéressé à la compréhension des phénomènes d'hydrolyse acide qui impactent les propriétés des substrats et donc leurs réactivités à l'hydrolyse enzymatique. Les descripteurs identifiés comme les plus pertinents sont la teneur en hémicelluloses, la surface cellulosique accessible ainsi que les quantités d'humines déposées. Le second axe s'est focalisé sur l'impact de la détente explosive durant le prétraitement par explosion à la vapeur. Ces travaux ont permis notamment de montrer que la détente n'entraînait pas de gain significatif de réactivité et ceci malgré l'augmentation de la surface spécifique. Enfin le troisième axe s'est intéressé à la formation et à la caractérisation des humines. Il a ainsi été observé que les humines se formaient à partir des produits de dégradation des polysaccharides et que la présence d'un support solide favorisait la captation des humines sur sa surface.

Mots clés : biomasse lignocellulosique, prétraitement à l'acide dilué, prétraitement par explosion à la vapeur, réactivité, caractérisation physico-chimique, humines.

ABSTRACT

In a context of energy transition and climate change challenge, the production of second generation ethanol seems to be a very promising way. There are 3 key steps for producing this new biofuel: pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. Currently, the pretreatment considered to be the most efficient, is the steam explosion pretreatment. However, some aspects such as the physicochemical effects induced by pretreatment and their impacts on the characteristics of pretreated biomass remain misunderstood.

Schematically, the steam explosion pretreatment can be separated into two stages: an acid cooking carried out at 150-200°C during 5-30 min and allows mainly the hydrolysis of hemicelluloses and an explosive decompression release which allows a mechanical bursting of the substrate potentially making the cellulose more reactive to enzymatic hydrolysis. The effects of this type of pretreatment on lignocellulosic biomass are now well known, but the understanding of the different physicochemical phenomena occurring within it remains limited.

This thesis work aims to better understand all the physicochemical phenomena occurring during a steam explosion pretreatment, based in particular on experimental discrimination of chemical phenomena (depolymerization reactions) and physical phenomena (explosive release) as well as on a multi-technical and multi-scale characterization of the lignocellulosic biomass obtained after this type of pretreatment. The objective is also to understand what are the main characteristics of biomass that explain the differences in reactivity observed during the enzymatic hydrolysis step and to explain the impact of pretreatment on the latter and therefore on reactivity.

During the thesis, the research activity was structured around 3 axes. The first, based on dilute acid pretreatment, focused on understanding the acid hydrolysis phenomena that impact the properties of substrates and thus their reactivity to enzymatic hydrolysis. The most relevant descriptors identified are the hemicelluloses content, the accessible cellulosic surface and the quantities of humins deposited. The second axis focused on the impact of explosive decompression during steam explosion pretreatment. This work made it possible to show that decompression did not lead to a significant increase in reactivity, despite the increase in the specific surface area. Finally, the third axis focused on the formation and characterization of humins. It was observed that humins were formed from polysaccharide degradation products and that the presence of a solid support favoured the capture of humins on its surface.

Key words : lignocellulosic biomass, dilute acid pretreatment, steam explosion pretreatment, reactivity, physico-chemical characterization, humins.