

Etude de la diversité moléculaire des oligosaccharides solubles d'hémicellulose issus d'autohydrolysats de bois Juliette Francillon

▶ To cite this version:

Juliette Francillon. Etude de la diversité moléculaire des oligosaccharides solubles d'hémicellulose issus d'autohydrolysats de bois. Génie chimique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALI057 . tel-03349304

HAL Id: tel-03349304 https://theses.hal.science/tel-03349304

Submitted on 20 Sep 2021

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 L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Mécanique des Fluides, Energétique, Procédés

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Juliette FRANCILLON

Thèse dirigée par Christine CHIRAT, professeure, Grenoble INP LGP2, et codirigée par Claire BOISSET, ingénieure de recherche, CERMAV

préparée au sein du Laboratoire de Génie des Procédés Papetiers UMR CNRS 5518 et du Centre de Recherche sur les Macromolécules Végétales UPR CNRS 5301 dans l'École Doctorale Ingénierie – Matériaux, Mécanique, Energétique, Environnement, Procédés de Production

Etude de la diversité moléculaire des oligosaccharides solubles d'hémicellulose issus d'autohydrolysats de bois

Thèse soutenue publiquement le **25 juin 2021**, devant le jury composé de :

M. Stéphane BAUP Professeur, UGA, Président Mme Ana Paula COELHO DUARTE Professeure, Universidade de Beira Interior, Rapporteure M. Pierre-Yves PONTALIER Maître de Conférences, INPT, Rapporteur Mme Diane Jouanneau Ingénieure de recherche, UMR 8227 - LBI2M, Examinatrice Mme Christine CHIRAT Professeure, Grenoble INP, Directrice de thèse



N

A la mémoire de Claire Boisset.



« La Nature est un temple où de vivants piliers Laissent parfois sortir de confuses paroles ; L'homme y passe à travers des forêts de symboles Qui l'observent avec des regards familiers. » Charles Baudelaire

« Chaque arbre est le symbole vivant de la paix et de l'espoir. »

Wangari Muta Maathai Biologiste, enseignante, scientifique, militante (1940 – 2011)

« Toute l'histoire de notre évolution biologique tient dans la vie d'un arbre. »

Christophe Drénou Ingénieur horticole, Docteur, spécialiste de l'architecture et de la biologie des arbres

« Je ne puis regarder une feuille d'arbre sans être écrasé par l'univers. » Victor Hugo Artiste, écrivain, poète, romancier (1802 – 1885)

« Pour qu'un écologiste soit élu président, il faudrait que les arbres votent. » Coluche Humoriste et comédien (1944 – 1986)

« Quand le dernier arbre aura été abattu – Quand la dernière rivière aura été empoisonnée – Quand le dernier poisson aura été péché – Alors on saura que l'argent ne se mange pas. »

Geronimo Chef amérindien des Apaches Chiricahuas (1829 – 1909)

\ll Ce n'est pas tant ce que nous devons commencer à faire, que ce que nous devons cesser de faire à nos arbres. \gg

Alex L. Shigo Père de l'arboriculture ornementale moderne (1930 – 2006)

« Il faut planter un arbre au profit d'un autre âge. »

Caecilius Statius Poète et dramaturge (230 – 168 av. J.-C.)

4

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je tiens à m'excuser auprès de vous, de ne pas avoir pu/su trouver les mots lors de ma soutenance pour exprimer ces remerciements. J'ai toujours été plus douée pour écrire que pour parler en public.

Naturellement, je remercie mes deux encadrantes Christine Chirat et Claire Boisset, avec qui j'ai eu la chance de travailler. Merci de m'avoir accordé votre confiance. Aussi, je veux vous remercier pour votre sincérité et votre bienveillance permanente envers moi. J'ai eu l'occasion durant cette thèse, à maintes reprises, de constater que l'herbe n'est pas plus verte ailleurs, bien au contraire ! J'ai bénéficié d'un environnement et d'un encadrement idéal pour mener cette recherche, et ce grâce à vous.

Christine, merci pour votre franchise et vos conseils pertinents qui ont guidé ce travail. Merci d'avoir cru en moi, et d'avoir pris le temps. Merci pour vos encouragements qui m'ont redonné de l'énergie lorsque c'était nécessaire ! Merci d'avoir su me montrer la voie, dont la perspective semblait parfois floue surtout les vendredi soir, vous l'aurez bien remarqué. Je crois que je me sentirai toujours une élève admirative à votre égard... J'espère que nous continuerons à travailler ensemble d'une manière ou d'une autre.

Claire, comme c'est rare et rassurant de rencontrer des personnes qui font les choses avec leur cœur et sans prétention, qui plus est dans le milieu de la recherche académique. J'ai tendance à croire que c'est bien tout ce qui compte ici-bas. J'imagine sans peine que tu en auras éclairé plus d'un.e sur ton chemin. Merci.

Laurine, un immense merci pour ton soutien, ta présence et tes compétences précieuses pour moi, qui ai tout appris à tes côtés. Moi qui n'y connaissais rien en chromatographie, je peux dire sans retenue que tu as été d'une aide essentielle à ce projet, et je veux t'en remercier solennellement. Sans toi au CERMAV, ce manuscrit n'aurait pas vu le jour, cela ne fait pas l'ombre d'un doute. Outre ton dévouement au travail, avec deux grandes qualités que sont la passion et la curiosité, ce que j'ai surtout apprécié c'est la simplicité de nos rapports. J'ai toujours eu confiance en toi. Au beau milieu d'une véritable guerre des égos couronnée d'une tension générale permanente, comme il a été agréable et apaisant de travailler sereinement avec toi. Merci pour les sourires, l'énergie et la bonne humeur, pourvu que ça dure !

Toujours au CERMAV, je veux bien évidemment remercier Eric Bayma Pecit et Paul Charpiot, qui ont grandement contribué à l'apport des résultats concernant la GPC MALS et la GC FID. Merci pour votre temps et pour votre gentillesse !! Merci pour le savoir-faire, les discussions, les multiples essais, notamment en GPC... C'était un plaisir pour moi d'avoir pu travailler avec vous deux au plateau PCANS.

Concernant le LGP2, je remercie Karine Janel pour sa bienveillance et son goût du travail bien fait, son dévouement, le temps qu'elle nous accorde et sa présence

INDISPENSABLE au bon fonctionnement de l'équipe Biochip. Merci pour ta gentillesse et ta patience Karine, je m'y sentais comme chez moi dans cette équipe et c'était aussi grâce à toi. Merci également à David Dallérac pour le travail effectué en amont sur les outils analytiques, je veux parler de la création et la programmation des méthodes d'élution du Dionex et du Shimadzu, qui ont rendu l'exploitation de toutes ces données possible. Sur un aspect plus pratique cette fois-ci, toujours concernant les appareils chromatographiques de l'équipe, merci à toi Jessie pour ton temps, si précieux ! Merci pour les barres de rires, la bonne humeur au quotidien, les bavardages, les potins... On s'en confie des choses autour d'une paillasse entre quatre yeux. Même si j'ai plutôt tendance à faire attention et garder mes distances parfois, sache que ma prudence ne rend pas mon affection pour toi moins grande. Le coup de la rose ! Je ne m'y attendais pas ! Quel grand cœur tu caches derrière ce faux air de gros dur. Inutile de se la jouer avec moi je t'ai grillé au premier jour ! Tu verras à l'avenir que rien ne sert de parler trop fort.

Grâce au partenariat entre la plateforme PSM et le CERMAV, j'ai pu travailler avec Laure Fort. Laure, merci pour ces innombrables échantillons que tu as bien voulu traiter au MALDI TOF MS et à l'ESI MS. Je te remercie pour tes explications, tes compétences et ton savoir-faire sans lequel mon troisième chapitre n'aurait pas eu de sens. Merci pour ta rapidité et ta réactivité !

Lors de ma soutenance, sous le coup du stress, de la fatigue ou de l'émotion, j'ai oublié de remercier les membres de mon jury : je vous présente mes sincères excuses ! J'exprime ici mes solennels remerciements à Stéphane Baup, président du jury, qui a contribué à ces travaux notamment grâce au prêt de charbons actifs et surtout à son apport de connaissances en la matière. Merci pour vos commentaires et la correction attentive que vous avez porté à ce manuscrit. Je veux remercier Ana Paula Coelho Duarte et Pierre Yves Pontalier d'avoir accepté de faire partie du jury en tant que rapportrice et rapporteur. Grâce à vos expertises respectives et votre scrupuleux travail de relecture et correction, ce manuscrit a su trouver sa valeur. Merci à vous Diane Jouanneau d'être venue jusqu'ici pour assister à cette soutenance et d'avoir apporté un œil différent et nouveau à ce travail.

Merci à Glyco@Alps pour les rencontres éclairantes et les buffets interminables où on en oublie sa condition de doctorante contractuelle sous payée. Merci pour la découverte de l'envers du décor grâce à des séminaires enfin dédiés aux doctorant.e.s, organisés par et pour nous. Il s'agit d'une expérience très enrichissante que Glyco@Alps nous a offerte à travers ces séminaires, de l'opportunité de rencontrer des chercheu.se.r.s avec des champs de compétences connexes dans un environnement pluridisciplinaire. Ces séminaires m'ont beaucoup enthousiasmée car ils m'ont montré une fois de plus que toutes nos recherches sont liées, d'une façon ou d'une autre. Je veux vous remercier très sincèrement d'avoir financé du matériel sans lequel mon projet n'aurait pas pu aboutir et qui fait maintenant partie du plateau PCANS dirigé par Laurine Buon au CERMAV et qui j'espère servira à d'autres chercheu.se.r.s. Merci de m'avoir permis, financièrement, de partir à l'international présenter mes travaux à l'Université de Tokyo au Japon durant le l'ISWFPC, ainsi qu'à l'occasion de l'EWLP à Aveiro au Portugal. Je remercie également le CNRS pour son financement PEPS Ingénierie Verte qui nous a permis d'investir dans du matériel analytique de laboratoire pour avancer au mieux dans cette recherche.

J'exprime particulièrement ici mes remerciements à Jahan Golestani, avec qui j'ai pu travailler durant un petit projet commun d'enzymologie. Merci pour ton expertise et le temps consacré à nos expériences communes en plus de ton projet de thèse. J'espère avoir pu t'apporter quelques réponses moi aussi. J'ai pu estimer ta rigueur et ta minutie, ta gentillesse et ta patience... Le calme d'une âme sage !

Je tenais également à remercier Martine Rueff, Nathalie Marlin et Gérard Mortha, pour m'avoir considérée comme une collègue après m'avoir eu comme élève. J'ai découvert le monde de l'enseignement en école d'ingénieur de l'autre côté, qui plus est à Pagora, celle dont je suis issue. Chaque pédagogie est unique et fonctionne à sa manière, ce qui est certain c'est que j'ai eu de la chance d'avoir été votre élève à l'époque et que j'ai encore appris en enseignant à vos côtés en tant que vacataire durant ma thèse.

Anabela da Silva Santos, qui a fait son stage au LGP2 dans l'équipe Biochip dans le cadre de cette thèse, nous a montré une force de travail et une joie de vivre inégalées. Merci pour ta contribution à ce manuscrit. Merci du fond du cœur pour ce visage ensoleillé, merci de nous avoir accueillis chez toi au Portugal avec temps de générosité. Ton chemin et la façon dont tu mènes ta vie forcent le respect et l'admiration. Bon courage pour ta thèse, fais ce dont tu as envie avant tout !

Au laboratoire, merci aux générations précédentes de montrer l'exemple en matière de sécurité et de contribuer à l'harmonie et la bonne coopération entre chercheurs et chercheuses, je pense particulièrement à Elsa, Hélène, Axelle, Claire et Valentin.

Et puis bien sûr merci aux ami.e.s thésard.e.s : Étienne, Valentin, Camille, Rubal, Marie, Constance (merci pour la bonne surprise qui réchauffe le cœur !), Cléo, Enzo... Au labo comme en dehors, je voulais vous remercier pour les bons moments passés ensemble, discussions scientifiques, philosophiques autour d'une bière ou d'un café selon l'heure, à remuer ciel et terre pour re-donner du sens à nos vies et nos recherches, concerts, repas partagés, réparation de vélo et bricolage... Peut-être un mot de plus pour Étienne avec qui j'ai partagé mon bureau dès le premier jour, coloc de thèse ! C'est surtout quand je t'ai vu soutenir que j'ai compris que c'était derrière nous ! Quelle éthique... partagée ! Tout autant que les cafetières toujours trop pleines ! Et Val, merci pour ton accueil chaleureux au labo, tes conseils, tes remarques... Tes blagues fraiches et délicates. Comme en école, y a le tirage au sort et l'adoption !

Je veux aussi vous remercier au même titre que les copains et copines de prépa et d'école pour les cadeaux ! Vous m'avez gâtée merci ! Merci Guillaume d'être venu, ça m'a beaucoup touchée que tu sois là ! Céline, merci de m'avoir supportée durant cette semaine de conférence à Tokyo, et merci pour ton soutien.

Élodie, j'aurais tellement voulu que tu sois là, mais ce mot sur ta carte a suffi à lui seul. Moi aussi je serai toujours là pour toi. Merci pour tout, ma sœur. Merci de croire en moi comme tu le fais.

Fabien, merci à toi, qui as coloré cette période de synthèse en télétravail, forcé par cette pandémie mondiale. Merci pour ton grand soutien lors de la préparation de ma soutenance. Merci de m'aider chaque jour à cultiver ma confiance en moi.

Puisqu'il est parfois de rigueur de s'étaler durant les remerciements, et qu'à priori tout est permis, alors allons-y.

On ne naît pas tous sous la même étoile, on ne naît pas tous libres et égaux. Il est vrai que même en France aujourd'hui, l'accès aux études supérieures n'est pas rendue possible pour tou.te.s.

Je termine donc ces remerciements par ma famille, sans laquelle je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui, je veux dire sans l'amour et le soutien de mes deux parents, Isabelle et Patrick. Vous m'avez tout donné. Tout ce dont je pouvais avoir besoin pour construire le début de ma vie, pour réussir mes études. Si j'ai réussi c'est simplement parce que vous m'avez laissé croire que c'était possible et donné les moyens de le faire.

Papa, je voulais te remercier d'avoir pris soin de moi, pendant le deuxième confinement, durant lequel j'ai pu avancer au mieux ma rédaction. On était bien tous les deux dans nos montagnes.

Tu n'as peut-être pas de diplôme, mais tu as su m'enseigner ce qu'on n'apprend pas dans les livres ni à l'école. C'est pourquoi je voulais aussi te dire qu'il ne s'agit ni de succès ni talent, mais de travail et de rigueur, de curiosité et de convictions, comme tu me l'as appris. Ce même travail, tu l'as fourni pour d'autres causes, tout au long de ta vie, avec tout autant si ce n'est plus d'intelligence et de justesse que moi. Mon papa, ce diplôme je te le dédie, je te l'offre, il est pour toi, je n'en ai que faire, sans ton amour et ta confiance en moi, il ne vaut rien. Il y a bien une chose que tu as su me démontrer à de nombreuses reprises à travers ton chemin de vie, elle a été très bien formulée par une grande dame, Rigoberta Menchú Tum :

« Un être humain vaut beaucoup plus que ses diplômes et je veux rester toute ma vie une élève. »

Maman... merci d'avoir relu mon manuscrit pour corriger les fautes ! Quelle folie ! Je veux te remercier d'avoir toujours cru en moi, pour ton amour inconditionnel, protecteur et profondément bienfaiteur, sans lequel je ne serai pas qui je suis aujourd'hui. La soutenance et l'obtention de ce diplôme en ces temps singuliers pour notre famille, marquent la fin d'une ère pour moi, et le début d'une nouvelle ère Mère – Fille pour nous.

Merci Mamie Chocolat

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	5
INTRODUCTION	15
CHAPITRE I	18
REVUE DE LITTERATURE	18
I.A. BIORAFFINERIE ET BIOMASSE VEGETALE	18
I.A.1. Plateforme thermochimique I.A.2. Plateforme biochimique I.A.3. Bioraffinerie intégrée à la production de fibres cellulosiques	.20 .21 .24
I.B. LE BOIS	29
I.B.1. Chimie et structure I.B.2. Les hémicelluloses	.29 .35
I.C. EXTRACTION DES HEMICELLULOSES DANS LE CONTEXTE D'UNE BIORAFFINERIE PAPETIERE	45
I.C.1. Extractions en milieu acide I.C.2. Extraction alcaline à froid appliquée à de la pâte à papier I.C.3. Extraction enzymatique I.C.4. Autres procédés	.45 .48 .49 .51
I.D. PURIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES D'HEMICELLULOSES SOLUBLES CONTENUS DANS LES HYDROLYSATS DE BOIS	3 .51
I.D.1. Détoxification par adsorption I.D.2. Précipitation par solvant I.D.3. Filtration membranaire I.D.4. Chromatographie liquide	.51 .54 .55 .57
I.E. METHODES ANALYTIQUES POUR LA CARACTERISATION DES HYDROLYSATS DE BOIS PURIFIES .	60
I.E.1. Chromatographie analytique I.E.2. Spectrométrie	.61 .65
CONCLUSIONS REVUE DE LITTERATURE	69
CHAPITRE II	73
MATERIELS ET METHODES	73
II.A. MATIERES PREMIERES	73
II.A.1. Mélange industriel de copeaux de bois II.A.2. Pâte de feuillus blanchie	.73 .74
II.B. PROCÉDÉS D'EXTRACTION	74
II.B.1. Autohydrolyse II.B.2. Hydrolyse enzymatique	.74

II.C. PURIFICATION	77
II.C.1. Ultrafiltration	77
II.C.2. Traitement au charbon actif	78
II.C.3. Fractionnement par chromatographie liquide	79
II.D. METHODES ANALYTIQUES DE CARACTERISATION	82
II.D.1. Chromatographie analytique	
II.D.2. Spectrométrie	96
SYNTHESE DE LA METHODE EXPERIMENTALE	97
	100
CARACTERISATION DES HYDROLYSATS DE BOIS BRUTS ET ULTRAFILTRES : NFLUENCE DE L'ESSENCE ET DE LA TEMPERATURE D'EXTRACTION	100
III.A. COMPOSITION OSIDIQUE DES AUTOHYDROLYSATS	101
III.A.1. Hydrolysats bruts : comparaison des essences	101
III.A.2. Hydrolysats ultrafiltrés : influence de la taille de la membrane	103
III.B. GROUPEMENTS DE SUBSTITUTION DES OLIGOSACCHARIDES SOLUBLES	111
III.B.1. Oligosaccharides acétylés	111
III.B.2. Quantification des acides hexuroniques et ratios molaires	117
III.C. IMPURETES DANS LES HYDROLYSATS DE BOIS	120
III.C.1. Produits de dégradation	120
III.C.2. Lignine soluble	120
III.D. MASSE MOLAIRE DES OLIGOSACCHARIDES D'HEMICELLULOSES PRESENTS DANS LES AUTOHYDROLYSATS	125
III.D.1. Chromatographie d'exclusion stérique	
III.D.2. Spectrométrie de masse : structure et composition des oligosaccharides	133
CONCLUSIONS CHAPITRE III	138
	145
	145
DETOXIFICATION ET MODIFICATION DES HYDROLYSATS DE BOIS PAR ADSORF AU CHARBON ACTIF ET HYDROLYSE ENZYMATIQUE	PTION 145
IV.A. TRAITEMENT AU CHARBON ACTIF	146
IV.A.1. Sélection du charbon actif	
IV.A.2. Influence de la concentration en charbon actif	
IV.A.3. Essai préliminaire sur lit filtrant granulaire de charbon actif	158
IV.B. COMBINAISON CHARBON ACTIF ET ULTRAFILTRATION	161
IV.B.1. Traitement des hydrolysats de résineux par ultrafiltration et charbon actif	161
IV.B.2. Traitement des hydrolysats de feuillus par ultrafiltration et charbon actif	167
IV.C. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES HYDROLYSATS DE BOIS	177
IV.C.1. Hydrolysat de feuillus	177

CONCLUSIONS CHAPITRE IV Annexes Chapitre IV	181 182
CHAPITRE V	185
PURIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS PRETRAITES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE D'EXCLUSION STERIQUE	185
V.A. COLONNES BIO-GEL P2 ET P4 (BIORAD)	187
V.A.1. Oligosaccharides extraits par autohydrolyse de bois résineux V.A.2. Oligosaccharides extraits par hydrolyse enzymatique d'une pâte kraft de feuillus	187 193
V.B. COLONNES SEC HW-40s (TOYOPEARL)	198
V.B.1. Influence de l'éluant et du diamètre de colonne V.B.2. Fractionnement du perméat des résineux V.B.3. Fractionnement du perméat de feuillus	198 200 203
V.C. COLONNES HI LOAD SUPERDEX (GE HEALTHCARE)	209
V.C.1. Configuration à trois colonnes SEC Hi Load Superdex 30 V.C.2. Configuration à trois colonnes SEC Hi Load Superdex S200-S75-S75	209 212
CONCLUSION CHAPITRE V	220 222
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	229
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	233
RÉSUMÉ	253

INTRODUCTION

A vu du contexte mondial géopolitique tendu, dû à la fois à la raréfaction des ressources fossiles pour la production d'énergie et de matériaux et à une demande croissante, outre un changement de modèle de consommation local et global, il est clair que l'utilisation d'une ressource moins géolocalisée que le pétrole, renouvelable et abondante pourrait contribuer en partie à assurer un avenir soutenable. Encore faut-il exploiter cette ressource durablement et de manière responsable. La biomasse végétale répond à ces critères et permet déjà de produire à échelle industrielle des biocarburants, biomatériaux, bioplastiques et autres produits de consommation biosourcés. Tous ces produits ne sont pour autant pas neutres en carbone et des progrès sont à réaliser pour rendre leur cycle de vie viable.

Ainsi est né ce projet, dans la volonté d'extraire et de valoriser les polysaccharides du bois et en particulier les hémicelluloses dans le domaine la santé humaine. Plusieurs thèses ont été réalisées au laboratoire pour la valorisation des hémicelluloses du bois à des fins applicatives variées (bioéthanol, tensioactifs verts, xylitol, furfural, prébiotiques...).

Ces hétéropolysaccharides de différentes natures chimiques sont hautement substitués et ramifiés, et caractérisent l'essence du bois qu'ils composent et son environnement de croissance. Leur rôle assure de nombreuses fonctions mécaniques et biologiques (encore non élucidées pour certaines) au sein de la structure même d'un arbre dont ils représentent environ 30% en masse. Ils sont les deuxièmes biopolymères les plus abondants sur terre et représentent donc un gros potentiel encore inexploité. Les principales limitations à l'utilisation de ces macromolécules résident dans leur complexité structurelle, mais également dans leurs liaisons privilégiées avec la cellulose et la lignine dans le bois. En effet, les extraire sans les dégrader ne semble pas évident, mais les extraire sans dégrader les autres composants du bois et sans modifier l'ultrastructure d'une fibre est compromis. Leur caractérisation et surtout l'isolation de molécules d'intérêt est un véritable défi lorsque la matière première utilisée pour leur extraction est le bois.

Pourquoi avoir choisi le bois comme biomasse ? Les hémicelluloses sont en réalité un co-produit de l'industrie papetière, récupéré pour produire de l'énergie par combustion. Leur extraction en amont du procédé papetier grâce à un prétraitement des copeaux nommé autohydrolyse permettrait à la fois leur valorisation sous forme d'hydrolysat et l'utilisation des copeaux de bois préhydrolysés pour la production de fibres cellulosiques. Ce contexte d'extraction est le socle du projet. Cette ressource inexploitée est alors directement disponible et déjà approvisionnée si l'on considère que l'industrie papetière mondiale utilise chaque année 31.10⁷ T de bois pour la production de cellulose. La diversification des usines de pâte de bois a déjà commencé et semble être en bonne voie de réalisation. Les bioraffineries lignocellulosiques intégrées aux usines de production de fibres de cellulose **Consisteront** donc à déconstruire et valoriser la biomasse dans son ensemble et non

uniquement la cellulose, à la manière d'une papeterie traditionnelle. Cette forme de bioraffinerie représente un concept viable d'exploitation des polysaccharides du bois sous forme de produits commerciaux en grande partie recyclables et substituables aux produits issus de la pétrochimie.

Ainsi, au vu du nombre croissant de projets privés comme publics au niveau international dédiés à la thématique d'extraction et de caractérisation des hémicelluloses, il est d'un intérêt commun de poursuivre les recherches dans ce Les objectifs sont multiples, et s'inscrivent dans le développement des sens. alycosciences grâce à l'étude des glycomolécules trouvées dans la nature (glycolipides, polysaccharides...), initié par le projet Glyco@Alps financé par l'Initiative d'EXcellence de l'Université Grenoble Alpes (ANR-15-IDEX-02) en mars 2017. Le premier ensemble de travaux, destiné à l'exploration des forêts qui sont des puits de biodiversité, est divisé en deux avec une thèse portant sur les plantes et les microalgues trouvées à haute altitude et l'autre sur les oligosaccharides du bois considérés comme des glycanes bioactifs. C'est cette dernière qui fait l'objet du présent manuscrit intitulée : « Etude de la diversité moléculaire des oligosaccharides solubles d'hémicellulose issus d'autohydrolysats de bois ». Ces travaux de thèse ont été réalisés en collaboration entre le Laboratoire Génie des Procédés Papetiers (LGP2) et le CEntre de Recherche sur les MAcromolécules Végétales (CERMAV) à Grenoble.

Deux mélanges industriels d'essences de bois feuillus et résineux caractéristiques ont été étudiés ainsi que deux températures d'extraction : 150°C et 170°C. Elles ont été choisies car elles se situent dans l'intervalle de températures le plus fréquemment utilisé au niveau industriel pour l'autohydrolyse des copeaux de bois en amont d'un procédé de mise en pâte kraft. Lors d'une autohydrolyse une grande partie des hémicelluloses du bois (jusqu'à 80%) est solubilisée sous forme d'oligosaccharides et de monosaccharides, mais aussi des fragments de lignine, solubles et insolubles, et une très faible part de cellulose dans des conditions très sévères. Cette liqueur sucrée de bois, contient également des produits de dégradation toxiques formés par hydrolyse secondaire car le milieu réactionnel est naturellement acidifié par les groupes fonctionnels des hémicelluloses. Nous souhaitons isoler et caractériser les oligosaccharides contenus dans cette liqueur pour être capables par la suite de les valoriser. Autrement dit, tous les autres composés présents dans cet autohydrolysat sont considérés comme des impuretés.

Les principaux objectifs de la thèse sont les suivants :

- Etudier l'influence de la sévérité du traitement et de l'essence de bois utilisée sur la composition osidique, le degré de substitution, la taille, la masse molaire, la structure et la quantité des différents oligomères solubilisés, mais également sur la concentration en impuretés ;
- ii. Etudier la propension de l'ultrafiltration membranaire, l'hydrolyse enzymatique et l'adsorption d'impuretés sur charbon actif des hydrolysats de bois, à faciliter le fractionnement des mélanges d'oligosaccharides ainsi purifiés par chromatographie d'exclusion stérique et leur caractérisation.

Pour ce faire, plusieurs étapes de purification sont nécessaires à l'analyse des oligomères d'hémicelluloses. En premier lieu sera présenté l'étude de la filtration membranaire à cinq différents seuils de coupure. Le deuxième chapitre est consacré à la détoxification par adsorption au charbon actif des hydrolysats de bois, seule et combinée à la filtration membranaire pour l'obtention de mélanges d'oligosaccharides purs. Enfin, la troisième partie de cette thèse est dédiée au fractionnement des échantillons purifiés obtenus précédemment par chromatographie liquide d'exclusion stérique (gel filtration) sur plusieurs systèmes conçus à cet effet. Le but étant d'isoler et de séparer définitivement certaines molécules bioactives d'intérêt du reste de l'hydrolysat. Une des applications visées dans ce projet est la production de prébiotiques à partir du bois : oligosaccharides utilisés sélectivement par le microbiote intestinal humain conférant ainsi à l'hôte de multiples bienfaits pour la santé.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTERATURE

I.A. BIORAFFINERIE ET BIOMASSE VEGETALE

Le terme bioraffinerie a été développé par analogie mais également par opposition au terme raffinerie qui consiste à la transformation du pétrole en différents produits (Kamm, Gruber, et Kamm 2005). La bioraffinerie consiste à déconstruire et fractionner la biomasse en ce que l'on peut nommer des bioproduits. La première évocation de bioraffinerie est apparu au début des années 1980 (Levy et al. 1981) avec l'utilisation de biomasse pour la production de composés organiques et carburants liquides, mais son concept a été proprement défini en 1991(Galletti 1991). Selon la directive du Parlement et Conseil Européen 2003/30/CE, la biomasse est la part biodégradable des produits, déchets et résidus issus de l'agriculture, sylviculture et industries liées mais également des déchets industriels et municipaux en général. Le terme bioraffinerie englobe plusieurs définitions en une (Bastidas-Oyanedel et Schmidt 2019), elle peut désigner une installation ou un groupe d'industries en synergie économiquement et environnementalement durables, un concept global ou encore la séparation de la biomasse en produits commercialisables. La Figure 1 montre un éventail des produits commercialisés par une bioraffinerie, en parallèle avec ceux issus d'une raffinerie conventionnelle (Bastidas-Oyanedel et Schmidt 2019).

De manière générale, la bioraffinerie englobe toutes les industries intégrées biosourcées utilisant une variété de technologies destinées à la production de biocarburants, de produits chimiques, de biomatériaux (incluant les fibres), d'aliments et ingrédients pour l'alimentation animale et d'énergie, à partir de matières premières issues de la biomasse végétale. Ces technologies désignent un ensemble de procédés : transformation, fractionnement, conversion thermochimique, chimique et/ou biochimique, extraction et séparation. On distingue différents types de bioraffineries grâce notamment :

- A la matière première (amidon, cellulose, hémicelluloses, lignine, huiles végétales, eau de mer, déchets alimentaires et urbains...) pouvant provenir de cultures dédiées (première génération), de déchets ou résidus (deuxième génération) ou de microalgues (troisième génération) (Bastidas-Oyanedel et Schmidt 2019);
- Aux procédés de conversion utilisés allant de pair avec le fonctionnement en plateforme (une molécule intermédiaire permet la synthèse de plusieurs produits). On pense alors aux plateformes sucres et thermochimiques ;
- Aux produits finis commercialisés qui peuvent être soit énergétiques soit chimiques (brut ou de spécialité), incluant les matériaux.



FIGURE 1 ENSEMBLE DES PRODUITS COMMERCIALISABLES ISSUS D'UNE RAFFINERIE CONVENTIONNELLE ET D'UNE BIORAFFINERIE (BASTIDAS-OYANEDEL ET SCHMIDT 2019)

Substituer de manière viable un quelconque produit issu du pétrole grâce à l'emploi d'une ressource renouvelable constitue un défi. Avoir simplement recours à la transformation de la biomasse est absolument insuffisant, le bilan carbone et l'analyse de cycle de vie des biocarburants première génération en est la preuve. L'idée de compétition entre cultures dédiées à la production énergétique et cultures vivrières constitue une problématique supplémentaire au contexte global de production de biocarburant. Des efforts sur la durée sont encore à fournir pour réussir à concurrencer économiquement et énergétiquement la pétrochimie dans son ensemble et la remplacer progressivement par ce que l'on nomme couramment une « chimie verte » employée dans le cadre d'une bioraffinerie. L'agence internationale de l'énergie (IEA) a déclaré en 2019 que la complexité du concept de bioraffinerie induit la nécessité de transparence, de données scientifiques et quantifiables à l'égard des aspects économiques, techniques et technologiques, et écologiques pour l'évaluation de toute entreprise souhaitant s'inscrire dans cette dynamique de développement durable (Lindorfer et al. 2019).

On a longtemps distingué deux grandes catégories de bioraffineries, dites thermochimiques ou biochimiques (Kamm, Gruber, et Kamm 2005), parmi lesquelles la source de la matière première peut encore créer une distinction. Dans cette partie nous nous concentrerons sur la description de la bioraffinerie du bois. Un troisième type de bioraffinerie sera ensuite présenté dans cette sous-partie, nommé bioraffinerie intégrée à la production de fibres cellulosiques ou plus simplement bioraffinerie papetière. Elle caractérise, seulement en partie, l'origine du concept de bioraffinerie puisque les papetiers ont d'une certaine façon été les premiers à exploiter et déstructurer la biomasse végétale qu'est le bois pour en faire commerce et produire de la chaleur souvent réinjectée sous forme d'électricité dans le réseau. Nous verrons rapidement quels procédés historiques et récents permettent la production de pâte de bois et pour quelles applications afin de comprendre en quoi une usine de pâte constitue une bioraffinerie, et en quoi elle se situe au cœur de ce projet pour la valorisation des hémicelluloses du bois.

19

I.A.1. PLATEFORME THERMOCHIMIQUE

Les bioraffineries identifiables à des plateformes thermochimiques sont basées sur trois principaux intermédiaires de réaction (composés plateforme) grâce à trois procédés de transformation principaux : le biochar et le syngaz provenant des phases solides et gazeuses de la gazéification et la torréfaction de la biomasse et la biohuile formée par pyrolyse de la biomasse. L'obtention de tout ou partie d'un ou plusieurs produits (charbon, gaz ou huile) dépend simplement des conditions de pression, de temps de résidence et de température appliquées lors de la décomposition thermique en absence ou présence d'oxygène des composés carbonés de la biomasse, ce sont aussi ces paramètres qui différencient la pyrolyse de la torréfaction, elles-mêmes de la gazéification cf. Figure 2 (Déglise 1982).



FIGURE 2 PROCEDES ET LEURS CONDITIONS AINSI QUE LES PRODUITS DE REACTION OBTENUS DANS UNE PLATEFORME THERMOCHIMIQUE A PARTIR DU BOIS (DEGLISE 1982)

Ces procédés sont considérés comme un vecteur de densification de la biomasse et donc de concentration de son potentiel énergétique. Bien qu'utilisée depuis la préhistoire, la pyrolyse a connu récemment de nouveaux développements pour répondre aux questions posées par la fin de l'ère pétrolière. De nombreux projets à l'échelle pilote et industrielle pour différentes applications, en particulier dans l'énergie ont vu le jour (D. Meier et al. 2013). Il semble donc que cette branche de la bioraffinerie soit plutôt destinée à la production d'énergie sous forme d'hydrocarbures (combustibles liquides), de biocarburants (hydrogène, méthane) ou de chaleur (électricité), bien qu'elle puisse aussi servir à la synthèse de composés organiques de type terpénique, phénolique, acide, alcoolique (méthanol, éthanol) mais aussi de supports catalytiques, de matériaux poreux ou encore d'amendement biosourcé du sol (goudrons, bitumes), Figure 2. C'est dans cette dernière voie que l'entreprise Soprema, un des principaux producteurs mondiaux de bitume, a décidé de lancer un programme de recherche en lien avec le « Projet La Tuque » imaginé en 2009 visant à valoriser l'utilisation des résidus de coupe forestière, pour répondre aux enjeux sociaux, économiques et environnementaux du Québec. L'objectif est à terme de substituer à plus de 50% les bitumes par de la biohuile pyrolytique.

Plusieurs voies d'intégration à une raffinerie conventionnelle sont déjà utilisées à l'échelle industrielle, notamment grâce à une co-tranformation (co-processing) de fractions pétrolières avec des produits dérivés de la biomasse. Deux technologies sont privilégiées pour intégrer des bioproduits issus de transformations dites thermochimiques : le craquage catalytique fluide et l'hydrocraquage (Bezergianni et al. 2018), (Baldwin 2019).

I.A.2. PLATEFORME BIOCHIMIQUE

Les plateformes biochimiques visent principalement à hydrolyser les polysaccharides contenus dans la biomasse végétale et les extraire en les séparant de ses autres composants via des procédés différents de ceux utilisés dans les plateformes thermochimiques, afin de produire soit des biocarburants soit des produits chimiques biosourcés (incluant les biomatériaux), selon un rapport de la Commission Européenne (Taylor et al. 2015). Les molécules intermédiaires le plus souvent valorisées en tant que molécule plateforme dans ce cadre sont des saccharides, mais aussi des produits dérivés de la lignine lorsque le produit de départ est du bois, car c'est dans ce type de biomasse qu'elle est présente en plus grande quantité. Même si la lignine joue un rôle parfois déterminant et critique dans la transformation de la biomasse lignocellulosique (Yoo et al. 2020), un regain d'intérêt au niveau mondial est observé en ce qui concerne sa valorisation et notamment sa dépolymérisation par voie enzymatique (Abdelaziz et al. 2016). De nombreuses études ont été publiées pour la valorisation de la lignine sous forme de biopolymères et biocomposites (Naseem et al. 2016), de produits pharmaceutiques grâce à ses propriétés antioxydantes et son effet antiviral (Vinardell et Mitjans 2017), mais également pour beaucoup d'autres applications (Eraghi Kazzaz et Fatehi 2020; Yu et Kim 2020). On parle aujourd'hui de plateforme liqueur noire, ce concept s'inscrivant dans le contexte d'une bioraffinerie papetière, il sera développé plus loin (Lindorfer et al. 2019).

En ce qui concerne la valorisation des sucres, on peut faire la distinction entre les monosaccharides en C5 et en C6 (cinq et six carbones), par exemple respectivement le xylose, qui provient des hémicelluloses, et le glucose qui provient à la fois des hémicelluloses et de la cellulose (en majorité). La fermentation bactérienne des sucres en C5 et en C6, celle des C6 étant plus efficace, est utilisée pour la production de bioéthanol, et ce à l'échelle industrielle dans le monde entier aussi bien en première qu'en seconde génération depuis les années 2010. Les sucres en C5 permettent notamment la synthèse chimique et non biologique de biocarburants type diméthyléther (DME) (Bastidas-Oyanedel et Schmidt 2019). La Figure 3 décrit l'ensemble des produits obtenus par fermentation bactérienne des sucres en C5 et en C6. Dans ce contexte, l'exploitation de la biomasse lignocellulosique (résidus forestiers notamment) pour la production de biocarburants jusqu'alors produits à partir de maïs, betterave sucrière, bagasse, paille de blé etc, a fait l'objet de nombreuses études donnant parfois lieu à des installations pilotes et industrielles ces dernières années.



Figure 3 ensemble des produits obtenus par fermentation des saccharides contenus dans la biomasse (Kamm, Gruber, et Kamm 2005)

Cette idée est venue dans un second temps car les prétraitements pour déconstruire et hydrolyser la biomasse lignocellulosique telle que le bois sont plus demandeurs en énergie et plus complexes du fait de sa morphologie et de sa structure physico-chimique (Bastidas-Oyanedel et Schmidt 2019). Ils peuvent donc nécessiter l'emploi de cocktails enzymatiques spécifiques et coûteux (Jørgensen, Kristensen, et Felby 2007; Saha 2003; M. J. Taherzadeh et Karimi 2007). Pour

preuve, une des premières usines de production de bioéthanol deuxième génération construite en Finlande et devenue opérationnelle en 2008 part de déchets agroalimentaires (amidon). En comparaison, il faut attendre l'année 2017 pour que cette même compagnie mette au point une installation destinée également à la production d'éthanol seconde génération mais cette fois-ci à partir de sciure de bois (déchets lignocellulosiques).



FIGURE 4 SCHEMA DE PRINCIPE D'UNE BIORAFFINERIE

La matière première utilisée conditionne donc le procédé de conversion de la biomasse et par conséquent les bioproduits commercialisés ainsi que le type de molécules plateforme (intermédiaires). Certains acides organiques (succinique, fumarique, malique, levulinique...), polyols (glycérol, xylitol, sorbitol...), le furfural et les composés furaniques, ou encore le saccharose, le sucrose et le glucose sont parmi les molécules plateforme les plus utilisées en bioraffinerie de type biochimique (Werpy et Petersen 2004). Par exemple, l'entreprise française Roquette qui utilise de l'amidon est connue pour la production de polyols (utilisés pour la production de vitamine C, de produits d'hygiène buccodentaire et nutriments animal), de maltodextrines (nutrition humaine), d'additifs cationiques pour l'industrie papetière, de biopolymères... Les déchets alimentaires et urbains quant à eux sont habituellement transformés en biogaz par digestion anaérobie ou bien utilisés pour du compostage industriel. Depuis peu, une nouvelle catégorie de plateforme utilisant ce type d'entrant, pouvant être identifiée à une plateforme de conversion biochimique, synthétise de l'acide lactique et s'en sert comme molécule intermédiaire (Abdel-Rahman, Tashiro, et Sonomoto 2013). Il existe aujourd'hui de multiples schémas possibles et imaginables de transformation de la biomasse végétale, que l'on ne peut réduire à quelques catégories, comme en témoigne la Figure 4 (Kamm, Gruber, et Kamm 2005; Werpy et Petersen 2004).

I.A.3. BIORAFFINERIE INTEGREE A LA PRODUCTION DE FIBRES CELLULOSIQUES

I.A.3.a. FILIERE PAPETIERE : UNE BIORAFFINERIE INCOMPLETE

Les premières découvertes emblématiques concernant le fractionnement du bois ont lieu dans le milieu du XIX^{ème} siècle. H. Braconnot découvre d'abord son hydrolyse par l'acide sulfurique concentré, en glucose (1819), que l'on peut nommer saccharification du bois, puis plus tard c'est en 1839 que A. Payen découvre la transformation alcaline du bois en pâte cellulosique grâce à l'emploi d'une solution de soude. Le tout premier procédé de transformation du bois en pâte à papier est breveté en 1863 par l'américain B. C. Tilgham et utilise l'ion bisulfite (HSO₃) pour une désintégration en milieu acide. C'est ce procédé appelé « cuisson au bisulfite » qui s'impose dans un premier temps pour la transformation du bois à l'échelle industrielle et planétaire et qui est toujours utilisé aujourd'hui. Le procédé kraft, qui par opposition à la cuisson bisulfite consiste à la délignification du bois en milieu alcalin, emploie de la soude (NaOH) et du sulfure de sodium (Na₂S). Le procédé kraft étant un procédé propre car ne consomme ni énergie (produite de manière excédentaire) ni produits chimiques externes (recyclés dans le procédé), il s'est assez rapidement imposé comme procédé majoritaire de transformation du bois en pâte de cellulose. Historiquement donc c'est le procédé bisulfite qui a été industrialisé le premier mais aujourd'hui et au niveau mondial, 95% de la pâte de cellulose est produite par le procédé kraft et destiné à la production de papier. Les usines de production de pâte de bois ont donc été les premières à fonctionner comme des bioraffineries mais de manière incomplète, effectivement les hémicelluloses ainsi que la lignine sont solubilisées dans les effluents, et principalement dans la liqueur noire.

Il a fallu attendre 1940, pour commencer à réfléchir à une autre façon d'exploiter la biomasse bois, et valoriser non seulement la cellulose, mais aussi la lignine et les hémicelluloses sous forme de coproduits qui représentent à elles seules plus de 60% en masse sèche et terminent solubilisées dans les effluents du procédé papetier. Nous en sommes donc à ce stade à l'origine même de ce que l'on appelle une bioraffinerie intégrée, qui considère la biomasse bois dans son ensemble, (y compris l'écorce et les extractibles) afin d'en valoriser la totalité. On peut mentionner la naissance d'un procédé d'extraction des hémicelluloses durant cette période, nommé autohydrolyse ou préhydrolyse kraft. Ce procédé, central pour la présente étude, est encore aujourd'hui le seul moyen d'extraire les hémicelluloses en amont du procédé kraft de façon industrielle (Sixta 2006a; 2006b). C'est dans les années 1960, que de nombreux projets et études ont vu le jour pour donner lieu à de nouveaux procédés et de nouvelles méthodes d'extraction, de déconstruction du bois et de valorisation sous forme d'un très large spectre de produits chimiques, autres que la pâte à papier, toutefois sans déboucher sur une échelle de production industrielle (T.E. Timell 1961; Stamm 1964; Brink et Pohlmann 1972; Oshima 1965).

Aujourd'hui la liqueur noire, principale effluent contenant la lignine et les hémicelluloses dégradées, est en majorité évaporée, concentrée puis brûlée afin de produire l'énergie nécessaire à l'autonomie des usines de pâtes. L'énergie excédentaire est souvent revendue sous forme d'électricité au réseau. La combustion de la liqueur noire dans le procédé kraft est assez utilisée pour la production d'énergie (Bajpai 2018) et a été largement étudiée (Fakhrai 2002), (Maček 1999), (Mullen 1989). D'autres voies de valorisation de cette liqueur sont réalisées à échelle industrielle, notamment pour la production de vanilline. On a déjà réfléchi à une autre façon de produire de l'énergie à partir de la liqueur noire issue du procédé kraft que la combustion classique : la gazéification (Tran et Reeve 1988; Ahlroth et Svedberg 1998; Warnquist et al. 1992). Un pilote suédois, Piteå BioDME, est opérationnel depuis 2010 pour la synthèse de méthanol et sa déshydratation en diméthyléther (dont l'emploi est assez connu pour la production de caoutchouc) en partenariat avec Volvo et Chemrec. La liqueur noire peut également être utilisée pour la récupération d'hémicelluloses et la production de lignosulfonates une fois séparés (LUNDQVIST et al. 2009; Mendes et al. 2009), il s'agit d'une voie plus difficile de valorisation des hémicelluloses qui de surcroît sont dégradées.

La diversification touche également l'application liée à la cellulose, de plus en plus de projets concernent les pâtes à dissoudre (environ 5% du tonnage de cellulose produit mondialement). Le reste de la cellulose est valorisée sous forme de pâte à dissoudre pour la production d'éthers et d'acétate de cellulose, de cellulose régénérée, nitrocellulose, cellulose microcristalline, viscose et lyocell (textile). Le secteur papetier français entreprend une profonde mutation (Clément, Bordes, et Lachenal 2010) du fait de restructurations et diversifications industrielles, ces évolutions stratégiques constituent une véritable opportunité pour le développement d'une « chimie verte ».

Quelle place pour les hémicelluloses du bois ? Qu'en est-il des avancés concernant leur valorisation dans le cadre d'une bioraffinerie papetière ?

I.A.3.b. LE CONTEXTE DU PROJET : EXTRACTION DES HEMICELLULOSES DU BOIS EN AMONT DU PROCEDE PAPETIER

Dans un contexte de mise en pâte classique, les hémicelluloses sont dégradées par le procédé kraft qui est alcalin (pH compris entre 13 et 14), de deux façons. La première nommée peeling qui commence à 70°C et vient cliver le monomère se trouvant à l'extrémité réductrice des chaines de polysaccharides, puis à plus haute température c'est-à-dire au-dessus de 140°C, une hydrolyse alcaline vient aléatoirement couper le polysaccharide. Ces réactions sont plus à même de dégrader les hémicelluloses en comparaison à la cellulose du fait de leur petite taille et leur accessibilité, et en particulier les glucomannanes en comparaison aux xylanes. Ces derniers sont « protégés » par leurs groupements acides. On comprend donc l'intérêt d'extraire les hémicelluloses en amont du procédé kraft afin d'en préserver la structure chimique et les propriétés biologiques.



FIGURE 5 PRINCIPAUX OBJECTIFS DE DEVELOPPEMENT DURABLE APPLIQUES AUX INDUSTRIES DU BOIS DEFINIS DANS LE « BIOMASS PROGRAM » DU DEPARTEMENT DE L'ENERGIE DES ETATS UNIS D'AMERIQUE (U.S. DEPARTMENT OF ENERGY 2005)

Comme on peut le voir sur la Figure 5 (U.S. Department of Energy 2005), parmi les objectifs de développement et d'amélioration des bioraffineries papetières aujourd'hui figure la mise en place de nouveaux procédés pour l'extraction des hémicelluloses. Le procédé étudié en conséquence dans le contexte de ce projet est l'autohydrolyse (dont la réaction sera détaillée plus bas), étape située en amont de la cuisson kraft. Plusieurs thèses ont été menées au laboratoire (LGP2), afin de comprendre en quoi cette étape peut modifier la composition chimique et la structure du bois préhydrolysé, et donc faciliter la cuisson kraft et le blanchiment (Sanglard 2013; Boiron 2012). Il a été montré que l'ajout d'une préhydrolyse kraft dépolymérise en partie la lignine contenue dans le bois (Curmi 2018) en plus d'extraire une grande partie des hémicellulsoses, et rend donc le procédé de cuisson et de blanchiment en aval plus efficace (Vila et al. 2012; Curmi 2018; Monot 2015).

Cependant, à haute température (170°C) l'autohydrolyse peut engendrer une condensation de la lignine. Il a également été montré que la dégradation de la cellulose due à une étape de préhydrolyse existe et ne peut être négligée. En effet la préhydrolyse peut retirer jusqu'à 8% de cellulose des copeaux de bois et la dépolymériser (Monot 2015), et engendrer de surcroît une plus grande dépolymérisation de la cellulose lors de la cuisson kraft et une baisse de rendement. Il convient donc de considérer l'impact de la préhydrolyse sur le procédé dans son ensemble.

Par ailleurs d'un point de vue financier et énergétique, l'ajout d'une telle étape d'extraction et de conversion des hémicelluloses du bois dans le procédé kraft est compensé par la diminution de la demande en vapeur lors de la cuisson et permet donc de satisfaire l'énergie nécessaire à cette étape (Marinova et al. 2009). Il semble que la diversification vers une application plutôt de type pâte à dissoudre (cellulose régénérée, textile, acétate de cellulose) convienne mieux à l'ajout d'une étape d'autohydrolyse au vu des propriétés mécaniques désirées et du niveau de pureté en cellulose pour ce type d'application (H. Li et al. 2010). Dans l'ensemble, cette voie de valorisation des hémicelluloses permettrait la commercialisation de produits à haute valeur ajoutée en plus de l'application visée par la production de cellulose. Cette étape vient en tout cas améliorer une bioraffinerie papetière kraft classique dans les sens économique et environnemental. Une étude a récemment prouvé que la xylo-oligosaccharides, fermentescibles coproduction de de sucres et de lignosulfonates à partir de bois feuillus était rendue possible via une autohydrolyse (C. Huang et al. 2016). Il semble donc assez pertinent d'explorer cette voie pour la on valorisation des hémicelluloses dans le cadre d'une bioraffinerie papetière.

QUELLES APPLICATIONS POUR LES HEMICELLULOSES DU BOIS ?



FIGURE 6 APPLICATIONS POSSIBLES PAR MODIFICATION DES HEMICELLULOSES (MARINOVA ET AL. 2009)

De nombreuses applications sont possibles en partant des hémicelluloses du bois, comme le montre le schéma de la Figure 6 (Marinova et al. 2009). Aujourd'hui de manière industrielle, l'application principale des hémicelluloses contenues dans le bois est la synthèse de polyols par hydrogénation des monomères de sucres. Par exemple un des plus connus est le xylitol obtenu par hydrogénation du D-xylose dont la production industrielle à partir du bois a commencé en Finlande en 1975 (Dupont Danisco) pour ensuite s'étendre aux USA comme additif dans l'agroalimentaire (produits sans sucres). Il peut être produit à partir de résidus végétaux comme le bois de bouleau mais aussi la canne à sucre, ou encore à partir de liqueur acide récupérée après cuisson au bisulfite (usine de Lenzing). Une autre application connue des hémicelluloses passe par la synthèse du furfural (Baktash, Ahsan, et Ni 2015), grâce à la préhydrolyse kraft du bois. Le furfural obtenu par hydrolyse acide du D-xylose est une molécule plateforme dans la chaine de valeur de production de polymères, de furanes et tétrahydrofuranes, de composés aromatiques pour l'agroalimentaire. Le furfural et ses dérivés peuvent également être utilisés comme solvant en pétrochimie pour la séparation d'hydrocarbures, ou encore pour la synthèse de certains médicaments, bioplastiques, biocarburants pour le transport... Ces applications sont connues de longue date (Bruins 1930; Esevin et Steele 2015). En partant de biomasse lignocellulosique, ce composé est exclusivement synthétisé par déshydratation (Eseyin et Steele 2015), des pentoses des hémicelluloses et dans ce cadre, sa production ne contraint pas à la construction de nouvelles installations industrielles. Il s'agit d'une des alternatives à la pétrochimie déjà en place aujourd'hui, c'est pourquoi la production de furfural à partir d'hémicelluloses est devenu un intérêt mondial dans la communauté scientifique et l'industrie chimique (da Costa Lopes, Morais, et Łukasik 2017).

Les hémicelluloses peuvent être utilisés dans le secteur de l'agroalimentaire en tant que biomatériaux comme des packagings alimentaires biosourcés (Kisonen et al. 2015), films barrières à l'oxygène (Oinonen et al. 2016), ou encore comme (Mikkonen aérogels aux propriétés isolantes et Tenkanen 2012). Les galactoglucomannanes servent également de renfort mécanique à la production de gels de nanofibres de cellulose (Prakobna et al. 2015) et de pâte à papier (Han et al. 2012), ou encore comme agent de fonctionnalisation dans l'industrie textile (Šauperl et al. 2016). De manière générale, un intérêt grandissant pour ces hétéropolysaccharides aux applications multiples est observé depuis une dizaine d'années, permettant dans une certaine mesure de substituer certains produits pétrosourcés dans les domaines de l'alimentation, la santé, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques, les plastiques et produits chimiques (Peng et al. 2012; Moure et al. 2006; Persin et al. 2011; Lehtonen et al. 2016; Silva et al. 2012). Plusieurs thèses ont été menées au LGP2 pour étudier divers applications aux hémicelluloses solubles extraites par autohydrolyse comme le bioéthanol (Boucher, Chirat, et Lachenal 2014), les polyxylosides d'alkyle qui sont des surfactants biosourcés (Sanglard 2013) ou encore les prébiotiques (Deloule 2017).

La production de prébiotiques à partir du bois constitue une des applications visées pour ce projet de thèse. Les prébiotiques sont définis comme des nutriments non digestibles spécifiques fermentés de manière sélective par le microbiote intestinal, permettant ainsi sa modulation (Gibson et Roberfroid 1995). Le développement ainsi induit de bactéries bénéfiques va souvent de pair avec la production croissante des acides gras à chaîne courte essentiels pour le corps humain ou encore la meilleure assimilation de certains minéraux. Les bénéfices pour la santé de l'hôte sont multiples : prévention du cancer (Sanders et al. 2013), régulation du métabolisme des lipides, suppression de pathogènes, réduction de certaines inflammations et enfin de manière générale stimulation du système immunitaire (Cavaglieri et al. 2003). Les prébiotiques reconnus officiellement et commercialisés en tant que tels aujourd'hui sont les fructo-oligosaccharides (mélange de DP inférieurs à 10) et l'inuline (polymère de fructose de DP 2 à 60 et 12 en moyenne) (Roberfroid 2007). L'influence de degré de polymérisation sur l'effet prébiotique fait débat (Roberfroid 2007; Hopkins, Cummings, et Macfarlane 1998) et dépend surtout des bactéries concernées. On comprend aisément la place de potentiels prébiotiques qu'occupe les oligosaccharides d'hémicelluloses issus du bois, notamment les oligomères solubles et insolubles obtenus par autohydrolyse avec un DP compris entre 2 et 30. Les xylo-oligosaccharides d'Eucalyptus Globulus (Gullón et al. 2014) et les galactoglucomannaes extraits de Picea abies (Polari et al. 2012) ont montré des résultats très prometteurs, mais les propriétés prébiotiques des oligosaccharides du bois restent à prouver grâce notamment à des études plus exhaustives et tests microbiologiques in vitro, in vivo et enfin des essais cliniques.

Il est essentiel de connaître les caractéristiques physico-chimiques des hémicelluloses du bois, leurs liens avec les autres composants du bois et leur rôle au sein d'une telle structure pour comprendre comment les extraire et en exploiter les multiples propriétés.

I.B. LE BOIS

I.B.1. CHIMIE ET STRUCTURE

Le bois offre une diversité moléculaire et structurelle unique. On peut diviser les essences d'arbres en deux grandes catégories : les résineux faisant référence aux conifères majoritairement répandus comme le pin, le sapin, l'épicéa, le thuya, le cèdre... et les feuillus regroupant notamment le bouleau, le hêtre, le châtaignier, le peuplier, le noisetier... Certaines espèces comme le *Ginkgo biloba* peuvent parfois porter à confusion car bien que classée dans la famille des conifères, ses feuilles changent de couleur avec les saisons et son système reproductif est différent de celui des conifères.



FIGURE 7 MONOSACCHARIDES QUI COMPOSENT LES POLYSACCHARIDES DU BOIS (FENGEL ET WEGENER 1984)

Le bois est constitué de polysaccharides (60 à 70%) eux-mêmes fait de monosaccharides liés de manière covalente entre eux. Sur la Figure 7 est représentée la majeure partie des monomères de sucres qui composent les polymères du bois. Le carbone noté 1 d'un monosaccharide, sur la Figure 8 (a), est dit anomérique et correspond au carbone sur lequel le cycle se referme lors de sa formation et qui est lié par éthérification. Lorsque l'attaque se fait par l'oxygène de

l'alcool primaire du carbone 4, le cycle résultant est dit furanique, et lorsqu'elle provient du carbone 5 le cycle formé sera dit pyranique (noté f ou p Figure 7). Ces deux formes sont des isomères de position des aldoses primaires. Les positions des groupes hydroxyles anomères notées α (axiale) et β (équatoriale) proviennent du fait que l'attaque peut se faire de chaque côté du plan de l'aldéhyde. La forme prédominante d'un monosaccharide en solution dans la nature, à l'exception de l'arabinose, est une conformation chaise, Figure 8 (a), pyranique avec un hydroxyle anomère en β . Il s'agit de la forme la plus stable (Stevanović and Perrin 2009).



FIGURE 8 LA CELLULOSE : STRUCTURE STEREOCHIMIQUE (A), ABREVIEE (B), LA PERSPECTIVE DE HAWORTH (C), REPRESENTATION DE CRAM (D), REPRESENTATION DES LIAISONS HYDROGENE EN POINTILLES ENTRE CHAINE (GULLICHSEN, PAULAPURO, AND STENIUS 2000)

Ces polysaccharides sont de différentes natures chimiques et structurelles que l'on peut une fois encore distinguer en deux familles. La cellulose, homopolysaccharide (car constitué d'un monomère de sucre unique) dont le DP est compris entre 8000 et 15000, représente en moyenne 40% en masse du bois et sa structure est formée d'unités anhydroglucose liées entre elles par des liaisons (représentation glycosidique β-1,4 Figure 8). Les hémicelluloses. hétéropolysaccharides avec un DP pouvant aller de 50 jusqu'à 300 peuvent constituer jusqu'à 30% du bois. Leurs structures et leurs compositions chimiques complexes sont détaillées dans la partie suivante. Ces polymères sont liés entre eux par des liaisons hydrogènes intra et inter moléculaires (Figure 8) pour former des microfibrilles (vert), cf. Figure 9 (Scheller et Ulvskov 2010).

Ces microfibrilles constituent les trois strates de la paroi secondaire des cellules du bois, Figure 11 (b). Lorsque les chaines de cellulose sont arrangées de manière ordonnée dans l'espace, les microfibrilles alors formées par un « faisceau de chaines de cellulose » (cf. Figure 11) seront cristallines et auront une grande résistance mécanique. Un faisceau de microfibrilles forment une fibrille de cellulose,_

dont la structure et la composition chimique est illustrée Figure 11. Par opposition aux parties cristallines, une petite partie de la cellulose est dite amorphe lorsque l'on n'observe pas d'organisation parallèle entre ces microfibrilles. A l'image des hémicelluloses du bois, qui sont amorphes et donc très réactives car accessibles, c'est cette petite partie de la cellulose qui subira le plus de dégât lors d'une autohydrolyse par exemple. A ne pas confondre avec ce l'on nomme l'amidon de bois, élément non structurel du bois, composé d'amylose et d'amylopectine (Fengel et Wegener 1984).

cette Figure deuxième catégorie On observe sur 9 une d'hétéropolysaccharides nommée pectine (en bleu). Également liés entre eux de manière covalente et à la cellulose par des liaisons hydrogène ils contribuent ainsi au maintien structurel des cellules du bois. Parfois on confond pectines et hémicelluloses, même si contrairement aux hémicelluloses les pectines ne sont pas composées d'un squelette classique en β-1,4. Ces pectines sont souvent décrites comme appartenant majoritairement à la paroi primaire, mais elles apparaissent également dans la paroi secondaire des cellules de bois. Dans cette paroi primaire se trouve également en moyenne 50% de lignine, sa teneur en hémicelluloses et en cellulose varie fortement en fonction de l'essence de bois.



FIGURE 9 SCHEMATISATION DE LA PAROI PRIMAIRE DES CELLULES (SCHELLER ET ULVSKOV 2010)

La Figure 9 est un zoom de la paroi primaire (notée P) et de la lamelle moyenne (ML pour middle lamella) d'une cellule de bois, représenté en entier sur la Figure 11 (b). La lignine en jaune, en est le principal constituant (à hauteur de 70%) et joue le rôle de ciment entre les fibres de cellulose. La majeure partie de la lignine se situe à l'intérieur de la paroi des fibres et les maintient collées entre elles. Elle est composée de trois principales unités monomériques, l'alcool sinapylique (présent en grande partie chez les bois feuillus), l'alcool conyférilique (plutôt présent dans les résineux) et l'alcool para-coumarylique.



FIGURE 10 LIAISONS ENTRE LES UNITES MONOMERIQUES DE LA LIGNINE DU BOIS (A) ET ENTRE LES HEMICELLULOSES ET LA LIGNINE (B) (GULLICHSEN, PAULAPURO, ET STENIUS 2000)

Il s'agit d'un hétéropolymère de haut degré de polymérisation, dont plusieurs structures ont déjà été proposées et diffèrent en fonction de l'essence de bois. Ici sont simplement présentées les trois types de liaisons impliquées entre les monomères de lignine (Gullichsen, Paulapuro, et Stenius 2000), Figure 10, et illustrent déjà suffisamment sa complexité. Une partie de la lignine est acétylée et présente donc un caractère acide, encore une fois tout dépend de l'essence étudiée.

Elle peut être liée de manière covalente principalement par des liaisons éther et ester (Gullichsen, Paulapuro, et Stenius 2000), par liaison hydrogène ou interaction de Van der Waals aux hémicelluloses, et ce dans les bois feuillus comme résineux, cf. Figure 10. Les hémicelluloses liés de manière covalente à la lignine sont notamment les xylanes chargés d'acides glucuroniques et les hémicelluloses chargées de manière générale qui représentent plus de 80% des complexes lignine hydrates de carbone dans les bois feuillus (Yongchao Zhang et al. 2019). La plupart des liaisons avec la lignine se fait à partir du carbone d'un arabinose, xylose, acide méthylglucuronique ou galactose. Il faut savoir que ces liaisons sont susceptibles d'être clivées lors d'une autohydrolyse et par cette voie permettre de solubiliser une partie de la lignine dans la liqueur.

Les terpènes, très odorants, et les acides gras qui constituent la résine, les tanins (dont les flavonoïdes), les phénols, les alcaloïdes, les acides aminés qui composent les protéines et autres composés aromatiques font partie du bois et sont classés sous le nom d'extraits ou extractibles, qui comptent pour au maximum 6% de la masse du bois. Leur nom vient du fait qu'ils sont facilement extraits avec de l'eau, une solution alcaline ou des solvants organiques (Sixta 2006b). Les composés inorganiques trouvés dans le bois jouent un rôle majeur pour certains, lors de leur croissance mais également concernant la fertilisation des sols d'où ils prennent racine. Il s'agit majoritairement d'oxydes et de sels métalliques, comprenant le calcium, le magnésium, le potassium, le sodium, le fer, l'alumine et le manganèse. Ils représentent à eux seuls environ 2% du bois (Gullichsen, Paulapuro, et Stenius 2000; Sixta 2006b).



FIGURE 11 SCHEMATISATION DE LA STRUCTURE HIERARCHIQUE DU BOIS (A) (SIXTA 2006B) ET COUPE D'UNE CELLULE DE BOIS (B) (EERO SJÖSTRÖM 1993)

Pour résumer, le bois est constitué de trois polymères principaux :

- La cellulose, homopolysaccharide linéaire très long composé d'unités glucose, majoritairement cristalline
- Les hémicelluloses, hétéropolysaccharides de plus petite taille que la cellulose, ramifiés et/ou réticulés, amorphes pouvant être divisées en plusieurs familles
- lignine, hétéropolymère phénylpropane La composé d'unités tridimensionnel dont la structure n'est encore pas complètement déterminée à ce jour

Ils sont étroitement liés à la fois par des liaisons covalentes et non covalentes, et sont répartis différemment dans les parois des cellules (fibres) de bois, assurant le maintien mécanique des arbres et le transport de la sève. Leur structure, leur proportion (Tableau 1) et leur composition chimique (exceptée la cellulose) varient grandement avec l'essence du bois mais aussi son environnement de vie. Un schéma récapitulatif illustre un zoom partant du bois aux cellules de bois (dont la coupe est détaillée en (b) Figure 11), puis aux microfibrilles qui les composent, et enfin à la composition et la structure chimique d'une fibrille, Figure 11.

TABLEAU 1 COMPOSITION EN MASSE SECHE DES DIFFERENTS CONSTITUANTS DU BOIS (EERO SJÖS	г <i>к</i> ом 1993)
---	---------------------

	Cellulose	Glucomannanes	Xylanes	Hétéropolysaccharides	Lignine	
Feuillus	38 - 51	1 - 4	14 - 30	2 - 4	21 - 31	C
Résineux	33 - 42	14 - 20	5 - 11	3 - 9	27 - 32	-

I.B.2. LES HEMICELLULOSES

Les hémicelluloses du bois font l'objet central de cette étude, c'est pourquoi dans cette section est approfondie une partie des connaissances les concernant. Il existe plusieurs unités monomériques de sucre (pentoses, hexoses, acides uroniques, présentées en Figure 7 de la section précédente), plusieurs types de liaisons osidiques, et les chaines d'hémicelluloses ne sont pas linéaires comme celles de la cellulose mais ramifiées et parfois même réticulées.

Leur caractérisation est encore d'actualité, tout comme la lignine, il est encore aujourd'hui présomptueux de prétendre connaître l'ensemble des structures complexes qui caractérise cette famille de polysaccharides. Avant toute chose il est nécessaire de faire la distinction entre pectines et hémicelluloses, souvent désignées dans un même ensemble d'hétéropolysaccharides. Pourtant il semble bien qu'ils diffèrent grandement de par leur structure et leur rôle biologique au sein du bois et des plantes en général (Scheller et Ulvskov 2010). On les trouve à la fois dans la paroi primaire (pectines) et secondaire (hémicelluloses) des cellules, les hémicelluloses et les pectines peuvent être liées entre elles par des liaisons covalentes ou non. Ces polysaccharides contribuent au maintien et au renforcement des cellules du bois par « attachement » non covalent à la cellulose. Ils protègent l'arbre en cas d'attaque pathogène en créant une réponse, certains d'entre eux sont même indispensables à la construction et à la croissance des parois secondaires lors du mécanisme de la division cellulaire (Scheller et Ulvskov 2010).

Dans cette section sera présentée une liste non exhaustive à la fois des différentes structures d'hémicelluloses et de pectines, car ces deux familles proches d'hétéropolysaccharides ne peuvent être décrites l'une sans l'autre. D'autre part, elles sont extractibles par autohydrolyse dans des conditions similaires, et chacune présente un grand intérêt applicatif pour leur valorisation en tant que produit à haute valeur ajoutée dans le cadre d'une bioraffinerie papetière. Les arabinanes, les galactanes, les galacturonanes et certaines glucanes (callose et laricinanes) seront considérés comme des polysaccharides pectiques, en revanche les mannanes, les xylanes et les xyloglucanes sont considérés comme des hémicelluloses.

I.B.2.a. LES XYLANES

Les xylanes sont des polysaccharides constitués d'unités β -D-xylopyranose liées en β -1,4, il s'agit de la famille d'hémicelluloses prédominante dans les bois feuillus, Figure 12 (b). Dans cette essence, elles sont ramifiées toutes les dix unités par des acides 4-O-methyl-D-glucuronique liés en α -1,2, parfois (plus rare) d'acide β -D-galacturonique, et de groupements acétyles en position O-2 ou O-3 (Sixta 2006b). Les xylanes de feuillus sont très acétylés et leur degré de polymérisation est d'en moyenne 200. Leur degré d'acétylation varie en fonction de l'espèce, entre 40 et 70% des unités xylose peuvent être acétylés (T. E. Timell 1967) (R. Rowell 2012).
Chez les bois résineux, les xylanes ne sont pas acétylés (T. E. Timell 1967), cependant elles sont ramifiés par des unités arabinose sous forme furanique liées en α -1,3 dans un ratio D-Xylp : L-Araf pouvant aller de 5 : 1 à 12 : 1. S'ils ne sont pas acétylés il faut noter qu'ils sont plus acides car on compte un groupe 4-O-methyl-D-glucuronique tous les 5 à 6 unités xylose environ. Dans ce type d'essence, les xylanes ont un DP moyen de 100 et comptent pour environ 7 à 10% en masse du bois.



FIGURE 12 XYLANES DE RESINEUX (A) ET DE FEUILLUS (B) (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

Une attention particulière est portée à la structure des bouts de chaine de xylanes dans les bois feuillus. En particulier chez les bois d'eucalyptus (Evtuguin et al. 2003) et le bois de bouleau (Johansson et Samuelson 1977). On observe Figure 13, que les extrémités sont constituées d'une unité rhamnopyranose liée en α -1,3, ellemême liée en α -1,2 à un acide D-galacturonique. Le bout de chaine se termine ensuite par une unité D-Xylp en β -1,4. On observe également ce type de terminaisons chez certains conifères comme l'épicéa (Andersson et al. 1983). La structure proposée par Evtuguin est présentée Figure 13.



FIGURE 13 BOUT DE CHAINE DES XYLANES, STRUCTURE PROPOSEE POUR LE BOIS D'EUCALYPTUS (EVTUGUIN ET AL. 2003)

I.B.2.b. LES GLUCOMANNANES

Ce sont dans les bois résineux que les galactoglucomannanes sont les plus abondants, avec un squelette composé d'unités anhydromannose et anhydroglucose sous forme pyranique liés en β -1,4, ils sont ramifiés d'unités D-Gal*p* en α -1,6. Les groupements hydroxyles des carbone C2 et C3 sont substitués de groupes O-acétyle toutes les 3 à 4 unités D-Man*p*. On trouve deux catégories de glucomannanes classifiés selon les ratios molaires Gal : Glu :Man, les mannanes prédominants présentent un ratio de 0,1-0,2 :1 :3-4 et sont acétylés, tandis que les autres qui ne sont à priori pas acétylés ont un ratio de 1 :1 :3.



FIGURE 14 GLUCOMANNANES DE FEUILLUS (A) ET DE RESINEUX (B) (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

Ils représentent respectivement 10 à 15% en masse du bois et 5 à 8%, tous deux ont un DP moyen de 100 dans le bois (T. E. Timell 1967) (R. Rowell 2012). Les glucomannanes de bois feuillus ne comportent pas de groupes latéraux D-Galp et peuvent être acétylés, notamment dans le bois de peuplier (D_{AC} compris entre 0,2 et 0,3) ou non, comme sur la Figure 14 (a) (Johnson et al. 2017; Teleman et al. 2003; T. E. Timell 1967). Bien que connus pour leur rôle de maintien mécanique par attachement à la cellulose (liaison hydrogène) dans les parois des cellules de bois, ils servent également comme sucres de stockage énergétique (Scheller et Ulvskov 2010).

I.B.2.c. LES GLUCANES

I.B.2.c.i. XYLOGLUCANE

Les xyloglucanes se trouvent principalement dans la paroi primaire des cellules (FRY 1989). Il semble que leur rôle soit capital au développement et au maintien des cellules des plantes (Scheller et Ulvskov 2010). Les xyloglucanes seraient présents en très faible quantité dans les bois résineux (E. Sjöström et Westermark 1999), pourtant leur présence a été révélée par une étude qui a analysé une essence de pin gris (Perila et Bishop 1961) et ils semblent être l'hémicellulose principale des parois primaires de cellule de sapin Douglas (Thomas et al. 1987). Les xyloglucanes présents dans les bois feuillus sont potentiellement acétylés (Johnson et al. 2017). La structure du squelette est semblable à celle de la cellulose, à laquelle il faut ajouter des ramifications de D-Xylp liées en α -1,6, sur lesquelles des chaines latérales composées d'unités xylose, arabinose, fucose ou galactose peuvent être liées en α -1,2. La structure est proposée Figure 15 ci-dessous. Ces glucanes peuvent être liés de manière covalente aux chaines latérales ramifiées de rhamnogalacturonanes, c'est-à-dire aux galactanes (Scheller et Ulvskov 2010).



FIGURE 15 STRUCTURE D'UN XYLOGLUCANE (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

I.B.2.c.ii. LARICINANE ET CALLOSE

Le callose est synthétisé dans les parois des cellules qui composent le xylème (bois d'aubier), comme réponse temporaire de l'arbre lorsqu'il a subi un stimuli tel qu'un stress mécanique ou un quelconque dommage. C'est pourquoi, comme le laricinane, on le trouve surtout dans les bois de compression, bien qu'ils existent aussi tous deux dans les bois normaux (cellules de rayons, représentant moins de 5% des cellules du bois) (Fengel et Wegener 1984; Hoffmann et Timell 1972b; 1972a).



Leur squelette commun est composé d'unités glucose liées en β -1,3 comme montré sur la Figure 16. Le callose peut présenter des ramifications en β -1,6 et le laricinane en β -1,4 et dans un très faible ratio (8 pour 200 unités glucose) des ramifications composés de plusieurs acides glucuroniques et galacturoniques (Laine 2005).

 \longrightarrow 3- β -D-Glc p-1 \longrightarrow

FIGURE 16 STRUCTURE DES GLUCANES DE BOIS FEUILLUS ET RESINEUX (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

I.B.2.c.iii. AMIDON DE BOIS

L'amidon de bois n'est pas considéré comme un polysaccharide structurel mais est présent à la fois chez les résineux et les feuillus (Fengel et Wegener 1984; Laine 2005), il est composé d'amylose et d'amylopectine et peut représenter jusqu'à 6% du bois (Bellasio, Fini, et Ferrini 2014).

I.B.2.d. LES GALACTANES

Dans les arbres qui se développent dans des environnements abrupts, on observe la présence de galactanes bien particuliers, on parle de galactanes pectiques. Ce type de terrains favorise la synthèse de ces polysaccharides, comme une réponse de l'arbre à l'environnement pour son renfort mécanique. Dans les bois de compression une structure de galactane, illustrée sur la Figure 18 (Fengel et Wegener 1984), constituée d'unités D-Galp liées en β -1,4 et ramifiée en α -1,6 d'acides galacturoniques, a été mise en évidence par Meier (Bouveng et Meier 1959). Dans les bois de tension, et notamment le bois de hêtre européen (*Fagus Silvatica L.*) utilisé pour cette étude, un squelette linéaire lié en β -1,3 a été observé (H. Meier 1962). Cette structure semble assez unique car elle comporte des ramifications d'acides glucuroniques et de rhamnose, et en plus faible quantité d'arabinose et de xylose.



R = β-D-Gal p, α-L-Ara f or β-D-GlcA p

FIGURE 17 ARABINOGALACTANE DE TYPE II (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

Les arabinogalactanes de type II (Figure 17) sont connus chez le mélèze (bois de cœur des conifères) avec un ratio molaire Ara :Gal de 15 :85 (Buffetto et al. 2015). Leur squelette s'organise autour de liaisons β -1,3 entre unités D-Galp, très ramifiées en C-6 soit d'unités galactose, soit arabinose (sous forme furanique et pyranique) soit d'acides glucuroniques. Ces hétéropolysaccharides peuvent être ramifiés de chaines latérales d'arabinanes (Buffetto et al. 2015).



FIGURE 18 STRUCTURE D'UN GALACTANE D'UN BOIS DE COMPRESSION (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

Les arabinogalactanes d'érable isolés par extraction à l'eau sont acides (A. Roudier 1962), tout comme ceux présents chez les résineux (Tore E Timell 1964; A. J. Roudier et Eberhard 1960). Le ratio Gal :Ara :GlcA des arabinogalactanes solubles dans l'eau extraits du bois de cœur de l'épicéa de Norvège vaut 4,3:1:1 (ratio molaire 3,6 :1 :0,8) et du pin Sylvestre 4,5 :1 :0,2 (ratio molaire 3,8 :1 :0,2) (Stefan Willför et Holmbom 2004). Ce type de polysaccharide a des fonctions autres que purement structurelles au sein de l'arbre, il constitue un pont entre la cellulose et les protéines dans les parois des cellules de bois. Il représente entre 5 et 35% des hémicelluloses chez les conifères, bien que pour la plupart des essences il ne soit présent qu'à l'état de traces (T. E. Timell 1967).

L'existence de rhamnoarabinogalactanes dans les érables avec un squelette également en β -1,3 a été mise en évidence par Fengel, le ratio molaire Gal :Ara :Rha vaut 1.7:1:0.2 (Fengel et Wegener 1984). Sur la Figure 19 est proposée le lien entre les chaines de xylanes et de rhamnoarabinogalactanes par des ponts acide méthylglucuroniques dans les essences de bois feuillus (Evtuguin et al. 2003; Sanglard 2013). On comprend alors toute la complexité de la caractérisation des structures extraites si lors de l'autohydrolyse certaines chaines latérales sont toujours attachées une fois solubilisées dans la liqueur.



FIGURE 19 LIENS ENTRE LES CHAINES DE GALACTANE ET DE XYLANES (EVTUGUIN ET AL. 2003; SANGLARD 2013)

De nouvelles structures sont proposées par Christiane Laine pour les arabinogalactanes d'épicéa et de pins présents dans le bois de cœur (Laine 2005) et représentées Figure 20. Ces galactanes sont particulièrement impliqués dans des complexes lignine hydrates de carbone résiduels sur la surface et également à l'intérieur des fibres d'épicéa de pâte kraft.

							7% *	
	40%	5%	32%	1	.6%			
\rightarrow 3-	β-D-Galp-1-	→ 3-β-D-Galp-1	\rightarrow 3- β -D-Gal p	$p-1 \rightarrow 3-\beta-D-0$	$Galp-1 \rightarrow 3-\beta-D-$	$-Galp-1 \rightarrow 3-\beta-I$	D-Galp-1 \rightarrow 3-	β-D-Gal p -1→
	6	6	6		6	6	6	
	\uparrow	\uparrow	ſ		\uparrow	↑	\uparrow	
	1	1	1		1	?	1	
	β-D-Galp	β-D-Galp	γ α-L-Ar	af β-E	D-GlcpA		α-L-Araf	
		6					3	(a)
		1					↑	
		1					1	
		β - D-Galp	,				β-L-Arap	
		52%					:	3% *
				38%	4%	3%		
\rightarrow 3- β -I	$D\text{-}Galp\text{-}1 \rightarrow 3$	$-\beta$ -D-Gal p -1 \rightarrow 3-	β -D-Gal p -1 \rightarrow 3	-β-D-Gal <i>p</i> -1→	→ 3-β-D-Galp-1→	3-β-D-Galp-1→	3-β-D-Galp-1-	\rightarrow 3- β -D-Galp-1 \rightarrow
	6	6	6	6	6	6	6	
	↑	↑	1	↑	↑	↑	1	
	R	1	1	1	1	1	?	(b)
		β-D-Galp	β-D-Galp	α-L-Araf	β -D-GlcpA	α-L-Araf		(-)
			6			3		
			ſ			ſ		
			1			1		
			β-D-Galp			β - L-Arap		

FIGURE 20 STRUCTURE DE GALACTANE D'EPICEA (A) ET DE PIN (B) (LAINE 2005)

I.B.2.e. LES RHAMNOGALACTURONANES

Ils représentent 20 à 35% des hétéropolysaccharides pectiques, linéaires substitués, ramifiés et comportant des chaines latérales d'autres hémicelluloses, leur isolation et caractérisation sont complexes et font encore l'objet d'études récentes (Yang et al. 2020). On dénombre trois types de galacturonanes. Les homogalacturonanes sont un des constituants majeurs des pectines. Leur structure, représentée Figure 22, est composée exclusivement d'acides galacturoniques comme unités monomériques liés en α -1,4 donnant de longues chaines linéaires. Ils sont estérifiés en C6 et comportent des substituants acétyle ou méthyle en O2 et O3 (oxygène porté les carbone 2 et 3) (Sista Kameshwar et Qin 2018b).



FIGURE 22 STRUCTURE DES HOMOGALACTURONANES (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

Les rhamnogalacturonanes de type I (notés RG I dont la structure est représentée Figure 21) jouent un rôle déterminant dans l'adhésion entre les cellules de xylème de peuplier (Yang et al. 2020). Cet hétéropolysaccharide est particulièrement présent dans le peuplier non mature (stade de développement primaire du xylème. En effet, ses pectines sont essentiellement composées de rhamnogalacturonane et représentent 47% de la composition des parois cellulaires du bois en masse sèche. En comparaison, une étude menée sur des cellules de sapin Douglas a révélé que les polysaccharides pectiques de type RG I et II et homogalacturonanes représentent 20% en masse. Une étude menée sur le bois utilisé dans la présente étude dénommé Populus alba L., qui en contient dans ses parois primaires, montre que le RG I favorise les interactions entre polysaccharides dans la paroi et contribue à son maintien (Koichi 2006). Si on regarde les parois cellulaires dans leur globalité, bien que les RG représentent seulement 2% de leur masse totale, leur importance en termes de maintien et de « liant » entre cellulose hémicellulose et lignine est capital. C'est pourquoi leur retrait du bois facilite énormément sa déconstruction et son fractionnement pour tout type de procédé de conversion en aval (Yang et al. 2020).



FIGURE 21 RHAMNOGALACTURONANE DE TYPE I (FENGEL ET WEGENER 1984; EERO SJÖSTRÖM 1993; ROWELL 2012; T. E. TIMELL 1967)

Ils sont composés d'unités acides D-galacturonique liées en α -1,4 à des Lrhamnose liés en α -1,2 dans un ratio molaire 1 :1, Figure 21. Les unités rhamnose sont acétylées en O3 (oxygène porté le carbone 3) (Buffetto et al. 2015) et ramifiés de quatre chaines latérales différentes en O4 (oxygène porté le carbone 4). La structure proposée sur la Figure 21 montre une chaine latérale de galactane. Ils peuvent être aussi liés à des arabinogalactanes de type I et II et à des arabinanes (Yapo 2011; Pawar et al. 2013). Les rhamnogalacturonanes de type II sont constitués d'un squelette identique aux homogalacturonanes (nommés RG II par la suite) et diffèrent par leur structure encore difficile à déterminer (Pérez, Rodríguez-Carvajal, et Doco 2003). La difficulté de leur caractérisation réside dans le nombre de résidus osidiques ramifiés différents qui peut aller jusqu'à 9, liés eux-mêmes à cinq types de chaines latérales.

D'un point de vue applicatif, ces polysaccharides pectiques sont très intéressants par leurs propriétés et peuvent servir dans les domaines de la santé et de la nutraceutique. Les RG sont connus pour guérir les lésions du colon, apaiser la muqueuse intestinale, ils sont utilisés en prévention de la dégradation des parois du colons (Nascimento et al. 2013). On en trouve dans les agrumes avec un ratio molaire GalA :Rha de 1,06 :1 (Junhui Li et al. 2019), dans les pommes (1,42 :1), dans les pommes de terre (1,7 :1)... (Buffetto et al. 2015). Dans le bois de peuplier ce ratio est beaucoup plus élevé et vaut 5 :1 pour les RG II (Simson et Timell 1978), tandis que dans les bois résineux il vaut en moyenne 8 :1 (Fengel et Wegener 1984).

I.B.2.f. LES ARABINANES

Les arabinanes sont constitués d'unités L-Araf liés en α -1,5 formant un squelette linéaire, ramifié de chaines latérales de ces mêmes unités arabinose cette fois liées en α -1,3. La structure des arabinanes de pin maritime est présentée Figure 23 ci-dessous (Fengel et Wegener 1984).



FIGURE 23 STRUCTURE DES ARABINANES DU BOIS (FENGEL ET WEGENER 1984)

Dans l'ensemble, les hémicelluloses prédominantes aussi bien chez les feuillus que les résineux, sont les glucuronoxylanes et les glucomannanes. Les essences de feuillus sont majoritairement constituées de chaines de xylanes ramifiées d'acides 4-O-Me D-Glcp et les bois résineux de glucomannanes ramifiés d'unités D-Galp. Le pourcentage massique en hémicelluloses de chaque famille en fonction de l'essence est présentée Tableau 2 (Belgacem et Gandini 2011).

	Feuillus	Résineux
Méthylglucuronoxylanes	80 - 90	5 - 15
Arabinomethylglucuronoxylanes	0,1 - 1	15 - 30
Glucomannanes	1 - 5	1 - 5
Galactoglucomannanes	0,1 - 1	60 - 70
Arabinogalactanes	0,1 - 1	1 - 15
Galactanes	0,1 - 1	0,1 - 1
Pectines	1 - 5	1 - 5

TABLEAU 2 POURCENTAGE EN MASSE SECHE DES HEMICELLULOSES ET NON DU BOIS (BELGACEM ET GANDINI 2011)

La Figure 24 décrit les interactions entre fibrilles de cellulose et hémicelluloses et également entre hémicelluloses (Bauer et al. 1973). On observe les liaisons hydrogène directes entre xyloglucanes et fibrilles de cellulose, ces glucanes sont liés aux arabinogalactanes de type I et II. Ces derniers servent de ponts entre les xyloglucanes et les rhamnogalacturonanes. Ce schéma dessiné par Bauer est un bon exemple car il illustre la richesse et la diversité moléculaire de la paroi d'une cellule de bois.



FIGURE 24 SCHEMA DES LIAISONS ENTRE HEMICELLULOSES ET ENTRE CELLULOSE ET HEMICELLULOSES DANS LA PAROI PRIMAIRE DES CELLULES (BAUER ET AL. 1973)

I.C. EXTRACTION DES HEMICELLULOSES DANS LE CONTEXTE D'UNE BIORAFFINERIE PAPETIERE

Comme expliqué dans la partie précédente, les hémicelluloses jouent un rôle secondaire de récupération d'énergie dans les bioraffineries papetières d'aujourd'hui. En effet, elles sont trop dégradées par le procédé pour être valorisées autrement que par combustion. Il a donc fallu trouver de nouvelles voies d'extraction en amont ou en aval du procédé kraft ou bisulfite pour les extraire en les dégradant le moins possible si l'on souhaite les commercialiser pour des applications de plus haute valeur ajoutée (santé, agroalimentaire). Cette partie présente les différentes voies d'extraction.

I.C.1. EXTRACTIONS EN MILIEU ACIDE

I.C.1.a. AUTOHYDROLYSE

Les avantages et inconvénients sur l'ensemble du procédé papetier de l'utilisation d'une autohydrolyse en amont du procédé kraft a été détaillée dans la partie précédente, ici nous décrirons essentiellement les mécanismes chimiques qui régissent de ce procédé.

I.C.1.a.i. MECANISMES MIS EN JEU PENDANT UNE AUTOHYDROLYSE

L'autohydrolyse ne nécessite l'ajout d'aucun réactif chimique : le procédé consiste en un traitement hydrothermal de la biomasse c'est-à-dire à exposer des copeaux de bois plongés dans de l'eau à une certaine température (supérieure à 100°C) et une pression de vapeur saturante afin de solubiliser une partie des hémicelluloses qu'il contient. Ce traitement vise principalement les hémicelluloses grâce à leur accessibilité du fait de leur caractère amorphe et de leur taille, ainsi que leur réactivité chimique. Le caractère cristallin de la cellulose le protège en partie de ce traitement et son attaque ne sera pas favorisée en comparaison à celle des hémicelluloses.



FIGURE 25 MECANISME DE CLIVAGE DES LIAISONS OSIDIQUE DES HEMICELLULOSES PAR AUTOHYDROLYSE (SIXTA 2006B)

Il s'agit donc d'une hydrolyse acide autocatalysée par la présence d'ions hydronium (H₃O⁺) provenant de l'eau introduite dans le réacteur dans un premier temps, et provenant ensuite des groupements acétyles des hémicelluloses dans un second temps, c'est-à-dire dès que la température augmente et permet leur hydrolyse et libération dans le milieu sous forme d'acide acétique. Le caractère naturellement acide du bois catalyse et entretient donc la réaction d'hydrolyse. C'est pourquoi la réaction est dite « auto » hydrolyse, et c'est aussi en quoi ce procédé répond aux critères écologiques, techniques et économiques de la bioraffinerie papetière du futur (Gil Garrote, Domínguez, et Parajó 1999; Richter 1956).Le pH de la solution diminue progressivement au cours du traitement et est fonction de la teneur initiale en groupements acétyles dans le bois utilisé. Le pH des liqueurs de bois ainsi obtenues est compris entre 3 et 4 en fin de réaction et dépend de la sévérité du traitement. Le mécanisme de l'hydrolyse acide d'une liaison glycosidique classique β -1,4 (à la fois dans la cellulose et les hémicelluloses) est décrit Figure 25 (Sixta 2006b).

Les ruptures de liaisons glycosidiques diminuent progressivement le degré de polymérisation des hétéropolysaccharides du bois. Au bout d'un certain temps le DP des hémicelluloses devient assez bas pour les rendre solubles dans la liqueur devenue acide. La solubilité des oligomères d'hémicelluloses, même à des DP élevés, est rendue possible grâce à leur groupements fonctionnels 4-O-méthylglucuronique et acétyles (Carvalheiro et al. 2009). Plus les conditions de ce prétraitement seront sévères, plus les polysaccharides solubilisés auront un degré de polymérisation faible et la quantité de monosaccharides dans la liqueur sera grande. Les monosaccharides solubilisés peuvent également subir une réaction de déshydratation en milieu acide, dont le mécanisme est proposé Figure 26 (Almeida et al. 2009).



FIGURE 26 PRODUITS RESULTANT DE LA DESHYDRATATION EN MILIEU ACIDE DES PENTOSES ET DES HEXOSES (ALMEIDA ET AL. 2009)

La lignine est en partie dépolymérisée durant la préhydrolyse (Curmi 2018), jusqu'à 20% de sa masse contenue initialement dans le bois peut ainsi être solubilisée dans la liqueur de bois (Jiebing Li et Gellerstedt 2008). Les liaisons de type benzyl éther sont les plus touchées par le traitement, et notamment dans les bois de résineux (Boiron 2012). Par la suite on peut observer une repolymérisation par condensation nucléophile en milieu acide de certains fragments de lignine solubilisés (Gierer 1970), selon un mécanisme présenté Figure 27. Ce phénomène est d'autant plus important que la sévérité du traitement est élevée.



FIGURE 27 REACTIONS DE CONDENSATION DE LA LIGNINE DANS LES LIQUEURS (GIERER 1970)

La composition des liqueurs de bois obtenues par autohydrolyse est donc assez complexe et dépend des conditions utilisées. Un autohydrolysat de bois peut être assimilé à un sirop de sucres de différentes natures chimiques, tailles et masses molaires allant du monomère au polymère, et contenant également de la lignine, dissoute ou insoluble, des extractibles, des alcools, des sels, des produits de dégradation des sucres (F, HMF), des acides organiques de faible masse molaire, des complexes lignine hydrates de carbone (lignine liée de manière covalente à une molécule d'hémicellulose), et parfois de la cellulose de faible poids moléculaire.

I.C.1.a.ii. SEVERITE, RENDEMENT ET COMPOSITION DES LIQUEURS

Les trois principaux paramètres sont le temps, le ratio liqueur sur bois et la température de réaction. Une autohydrolyse en amont du procédé kraft utilisée classiquement à échelle industrielle dure entre 1 et 2h à une température comprise entre 150 et 170°C, avec un ratio liqueur sur bois compris entre 2 et 5 (Boiron 2012; Guigon 2019; Sanglard 2013). De nombreuses études ont été réalisées sur le sujet pour des questions d'optimisation en fonction de l'application visée, ce procédé a donc été adapté et revisité. On trouve donc dans la littérature des températures qui peuvent varier de 100 à 250°C pour quelques minutes à plusieurs heures de traitement et avec des ratios liqueur sur bois allant de 1,5 à 10 (Gírio et al. 2010; Gil Garrote, Domínguez, et Parajó 1999; G. Garrote, Domínguez, et Parajó 2001; Carvalheiro et al. 2009).

Plus le ratio liqueur sur bois est élevé plus l'eau a facilement accès par diffusion à l'intérieur des copeaux de bois, et donc augmente le rendement d'extraction (Leschinsky, Sixta, et Patt 2009; Testova et al. 2009). En ce qui concerne la température et la durée du traitement, leur augmentation va également de pair avec l'augmentation du rendement, jusqu'à un certain seuil. En effet des conditions trop sévères, c'est-à-dire des temps trop longs et des températures trop hautes, engendrent une dégradation en milieu acide des oligosaccharides et des monosaccharides, ainsi qu'une plus grande dépolymérisation de la lignine. C'est pourquoi en fonction de l'application visée un compromis doit être trouvé entre ces trois facteurs. Le rendement de l'autohydrolyse varie entre 70 et 90% (Leschinsky, Sixta, et Patt 2009), soit une masse de bois totale solubilisée comprise entre 10 et 30% (Sanglard 2013).

I.C.1.b. HYDROLYSE CATALYSEE PAR AJOUT D'ACIDE

L'ajout d'acide dilué (0,5 à 1,5 % d'acide en masse) convient à des températures comprises entre 160 et 200°C (Gírio et al. 2010) et des temps de réaction assez courts (Kumar et Sharma 2017). Cette voie est notamment utilisée pour l'obtention de monomères plutôt que d'oligomères d'hémicelluloses (Gírio et al. 2010). En effet, cette technique permet d'augmenter la sévérité de l'autohydrolyse, donc engendre un taux de monomère dans l'hydrolysat plus élevé. Par opposition, il existe une voie de fractionnement par hydrolyse acide concentrée (30 à 70% d'acide en masse) à basse température de l'ordre de 40°C durant jusqu'à 90 min (M. Taherzadeh et Karimi 2007; Kumar et Sharma 2017). Cette méthode favorise la corrosion des réacteurs et nécessite un gros investissement technologique, de plus elle engendre de plus forts taux de produits de dégradation et n'est donc pas valorisée à échelle industrielle (Guigon 2019).

I.C.2. EXTRACTION ALCALINE A FROID APPLIQUEE A DE LA PATE A PAPIER

Il est possible de solubiliser sélectivement les hémicelluloses contenues dans la pâte kraft blanchie qui en contient encore jusqu'à 20% grâce à une extraction à la soude caustique à froid (Sixta 2006b) par le gonflement des fibres cellulosiques. Le principe est d'appliquer à la pâte une solution concentrée en 2 et 4 M de soude afin d'observer un gonflement des fibres et une libération des hémicelluloses (Rydholm 1965).Des températures comprises entre 20 et 50 °C permettent d'éviter la dégradation des hémicelluloses (Al-Dajani et Tschirner 2008), sachant qu'elles ont déjà été en partie dégradées par la cuisson kraft (Sixta 2006b). Ce procédé est plutôt utilisé sur de la pâte kraft destinée à la production de pâte à dissoudre afin d'obtenir un degré de pureté de la cellulose non atteint avec une cuisson kraft et un blanchiment (Sixta 2006b), mais il peut aussi être réalisé sur de la pâte bisulfite (Jianguo Li et al. 2017).

I.C.3. EXTRACTION ENZYMATIQUE

L'hydrolyse enzymatique vise à dépolymériser les polysaccharides du bois, et dans le contexte de ce projet à former des oligosaccharides solubles (avec des enzymes de type « endo ») et non des monosaccharides (créés sous l'action d'enzymes dites « exo »). L'avantage d'une telle biotechnologie réside dans l'absence de création de produits de dégradation toxiques comme ceux qui sont engendrés par une autohydrolyse. En revanche, la limitation majeure de ce type d'hydrolyse est régie par l'accessibilité des polysaccharides à hydrolyser, rendue difficile dans le bois du fait de sa morphologie. Il est connu que la lignine, la cellulose et les hémicelluloses sont liées intimement et de façon multiple dans le bois, ce qui rend le procédé très coûteux. C'est pourquoi, afin d'obtenir des oligosaccharides solubles de petite taille, deux voies principales sont privilégiées dans ce contexte :

L'hydrolyse enzymatique des hydrolysats de bois

L'hydrolyse enzymatique d'un autohydrolysat de bois est donc une synergie intéressante qui rendrait le procédé viable car les oligosaccharides solubilisés sont directement accessibles dans la liqueur (Khan 2010; Um 2012; Guigon 2019; Deloule 2017; C. Huang et al. 2016). L'association entre autohydrolyse ou hydrolyse acide et hydrolyse enzymatique de copeaux de bois feuillus a également été étudiée au laboratoire dans le but de produire du xylose monomérique grâce à la dépolymérisation des hémicelluloses (Guigon 2019). En effet, l'utilisation de certains cocktails enzymatique permet de faire baisser le degré de polymérisation moyen des hémicelluloses solubles dans les hydrolysats de bois. Deux études ont notamment été menées sur l'hydrolyse enzymatique des galactoglucomannanes de bois résineux obtenus par autohydrolyse, dans le but de produire des oligomères de faible DP (Dechoux 2014), (Mikkelson, Maaheimo, et Hakala 2013). L'hydrolyse enzymatique peut également être utilisée à la suite de certains prétraitements comme la vapeur à partir de bois de cèdre et de hêtre (Asada et al. 2015).

L'hydrolyse enzymatique des pâtes de bois délignifiées

Dans le cadre d'une bioraffinerie lignocellulosique intégrée à la production de fibres utilisant le bois comme entrant et visant à valoriser les hémicelluloses, l'extraction à la soude caustique à froid peut être combinée à une hydrolyse enzymatique de pâte kraft pour l'extraction d'hémicelluloses solubles et insolubles dans l'eau (Golestani 2020).

Les deux points clés qui régissent l'attaque enzymatique sur un polysaccharide sont son organisation spatiale et sa nature chimique. Le principe de l'hydrolyse enzymatique consiste en une interaction de type enzyme-substrat qui est unique, ici le substrat est une molécule d'hémicellulose. Ce qui signifie que là où une hydrolyse acide ou autocatalysée vient cliver n'importe quelle liaison sous l'action d'un proton, chaque enzyme ne pourra avoir une action que sur un type de liaison spécifique. Par exemple, deux enzymes différentes seront nécessaires si on veut attaquer à la fois des liaisons de type α et β , ou encore si on veut cliver une liaison α entre un groupe acide méthylglucuronique et une unité xylose ou une liaison α entre une unité arabinose et xylose, voire Figure 28 (Sunna et Antranikian 1997).



FIGURE 28 COCKTAIL ENZYMATIQUE NECESSAIRE A L'HYDROLYSE D'UN XYLANE DE BOIS FEUILLUS, ACTION DETAILLEE DE CHAQUE ENZYME (SUNNA ET ANTRANIKIAN 1997)

On comprend aisément que dans le cadre des hémicelluloses du bois, il est nécessaire d'utiliser des cocktails enzymatiques en synergie (Golestani 2020) étant donné la complexité et la diversité des structures rencontrées. De plus, dans le contexte d'une hydrolyse enzymatique d'un autohydrolysat de bois, il est capital de mentionner que les produits et co-produits formés par l'autohydrolyse et donc présent dans les liqueurs de bois comme l'acide acétique (Gírio et al. 2010), l'acide formique, le furfural, le 5-hydroxyméthylfurfural (Rasmussen et al. 2017; Arora et al. 2013), les composés phénoliques (Rahikainen et al. 2011; Boukari et al. 2011; Duarte et al. 2012), la lignine insoluble (Sipponen et al. 2017), la lignine soluble acide (F. Guo et al. 2014) et les complexes lignine hydrates de carbone (Berlin et al. 2006) sont considérés comme des composés inhibiteurs. C'est à dire que ces composés perturbent l'activité enzymatique et diminuent le nombre de sites actifs des enzymes disponibles (Carter 2017; F. Guo et al. 2014). C'est pourquoi certains prétraitements comme la filtration membranaire et la détoxification des hydrolysats de bois par charbon actif par exemple sont nécessaires avant d'effectuer une hvdrolvse enzymatique. Ces techniques de purification sont détaillées dans la partie suivante.

I.C.4. AUTRES PROCEDES

Des formes d'extraction à la vapeur existent et ont été réalisées principalement sur des essences de résineux, utilisant plusieurs séquences d'extraction combinées à une autohydrolyse, ou encore des micro-ondes à des temps très courts de l'ordre de 2 min (Polari et al. 2012; Rivas et al. 2012; Jacobs et al. 2002). L'explosion à vapeur est en revanche très différente de l'autohydrolyse car ce procédé dégrade et déstructure le bois, ce procédé peut-être catalysé (Mosier et al. 2005) ou non (Ogier et al. 1999). Son utilisation conduit principalement à la production d'éthanol cellulosique (Jacquet et al. 2010). Le procédé consiste d'abord à exposer les copeaux à une vapeur sous haute pression (jusqu'à 250°C et 50 bars) pendant quelques secondes à quelques minutes, puis à le ramener à pression atmosphérique par une détente rapide et violente qui casse la biomasse.

I.D. PURIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES D'HEMICELLULOSES SOLUBLES CONTENUS DANS LES HYDROLYSATS DE BOIS

Une fois extraites du bois, les hémicelluloses doivent être purifiées afin d'une part d'isoler une ou plusieurs biomolécules, ou bien d'obtenir un degré de pureté assez grand d'un certain mélange, et d'autre part détoxifier de tout ou partie des impuretés (coproduits ou produits de dégradation). On peut séparer les en fonction oligosaccharides d'hémicelluloses de leur taille (degré de polymérisation), de leur masse molaire, de leur structure (linéaire, ramifié, réticulé), de leur nature chimique (neutre ou chargé d'acides hexuroniques). Il existe une multitude de techniques de purification, le but principal étant de simplifier l'analyse des oligosaccharides constituant le mélange mais aussi d'isoler la molécule d'intérêt pour l'application visée. Les techniques employées diffèrent selon l'application et le degré de pureté désiré (H.-J. Huang et al. 2008; Peng et al. 2012).

I.D.1. DETOXIFICATION PAR ADSORPTION

I.D.1.a. CHARBON ACTIF

Le charbon actif est le plus ancien (1550 avant J.C.) matériau poreux, doté d'une surface spécifique très élevé, connu pour sa grande capacité à adsorber une variété de composés autant organiques qu'inorganiques en fonction du traitement qu'il a reçu et de sa nature (Hassler 1951). Ces charbons actifs peuvent être préparés à partir de différents types de biomasses comme la sciure de bois au niveau industriel, la noix de coco, les résidus agricoles ou la lignine (Chatterjee et Saito 2015) ou encore des matières organiques fossiles comme la houille, la lignite, la tourbe ou l'anthracite. Deux étapes sont nécessaires à la préparation de charbon actif, en premier lieu la déshydratation de la matière première comme précurseur (pyrolyse) puis l'activation qui peut être chimique (Hayashi et al. 2000) comme physique (Heidarinejad et al. 2020). Ces étapes sont les principaux facteurs influençant la taille des pores du charbon actif et sa chimie de surface.

Les principales interactions entre l'adsorbat (substrat que l'on souhaite isoler) et l'adsorbant (en l'occurrence les grains de charbon actif) sont régies et catégorisées par deux phénomènes : la physisorption et la chimisorption. La première étant moins efficace et moins permanente que la deuxième car intervient grâce aux forces de Van Der Waals qui bouleversent la configuration électronique du substrat. A la différence, les molécules dites chimisorbées sont liées de manière covalente à l'adsorbat grâce à la formation d'un complexe, leur désorption est donc rendue beaucoup plus difficile (Dutta et al. 2019). La chimisorption a lieu de manière privilégiée sous certaines conditions : haute température de réaction avec un adsorbat qui possède une haute température d'ébullition, disponibilité d'analytes avec des groupements fonctionnels donneurs d'électron comme les groupes hydroxyle ou amine permettant d'observer des interactions de type π - π (Tanthapanichakoon et al. 2005). On observe également des interactions électrostatiques ou hydrophobiques et la formation de liaisons hydrogène.

Il apparaît que la formation de complexes soit plus favorable entre le substrat et le charbon actif si le substrat est un composé de haut poids moléculaire. En effet, sa désorption requière beaucoup plus d'énergie qu'une petite molécule et il a été observé au cours d'un cycle d'adsorption que les molécules de faible masse molaire laissent place aux molécules de haut poids moléculaire (H. Wang et al. 2012). Les molécules de haut poids moléculaire viennent donc obstruer les pores du charbon actif. Il est connu que la masse molaire d'un composé ainsi que sa polarité jouent un rôle majeur dans sa capacité à être adsorbé par du charbon actif (Baquero 2007). La taille de la molécule à adsorber est un point clé car elle doit être assez petite pour se loger dans les micropores du charbon actif, et parallèlement selon plusieurs études, plus la taille du composé organique est grande (dans la limite de la taille des pores de l'adsorbat) plus l'adsorption est favorisée. Il faut également mentionner que la mobilité des petites molécules dans le solvant est plus grande et donc elles sont souvent adsorbées en premier. Il faut savoir que la solubilité du substrat est également essentielle, plus il sera soluble donc aura une grande affinité au solvant, moins il sera facilement adsorbé. C'est pourquoi plus la concentration du soluté est grande dans le solvant plus il est recommandé d'utiliser une grande surface spécifique de charbon actif (Baquero 2007). On peut donc comprendre que la taille et la masse molaire du substrat influent à la fois sur son accessibilité et la cinétique d'adsorption, sa solubilité impacte les interactions hydrophobes avec le charbon actif et enfin son pKa régit ses propriétés de dissociation donc la forme acide ou basique qu'il prend en fonction du pH du solvant et donc sa capacité à être donneur ou accepteur d'électrons (Terzyk 2004).

La purification d'hydrolysats de bois par adsorption sur charbon actif est utilisée depuis une trentaine d'année mais a été limitée par la difficulté à recycler le charbon. Historiquement on utilisait des solvants pour désorber les molécules fixées au charbon actif (Cooney, Nagerl, et Hines 1983), de récentes techniques de régénération hydrothermales permettent de rendre son utilisation viable (Ledesma et al. 2014; Gütsch et Sixta 2012). En comparaison à d'autres techniques de purification telles que la précipitation, l'alcalinisation, l'extraction liquide liquide... l'adsorption sur charbon actif présente donc aujourd'hui une plus grande efficience économique et 너 écologique. L'objectif de l'ajout de charbon actif aux hydrolysats de bois est de retirer N par adsorption plusieurs contaminants dont la majeure partie se trouve être la lignine soluble, certains extractibles, le furfural, l'hydroxyméthylfurfural, les acides organiques tels que l'acide formique, acétique ou encore lévulinique. Certains charbons actifs sont donc sélectionnés pour leurs affinités particulières aux composés phénoliques (Mu'azu et al. 2017). Mais aussi avec d'autres composés comme la lignine soluble, l'acide hydroxybenzoique, les syringaldéhydes, le guaiacol et la vanilline (Yu Zhang et al. 2018). Il se trouve que le charbon actif a aussi une affinité plus ou moins grande avec les oligosaccharides d'hémicelluloses solubles (Z. Wang et al. 2016), et dans une moindre mesure les monosaccharides. Tout l'enjeu de l'utilisation de cette technique réside donc dans la maîtrise de la compétitivité d'adsorption entre les molécules que l'on souhaite retirer et celles que l'on souhaite conserver.

En ce qui concerne le choix de la méthode, il existe aujourd'hui plusieurs façons d'appliquer un traitement au charbon actif aux liqueurs de bois :

- Agitation en contact continu à température ambiante (20-35°C) avec des concentrations en charbon actif allant de 0,5 à 100 g.l⁻¹ et des temps de réaction allant de 30 min à 24h (Z. Wang et al. 2016; Villarreal et al. 2006; McDonald-Wharry 2010; Mateo et al. 2013; Yu Zhang et al. 2018; Montané et al. 2006; Dornath et Fan 2014)
- Passage sur lit fixe fluidisé rempli de charbon actif (Montané et al. 2006; Sainio, Turku, et Heinonen 2011; Lee et Park 2016)
- Technique développée récemment nommée procédé HITAC (hightemperature adsorption on activated charcoal) permettant une adsorption à haute température (150 à 170°C) directement après autohydrolyse (sans refroidir l'hydrolysat) plus sélective envers la lignine et plus efficace (Gütsch et Sixta 2011b)

La granulométrie choisie diffère en fonction de la technique utilisée, c'est-àdire la taille des grains de charbon actif. Il faut savoir que les granulés de charbon actif sont à la fois adaptés à un contact continu, méthode pour laquelle l'adsorption est plus efficace qu'avec de la poudre de charbon actif, et aussi à une configuration sous forme de colonne (lit fixe), ce qui n'est pas le cas pour la poudre (Suhas, Carrott, et Ribeiro Carrott 2007). De plus, la granulométrie du charbon actif impacte sa capacité à être régénéré, en effet des granulés seront plus facilement recyclables que de la poudre. C'est pourquoi, dans cette présente étude, seuls des granulés de charbon actif seront utilisés plutôt que de la poudre (cf. Chapitre Matériels et Méthodes).

Toutes ces études convergent vers plusieurs constats, tout d'abord, il est mis en évidence que plus la surface spécifique des grains de charbon actif est grande, plus l'adsorption est grande, c'est-à-dire par exemple privilégier un charbon actif à 1000 plutôt que 600 m².g⁻¹. Concernant la température, il a été montré que des températures trop élevées nuisent à l'adsorption des composés furaniques et phénoliques (Dornath et Fan 2014), c'est pourquoi l'efficacité du procédé HITAC reste encore à démontrer. Il a également été observé qu'un pH acide est favorable à l'adsorption de composés phénoliques et notamment de la lignine (Montané et al. 2006; Gütsch et Sixta 2011a). En termes de nature de charbon actif utilisé pour la détoxification des hydrolysats de bois, on retrouve souvent des granulés Norit de type Darco soit provenant de lignite soit de bitume, dans les tailles suivantes : 12x20, 10x20, 12x40 mesh, avec une surface spécifique comprise entre 500 et 650 m².g⁻¹ (Gütsch et Sixta 2011a), (Montané et al. 2006). Plusieurs études utilisent aussi du charbon actif Norit sous forme de poudre de 100 mesh de diamètre (Lee et Park 2016; Z. Wang et al. 2016). Enfin, de manière générale on peut définir une concentration à 40g.l⁻¹ pour 1 h de contact comme étant des valeurs médianes de conditions de réactions, et suffisantes pour éliminer plus de 80% des principales impuretés (lignine soluble, furfural et hydroxyméthyfurfural). On observe que la sélectivité envers la lignine et les composés phénoliques en général diminue avec l'augmentation de la charge en charbon actif appliquée dans les liqueurs, c'est pourquoi il est préférable, si l'on souhaite retirer 100% de la lignine par exemple, d'avoir recourt à des résines de type zéolite ou amberlite plutôt que d'appliquer des concentrations en charbon actif plus élevées (Zheng et al. 2018; Oriez, Peydecastaing, et Pontalier 2019). En effet, une concentration en charbon actif de 100 g.l⁻¹ engendre des pertes en oligosaccharides pouvant atteindre 80%, alors qu'une résine n'engendrera pas plus de 20% de perte.

I.D.1.b. RESINES POLYMERIQUES

Les résines polymériques (ultra réticulés composées de polystyrène divinylbenzene) de type Amberlite (XAD) au même titre que le charbon actif sont souvent utilisées pour retirer tout ou partie de la lignine soluble dans les liqueurs de bois, qu'il s'agisse de fragments ou de monomères ou encore de complexes lignine hydrate de carbone (Giummarella et al. 2016; Heinonen et al. 2017; C. Huang et al. 2016) ou tout composé de type polyphénolique (Kammerer, Kammerer, et Carle 2019), (Pinto et al. 2017). Elles sont connues pour leur grande sélectivité et leur hydrophobe. L'emploi d'une résine Amberlite XAD caractère 16N est particulièrement adaptée à la purification d'hydrolysat de plante (Miscanthus × giganteous) pour la production de xylo-oligosaccharides en vue d'une application prébiotique (Hong et al. 2019). De la même manière les résines de type zéolite servent aussi à retirer les composés furaniques tels que le furfural ou l'hydroxyméthylfurfural, ou encore dans une moindre mesure des petites acides organiques (acétique, formique, lévulinique...) (Zheng et al. 2018; Oriez, Peydecastaing, et Pontalier 2019).

I.D.2. PRECIPITATION PAR SOLVANT

Il existe différents types de mélange de solvants utilisés pour précipiter les oligosaccharides d'hémicelluloses contenus dans les liqueurs de bois, le plus couramment étudié est l'éthanol. Le principe consiste à ajouter en milieu aqueux, un solvant dans lequel les oligosaccharides sont insolubles. Ainsi le produit désiré voit sa solubilité diminuer drastiquement. Les saccharides sont des molécules polaires. L'eau, pour exemple de solvant polaire, vient stabiliser les interactions entre les saccharides et les molécules qui le composent, à l'inverse des solvants de type organique (acétone, éthanol, méthanol). Les galactoglucomannanes peuvent être purifiés par précipitation graduelle à l'éthanol, dans des ratios volumiques tels que 15, 60 ou 90%, selon l'intervalle de masses molaires à isoler (Xue et al. 2012). Cette étude montre que plus la concentration en éthanol est élevée plus la masse molaire moyenne des mannanes précipités est faible (de 80 kDa à 15% d'éthanol à 17 kDa à_

54

90%). La précipitation à l'éthanol a été très étudiée de manière générale et avec des ratios eau : éthanol très éloignés (Song, Pranovich, et Holmbom 2013; Reyes et al. 2013). Les principaux facteurs affectant la solubilité et donc le résultat de la précipitation sont la concentration en oligosaccharides dans le milieu et la concentration du solvant utilisé (Sen et al. 2011). La précipitation à l'éthanol permet d'isoler des oligosaccharides, voire des polysaccharides (le plus souvent des mannanes) de haute masse moléculaire (Deloule 2017) bien qu'une étude ait déjà rendu possible la précipitation d'arabinoxylo-oligosaccharides de bois feuillus compris entre 300 et 2000 Da à 90% d'éthanol (Swennen et al. 2005). A la différence d'un mélange acétone : méthanol (9 :1) qui permet de purifier des oligomères de faible degré de polymérisation (3, 4 et 5) à partir d'une liqueur de bois résineux (Boiron 2012). La précipitation est souvent combinée à l'ultrafiltration afin d'isoler des fractions de manière plus précise, de retirer certaines impuretés et de concentrer un mélange (Pranovich, Holmbom, et Willför 2016), (Swennen et al. 2005), (Feng et al. 2009).

I.D.3. FILTRATION MEMBRANAIRE

Un autohydrolysat de bois est une solution contenant des monosaccharides et des oligosaccharides de différentes tailles, natures chimiques, et masses molaires. C'est donc un mélange très polydisperse qui contient également des impuretés (composés organiques de faible masse molaire). Le principe est de séparer les saccharides en fonction de leur masse molaire et de leur taille, en utilisant des membranes avec des tailles de pore plus ou moins grandes. On peut donc distinguer une nanofiltration, utilisant une membrane avec un seuil de coupure défini comme inférieur à 500 Da, d'une ultrafiltration qui couvre des seuils supérieurs.

Les principales caractéristiques physicochimiques intrinsèques à la liqueur de bois étudiée pouvant affecter la séparation membranaire sont (Pinelo, Jonsson, et Meyer 2009) :

- la solubilité ou le caractère hydrophile des saccharides, par exemple les monosaccharides sont plus solubles que les oligosaccharides dans l'eau, eux-mêmes plus solubles que des polysaccharides (s'ils sont de même nature)
- le degré de substitution, la nature des groupements substitués et la ramification des oligosaccharides étudiés. Le volume hydrodynamique en solution d'un oligomère comportant un certain nombre d'unités osidiques sera différent s'il est substitué avec des fonctions acides ou encore s'il est linéaire ou ramifié
- la viscosité de l'hydrolysat, en partie définie par sa concentration en saccharides

Quant aux facteurs influençant la filtration cette fois ci choisis, on compte le pH, la pression, la température. De nombreux modèles tentent de décrire le comportement des solutés et des membranes en fonction de ces différents paramètres. La description des interactions entre soluté, solution et membrane souvent régis par les principes du transfert de masse et de mécanique des fluides sont difficiles à comprendre dans leur ensemble, à l'échelle méso comme nanoscopique (Pinelo, Jonsson, et Meyer 2009).

Il existe deux catégories de filtration membranaire : la filtration frontale et tangentielle. La filtration frontale (procédé discontinu) est souvent utilisée en laboratoire pour des petites quantités (jusqu'à 1 litre de liqueur), alors que la filtration tangentielle a été développée pour une échelle pilote et industrielle (Ramaswamy et Marcotte 2005). Une configuration tubulaire en filtration tangentielle continue est le procédé le plus adapté pour des guantités industrielles d'hydrolysat. Un des principaux désavantages de la filtration frontale réside dans une séparation incomplète entre oligosaccharides et monosaccharides malgré les pressions appliquées relativement élevées, des études montrent tout l'avantage d'une nanofiltration tangentielle pour la purification d'oligosaccharides notamment issus de xvlanes obtenus par autohvdrolyse (Goulas et al. 2002; Vegas et al. 2006). C'est pourquoi il est intéressant d'utiliser une nanofiltration frontale pour concentrer une solution de sucres en amont d'une précipitation (Feng et al. 2009). De nouveaux fabricants ont pris le relais concernant la production de membranes destinées à la nanofiltration face à l'abandon de Merck Millipore sur le sujet, une étude pertinente en décrit les caractéristiques et la performance (Artug et al. 2007).



FIGURE 29 SCHEMA DE PROCEDE MULTI-ETAPES PAR FILTRATION MEMBRANAIRE D'UN AUTOHYDROLYSAT (GONZALEZ-MUÑOZ ET AL. 2013)

L'utilisation de la filtration membranaire a été très étudiée comme technique de purification des hydrolysats de bois mais également en bioraffinerie en général. La microfiltration et ultrafiltration sont connues comme outils de récupération des galactoglucomannanes issus de bois ou de pâte de bois d'épicéa de Norvège (S

Willför et al. 2003a), (Stefan Willför et al. 2008). L'utilisation de membranes en kDa) assez classique cellulose régénérée (5 est pour purifier des galactoglucomannanes contenus dans les liqueurs de bois, avec une séparation complète entre oligosaccharides et monosaccharides grâce à une ultrafiltration frontale (Al Manasrah et al. 2012). De manière générale ce type de membranes ne supporte pas une température supérieure à 80°C et est étudié pour fonctionner à un pH compris entre 2 et 13. Dans cette étude on observe que cet outil permet de séparer partiellement les xylanes des mannanes, ainsi que de retirer une partie de la lignine soluble contenue dans les hydrolysats. L'ultrafiltration par centrifugation avec des membranes en polyéthersulfone avec des seuils allant de 3 à 300 kDa a fait l'objet d'une comparaison à de la précipitation à l'éthanol pour la séparation de galactoglucomannanes dans des hydrolysats d'épicéa (Song, Pranovich, et Holmbom 2013). En ce qui concerne l'échelle industrielle, la récupération des mannanes d'hémicelluloses de bois est réalisable grâce à l'ultrafiltration des effluents du procédé de mise en pâte mécanique d'épicéa (Stefan Willför et al. 2003).

Une étude utilise de la diafiltration (frontale) en série avec plusieurs étapes, grâce à des membranes allant de 300 à 10 000 Daltons pour le fractionnement d'oligosaccharides issus d'autohydrolysat de Pinus pinaster (González-Muñoz et al. 2013). Le schéma du procédé est présenté Figure 29. La filtration membranaire a un double rôle en tant qu'outil de purification des liqueurs de bois, il sépare les saccharides des impuretés de plus faible ou de plus haute masse molaire et fractionne également les oligosaccharides entre eux en fonction de leur masse molaire, mais aussi de leur taille. Dans ce contexte il est donc important de citer récupération l'utilisation d'une telle technique pour la et séparation d'oligosaccharides et de composés phénoliques également valorisables (Pinto et al. 2017).

I.D.4. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Le fractionnement des oligosaccharides par chromatographie liquide constitue une des étapes finales de purification des hémicelluloses du bois, car il s'agit d'une méthode qui permet d'isoler des fractions d'oligomères pures, en comparaison aux techniques présentées précédemment (Fengel et Wegener 1984; Browning 1967). Cette technique inclue deux catégories : la chromatographie d'échanges d'anions ou d'exclusion par la taille (Peng et al. 2012). La chromatographie ionique est par exemple utilisée pour isoler les arabinoxylanes acides solubles en milieu alcalin (éluant : NaOH ou NaCl) grâce à l'emploi d'une colonne en diéthyle aminoéthyle avec laquelle ce type d'oligosaccharide a une affinité (M. S. Dupont et Selvendran 1987), (Eero Sjöström 1993). La purification par échange cationique et anionique est également employée pour le fractionnement de galactoglucomannanes acétylés d'épicéa (J. Sjöström 1990; Thornton et al. 1994). Cette technique est aussi très connue pour le dessalage de solution aqueuse contenant des oligosaccharides. La force de cette technique réside dans l'élimination des impuretés de type lignine, extractibles ou composés lipophiles des liqueurs plutôt que dans la séparation des oligosaccharides entre eux (Stefan Willför et al. 2008), c'est d'ailleurs pour ce type d'application que la mise à l'échelle industrielle a été étudiée (Stefan Willför et al. 2003).

La chromatographie d'exclusion stérique (ou à perméation de gel) est plutôt utilisée pour fractionner les oligosaccharides en fonction de leur masse molaire et de leur volume hydrodynamique, comme la filtration membranaire mais de manière plus précise (Stefan Willför et al. 2008). Il existe différentes échelles de purification, définies par le diamètre et la longueur des colonnes utilisées. Plus la colonne sera grande plus la quantité de produit à purifier sera importante. On trouve de la purification d'oligosaccharides à l'échelle analytique (Teleman et al. 2000), semi-préparative (Liang et al. 2015), à l'échelle préparative (Djordjevic, Batley, et Redmond 1986) (Hicks et Sondey 1987), (M Palm 2004) c'est-à-dire jusqu'au gramme de produit, et à l'échelle industrielle. Cette technique de purification est historiquement utilisée pour des applications pharmaceutiques et dans le secteur de la santé et l'agroalimentaire en général. Elle est donc particulièrement adaptée à la production du fractionnement souhaité sont le type de gel et la taille des pores du gel.

Les gels les plus connus sur le marché pour la séparation d'oligosaccharides aujourd'hui sont les gels Sephadex, Superdex, Shodex, ce dernier a été employé à l'échelle analytique pour la séparation de charges d'oligosaccharides d'épicéa obtenus par traitement aux micro-ondes (Jacobs et al. 2002). Les gels Bio-Gel sont aussi très utilisés pour la séparation de molécules de petite taille. Les gels HW de chez Toyopearl, notamment le HW 40 S, utilisé pour la purification d'oligosaccharides d'arabinoxylanes (Shiiba et Hara 1998) ou de galacto-oligosaccharides (Sims, Craik, et Bacic 1997) sont connus pour la production et la purification de prébiotiques. Ils diffèrent principalement par leur procédé de synthèse, ce sont des lits de polymères réticulés souvent obtenus par copolymérisation et disposés sous formes de billes microscopiques.

Par exemple, les gels Bio-Gel sont constitués de polyacrylamide alors que les gels HW de Toyopearl sont composés d'acide polyméthacrylique hautement fonctionnalisé de groupements hydroxyles. Si on compare ces deux résines, elles sont toutes les deux très hydrophiles et offrent une grande résolution de séparation : le pic correspondant à chaque masse molaire (pouvant inclure plusieurs oligosaccharides) est bien défini en dessous d'un certain seuil au-delà duquel il n'y a plus de résolution. Néanmoins le gel HW de Toyopearl offrira une plus grande résistance mécanique et supportera mieux la pression, et donc de plus grands débits d'éluant grâce à sa structure, en comparaison au Bio-Gel. A l'image de ce dernier, les gels Superdex, constitués de polymères de dextran et d'agarose hautement réticulés, sont souples et flexibles. Quant à la taille du gel, on peut généralement séparer des molécules allant d'une masse molaire de 10² à 10⁶ Daltons.

Les méthodes employées consistent globalement à cibler un intervalle de taille raisonnable dans lequel se trouvent la ou les molécules à purifier et adapte donc le nombre et la taille des colonnes à utiliser en série ou seules pour ce faire. La détection se fait en général par réfractométrie (par différence entre l'éluant et le soluté) et dans la plupart des études l'élution se fait en eau déionisée ou MilliQ, qu'il s'agisse d'une séparation comme d'un simple dessalage.



CHROMATOGRAMME 1 OBTENU APRES SEPARATION PAR PERMEATION DE GEL ET DETECTION REFRACTOMETRIQUE SUR COLONNE BIO-GEL P-2 DE GALACTO-OLIGOSACCHARIDE (CAPEK ET AL. 2000)

Les exemples les plus marquants pour cette étude trouvés dans la littérature sont la séparation d'oligosaccharides de galactoglucomannanes solubles de bas degré de polymérisation (entre 1 et 9) sur colonne Bio-Gel P-2 (Capek et al. 2000; Thomas et al. 1987), obtenus par extraction alcaline de sciure de bois d'épicéa (cf. Chromatogramme 1). La séparation entre arabinoxylanes chargés d'acides méthylglucuroniques et neutres a été réalisée sur une colonne Bio-Gel P-6 à partir d'un hydrolysat d'olives (Reis et al. 2003). On a aussi observé l'emploi du gel Superdex S30 (limite de fractionnement à 10 kDa) pour retirer les monosaccharides d'une liqueur obtenue par un traitement à la vapeur à 200°C pendant 2 min sur des copeaux d'épicéa imprégnés d'eau (M Palm 2004) à échelle préparative (diamètre de colonne 29 cm).

Enfin, la séparation entre xylo-oligosaccharides neutres et chargés de peuplier (Teleman et al. 2000) et galactoglucomannanes d'épicéa (Lundqvist et al. 2003) a été obtenue à l'aide d'un montage FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) constitué d'une pré-colonne en série avec une colonne Superdex 75 et une Superdex 200, avec une élution en eau. Le gel Superdex 200 a une limite d'exclusion à 600 kDa et le Superdex® 75 à 70 kDa. Le chromatogramme obtenu par chromatographie d'exclusion par la taille sur le système cité ci-dessus en eau MilliQ de l'étude de Teleman est présenté Chromatogramme 2. On observe bien une séparation entre deux larges pics obtenus par réfractrométrie (trait plein), nommé fraction 2 et 3 (co-éluées) et fraction 10, correspondant respectivement aux xylanes chargés élués en premier et neutres élués dans un second temps, du fait de leur plus faible volume hydrodynamique.



CHROMATOGRAMME 2 OBTENU APRES SEPARATION DE XYLO-OLIGOSACCHARIDES DE PEUPLIER PAR EXCLUSION STERIQUE COUPLEE A UN DETECTEUR REFRACTOMETRIQUE (TRAIT PLEIN) SUR DEUX COLONNES SUPERDEX (S200 ET S75 EN SERIE) (TELEMAN ET AL. 2000)

Ces techniques sont dites à lit fixe, conventionnel, d'autres méthodes de purification chromatographiques ont été rapportées : la chromatographie continue annulaire préparative pour la purification de plusieurs grammes de fructooligosaccharides ou encore la chromatographie de partition par centrifugation pour le fractionnement de xylanes de boulot (Finke et al. 2002; Lau 2012).

I.E. METHODES ANALYTIQUES POUR LA CARACTERISATION DES HYDROLYSATS DE BOIS PURIFIES

Il existe plusieurs stades de purification, selon les caractéristiques des molécules à isoler. Les différentes méthodes de purification décrites dans la partie précédente peuvent servir à la séparation entre sucres et impuretés, mais aussi entre sucres de différentes natures et structures. Ces étapes sont nécessaires à l'analyse et la caractérisation de tout ou partie des monosaccharides, oligosaccharides et polysaccharides contenus dans les liqueurs de bois. Il peut être nécessaire d'employer plusieurs techniques afin de déconstruire complètement le ou les polysaccharides à étudier et pouvoir l'analyser entièrement. Plusieurs stratégies ont été mises en place, notamment grâce à des méthodes destructives, afin de déterminer la composition osidique, la position des liaisons glycosidiques entre monomères et la configuration des atomes engagés dans ces liaisons, la quantité, l'occurrence et la position des groupes fonctionnels de substitution des polysaccharides (leurs ramifications), et enfin leur taille et leur masse molaire (Q. Guo, Ai, et Cui 2018). Autrement dit, il existe tout un panel de techniques analytiques utilisées et développées pour la caractérisation des sucres du bois, comme les polysaccharides d'hémicelluloses, une liste non exhaustive est présentée dans cette partie (cf. Figure 30).



FIGURE 30 SCHEMA ORGANISATIONNEL STRATEGIQUE GLOBAL DE CARACTERISATION DES POLYSACCHARIDES (Q. GUO, AI, ET CUI 2018)

I.E.1. CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE

La chromatographie est un outil qui permet de séparer les hydrates de carbone en fonction de leur nature chimique et de leur taille. Le principe de cette technique est basé sur l'interaction entre les hydrates de carbone, une phase dite stationnaire et une phase dite mobile. La phase stationnaire constitue une colonne chromatographique, et la phase mobile est représentée par l'éluant qui peut être liquide ou gazeux. Les saccharides migrent à travers la phase stationnaire grâce au transport imposé par le débit de l'éluant sous pression. On parle de chromatographie d'échelle analytique car la pression appliquée sur les colonnes peut atteindre jusqu'à 400 bars, les quantités de soluté injectées sont de l'ordre du microgramme et l'élution ne dure en général pas plus de trois heures. Les phases mobiles peuvent être des solvants polaires ou apolaires, ainsi les composés hydrophiles ou hydrophobes seront attirés ou repoussés. Les phases stationnaires sont généralement constituées d'une résine polymérique sous forme de lit qui peut être inerte, fonctionnalisée ou greffée.

Les propriétés physicochimiques des phases stationnaires et mobiles déterminent leur affinité au soluté (échantillon à analyser). L'affinité plus ou moins grande du soluté avec la phase stationnaire détermine son temps de rétention. Le temps de rétention est la réponse unique d'un composé chimique et permet donc sa différenciation. En d'autres termes il s'agit du temps nécessaire à cette molécule pour être exclu de la colonne chromatographique. Une fois que le composé est sorti, il est dit élué, il arrive devant un détecteur, dont le signal permet d'obtenir un chromatogramme, comme présenté Chromatogramme 3 (E. Sjöström et Alén 1999).



CHROMATOGRAMME 3 EXEMPLE TYPIQUE DE CHROMATOGRAMME OBTENU PAR UNE CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE DES SUCRES DU BOIS (EXTRAIT DE PATE KRAFT DE RESINEUX) (E. SJÖSTRÖM ET ALEN 1999)

Il existe différents moyens de détection adaptés à la nature de la phase stationnaire et de la phase mobile, mais également de la molécule à analyser. De manière générale, la quantification d'un composé passe par la détermination de l'aire sous le pic correspondant à son temps de rétention. Et dans tous les cas, il est nécessaire de réaliser une gamme étalon de composés standards pour une calibration.

I.E.1.a. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE D'ECHANGE D'IONS (HPAEC - PAD) POUR LA QUANTIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES ET DES MONOSACCHARIDES

La chromatographie d'échange d'ions est basée sur l'attraction des charges contraires. Les résines échangeuses d'anions comportent donc des groupes fonctionnels de charges positives et de cations des charges négatives. Cette méthode permet donc de séparer des espèces à l'état ionisé. Le soluté est rendu ionique grâce au pompage d'un éluant de type tampon qui régule le pH. Il s'agit d'une compétition d'affinité entre les contres charges apportées par le solvant et les charges du soluté avec la phase stationnaire. Les interactions mises en jeu sont principalement électrostatiques. Il est possible d'utiliser un éluant de concentration constante (élution isocratique) lorsque la différence de pKa entre espèces est significative. On peut aussi éluer avec un gradient de pH pour permettre de décrocher successivement les ions qui interagissent trop fortement avec la phase stationnaire et ne seraient pas exclus autrement. L'échange d'ion est généralement pour la quantification des monosaccharides. Concernant donc les utilisé oligosaccharides d'hémicelluloses du bois solubles, une hydrolyse totale est donc nécessaire en amont de l'analyse et peut-être réalisée par différents moyens (acide sulfurique, hydrochlorique, trifluoroacétique) (Capek et al. 2000). Il faut évidemment tenir compte des produits de dégradation engendrés par cette hydrolyse et donc l'adapter pour éviter une perte de certains monosaccharides si l'on souhaite effectuer une quantification.

La quantification par séparation des monosaccharides (neutres et acides) d'hémicelluloses rendus anioniques à pH basique (éluant alcalin KOH ou NaOH) sur des résines polystyréniques fonctionnalisées d'ammonium quaternaires (résine forte) est une des méthodes les plus employées aujourd'hui (Q. Guo, Ai, et Cui 2018; E. Sjöström et Alén 1999). Une détection particulièrement adaptée à cette méthode chromatographique est l'ampérométrie pulsée. Cette détection électrochimique consiste à rendre cationique une électrode d'or grâce à un potentiel positif imposé et ainsi forcer l'oxydation des saccharides (De Ruiter et al. 1992). Il s'agit d'un des moyens de détection les plus précis (au ng).

I.E.1.b. CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE D'ADSORPTION (GC - FID) POUR LA QUANTIFICATION DES MONOSACCHARIDES NEUTRES ET ACIDES ET LA DETERMINATION DES LIAISONS OSIDIQUES

Cette technique consiste à faire migrer à travers une colonne des monosaccharides rendus volatils par dérivatisation, grâce à un gaz (le plus souvent de l'hélium pur ou de l'hydrogène) qui sera considéré comme la phase mobile. Un gradient de température est d'abord appliqué à la colonne puis la chromatographie s'effectue à haute température (jusqu'à 290°C), cette dernière est limitée par la dégradation de la colonne elle-même et des produits à analyser. La méthanolyse des hémicelluloses, hydrolyse acide en présence de méthanol, lors de laquelle des méthylglycosides (on observe également une méthylestérification sur les carboxyles des acides uroniques) sont libérés, est à effectuer en amont de la chromatographie. La dérivatisation consiste ensuite en une silvlation des monosaccharides, et plus précisément une trialkylsilylation où l'alkyle utilisé est un méthyle. Le proton des groupes hydroxyles des méthylglycosides est remplacé par un groupement SiMe₃.(Jacobs, Larsson, et Dahlman 2001) Un détecteur à ionisation de flamme est généralement utilisé en sortie de colonne (E. Sjöström et Alén 1999). Cette méthode a été très utilisée pour la quantification de monosaccharides d'hémicelluloses (Polari et al. 2012; S Willför et al. 2003a; Kilpeläinen 2015). Elle est connue pour sa robustesse, le grand niveau de pureté de chaque fraction avec des pics très bien résolus et sa capacité à séparer les isomères de sucres (plusieurs pics pour un seul monomère). Une méthylation associée cette fois-ci à de la chromatographie en phase gaz couplée à un détecteur de spectrométrie de masse (non guantitatif) est utilisée pour déterminer le type de liaisons entre sucres en plus de leur ratio molaire (Q. Guo, Ai, et Cui 2018; S Willför et al. 2003a; Sundberg et al. 1996).

I.E.1.C. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A ECHANGE DE LIGAND (HPLC - RI - UV) POUR LA QUANTIFICATION DES PRODUITS DE DEGRADATION DES SUCRES (ACIDES ORGANIQUES, COMPOSES PHENOLIQUES, FURANIQUES ET CYCLIQUES)

La chromatographie haute performance à échange de ligand sur des résines de type styrène divinylbenzène sulfonées est basée sur la complexation des monosaccharides. On peut considérer la phase stationnaire comme une résine cationique, l'élution se fait en eau ou en acide diluée et plusieurs moyens de détections peuvent être utilisés. La spectrométrie UV-visible est utile pour les molécules qui absorbent dans cet intervalle de longueur d'onde et la réfractométrie basée sur le changement d'indice de réfraction entre l'éluant et le soluté et dont le 🐱 signal est proportionnel à la concentration en soluté. Cette technique est souvent utilisée pour la quantification des impuretés (Kilpeläinen 2015; Boucher, Chirat, et Lachenal 2014). Ce que l'on nomme ici impuretés a été déterminé plus haut et réunit les produits de dégradation des monosaccharides formés lors d'une autohydrolyse : furfural, hydroxyméthylfurfural, acide lévulinique, acide formique, acide acétique.

I.E.1.d. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A PERMEATION DE GEL OU EXCLUSION PAR LA TAILLE (HPSEC / HPGPC - RI - UV - MALS) POUR LA DETERMINATION DE LA MASSE MOLAIRE MOYENNE DES OLIGOSACCHARIDES EN MELANGE

Cette technique est basée sur la séparation des hydrates de carbone en fonction de leur taille et contrairement à celles présentées précédemment est utilisée pour la séparation des oligosaccharides comme des monosaccharides. Elle est apparue en 1959 avec la découverte d'un gel appelé Sephadex, en effet les gels obtenus par polymérisation d'agarose et de dextran sont préférés pour la séparation des hémicelluloses solubles (E. Sjöström et Alén 1999). Le degré de réticulation du polymère qui constitue le lit fixe de la colonne détermine la taille de ses pores. Le temps de rétention du soluté est alors moins basé sur son affinité chimique avec la phase stationnaire que sur son volume hydrodynamique et sa capacité à pénétrer ou non les macro et micropores du gel de la colonne. Plus les molécules sont grosses en solution, moins elles interagissent avec la phase stationnaire et plus vite elles en sont exclues.



FIGURE 31 DISTRIBUTION DE MASSE DES AUTOHYDROLYSATS DE BOIS FEUILLUS OBTENUS A DIFFERENTES TEMPERATURES : 130, 140, 150, 160 ET 170°C (MEHMET SEFIK TUNC ET VAN HEININGEN 2011)

L'ajout d'un détecteur à diffusion de lumière à trois angles, d'un détecteur réfractométrique et d'un viscosimètre en sortie de colonne permet le calcul de la masse molaire des oligosaccharides injectés dans la colonne. Le couplage de la chromatographie à perméation de gel avec plusieurs détecteurs est la méthode la plus utilisée pour la détermination approximative de la masse molaire des hémicelluloses solubles contenues dans les liqueurs de bois (Q. Guo, Ai, et Cui 2018; Mehmet Sefik Tunc et van Heiningen 2011; Reyes et al. 2013; Song et al. 2008). Comme on voit sur la Figure 31, la distribution de masses des hémicelluloses dans les autohydrolysats de bois est souvent large et illustre un milieu très polydispersé.

64

On observe également l'influence de la sévérité croissante du traitement (température allant de 130 à 170°C) sur la masse molaire moyenne qui a tendance à diminuer (Mehmet Sefik Tunc et van Heiningen 2011). De plus, la lignine soluble coélue avec les saccharides, c'est pourquoi le calcul de la masse molaire moyenne n'a pas vraiment de sens, à moins que des purifications successives soient appliquées à l'hydrolysat. Par exemple des précipitations graduelles à l'aide d'un ou plusieurs solvants (Pranovich, Holmbom, et Willför 2016), ou encore des filtrations membranaires sur différents seuils de coupure (Swennen et al. 2005), ou bien la combinaison de ces deux techniques de purification (Song, Pranovich, et Holmbom 2013) suivie d'une chromatographie à perméation de gel ou d'exclusion.

I.E.1.e. AUTRES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

L'électrophorèse capillaire basée sur une séparation électrochimique et cinétique d'un soluté à travers un tube placé entre deux solutions tampons sous l'action d'un champ électrique a été également très étudiée pour les mono et polysaccharides (Guttman 1997; Volpi, Maccari, et Linhardt 2008). Encore, la chromatographie de phase inverse qui met en jeu des interactions hydrophobes a aussi été très utilisée pour la séparation des sucres (Harazono et al. 2011). Néanmoins, il s'agit de méthodes nécessitant une longue et fastidieuse dérivatisation impliquant la mise en place de nombreuses réactions chimiques avec des produits dangereux pour l'environnement (Q. Guo, Ai, et Cui 2018), à l'image de la chromatographie en phase gaz.

I.E.2. SPECTROMETRIE

I.E.2.a. SPECTROMETRIE DE MASSE POUR LA DETERMINATION DE LA MASSE MOLAIRE EXACTE D'UN OLIGOSACCHARIDE ET DE SA COMPOSITION CHIMIQUE

MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION FOR IONIZATION TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY MALDI-TOF MS

Cette technique inventée dans les années 1980 est aujourd'hui un outil majeur pour la caractérisation des oligo et polysaccharides de quelque origine qu'ils soient (Tanaka et al. 1988; Karas, Bachmann, et Hillenkamp 1985; Handberg et al. 2015). L'utilisation d'une matrice est nécessaire à la bonne séparation des différents hydrates de carbone qui composent l'analyte ainsi qu'à leur ionisation grâce au transfert d'un proton ou d'un ion (K⁺, Na⁺, NH4⁺...). En général, après une co-cristallisation entre la matrice et l'échantillon à analyser, un laser infrarouge vient ioniser le tout sous forme de gaz, cf. Figure 32.

Les oligosaccharides « volent » ensuite dans un tube par lequel ils sont accélérés, c'est leur vitesse qui les distingue, elle-même proportionnelle à leur masse (ratio m/z, z étant la charge de l'ion). Le détecteur donne alors le spectre de masse des différents ions, les saccharides ont plutôt tendance à s'ioniser avec un atome de sodium Na⁺. C'est pourquoi au calcul des masses molaires de chaque pic est ajouté la masse du sodium (Harvey 1996).

On peut donc avoir accès à la composition osidique d'un oligosaccharide et au nombre de ses groupements fonctionnels et substituants. La taille maximale détectée avec cette méthode fait débat, de possibles fragmentations sont observées et il semble que cette technique soit limitée pour l'analyse de masses molaires supérieures à 300 kDa (Deery, Stimson, et Chappell 2001).



FIGURE 32 SCHEMATISATION D'UNE SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI MS DESSINEE PAR BRUKER

Le fractionnement par chromatographie d'exclusion ou échange d'anion suivi d'une spectrométrie de masse est souvent utilisé pour l'analyse des hémicelluloses. On observe le spectre de quatre fractions différentes de xylanes d'eucalyptus purifiés par Kabel Spectre 1 (Kabel, Schols, et Voragen 2001). De nombreuses études utilisent l'association de ces deux techniques (Reis et al. 2003), (Jacobs et al. 2002), (Jacobs, Larsson, et Dahlman 2001), (Lau 2012).



Spectre 1 obtenu par maldi ms de quatre fractions d'oligosaccharides de xylanes purifies par chromatographie a permeation de gel (kabel, schols, et voragen 2001)

ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY (ESI - MS)

Concernant la détection des petites masses molaires, les pics correspondants aux oligosaccharides sont souvent confondus avec les pics de la matrice en MALDI TOF MS, en général en dessous de 500 Da mais qui peut monter jusqu'à 1000 (S. Zhang et al. 2010). L'utilisation d'une ionisation par électrospray est plus adaptée à l'analyse des faibles masses car cette technique engendre une forte fragmentation des hydrates de carbone. C'est pourquoi elle sert majoritairement à l'analyse structurelle des monosaccharides et petits oligomères (E. Sjöström et Alén 1999).

I.E.2.b. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE POUR LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE, DE LA POSITION DES LIAISONS OSIDIQUES ET DE LA SEQUENCE D'UN OLIGOSACCHARIDE

L'étude des interactions électromagnétiques avec la matière utilise le phénomène de résonance magnétique nucléaire à des fins de caractérisation. Cette technique arrive en dernier lieu car son niveau de précision nécessite d'une part que l'analyte en question soit le plus pur possible et d'autre part qu'une bonne partie de ses caractéristiques physicochimiques soit déjà connue. Il convient d'employer cette méthode après ou en association avec celles précédemment décrites. La RMN est sans doute l'outil le plus développé et le plus puissant qui existe aujourd'hui pour déterminer la séquence d'un polysaccharide (Agrawal 1992; Bubb 2003), (Sims, Craik, et Bacic 1997). Il est très utilisé pour déterminer la structure des hémicelluloses, aussi bien de xylanes (Morais de Carvalho et al. 2017) que de mannanes (Xing et al. 2015), et notamment la conformation α ou β des monosaccharides, leur ratio molaire et la façon dont ils sont liés, leur degré de substitution...

La spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourier à des nombres d'ondes caractéristiques de la résonance des hydrates de carbone (950 à 1200 cm⁻¹) a également été utilisée pour la caractérisation d'hétéropolysaccharides solubles (Q. Guo et al. 2011; 2015). Son alliance à la RMN est parfois nécessaire.

I.E.2.C. SPECTROSCOPIE ULTRA-VIOLET (UV - VISIBLE SPECTROSCOPY) POUR LA QUANTIFICATION DE LA LIGNINE SOLUBLE

L'absorbance de la lignine est connue à 280 nm, on a donc longtemps quantifié la lignine par absorbance à cette longueur d'onde (G.S. Chua et Wayman 1979; INNVENTIA 2016; M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008). Cependant il se trouve que les composés de type furaniques comme le furfural absorbent également à cette longueur d'onde et interfèrent dans la mesure, il est donc préférable d'utiliser la norme TAPPI UM 250, qui mesure l'absorbance à 205 nm (Maekawa, Ichizawa, et Koshijima 1989; TAPPI 1991). Une étude a montré que la contribution du furfural à cette longueur d'onde est inférieure à 1% de la valeur donnée par la lignine, même à des conditions d'autohydrolyse sévères pour le mélange de bois feuillus également utilisé dans la présente étude (Guigon 2019). De manière générale, le pic d'absorbance maximum le plus haut de la lignine acide soluble, présente dans les liqueurs de bois, est située entre 200 et 205 nm, intervalle dans lequel la contribution du furfural et de l'hydroxyméthylfurfural est faible (E. Sjöström et Alén 1999). De plus, à 280 nm le deuxième maximum d'absorption de la lignine est beaucoup plus bas, c'est pourquoi à 205 nm une dilution est souvent nécessaire.

Les groupes acides 4-O-méthylglucuroniques peuvent également être quantifiés par colorimétrie (Blumenkrantz et Asboe-Hansen 1973) (Sanglard 2013) mais cette méthode ne permet pas de connaître leur liaison aux autres saccharides contrairement à la GC-MS. De plus il s'agit d'un protocole long utilisant beaucoup de produits chimiques. Enfin, le dosage colorimétrique Dubois est utilisé pour la quantification des saccharides solubles totaux, cependant cette méthode n'est pas pertinente étant donné que l'hydrolysat absorbe dans l'UV et le visible du fait de sa composition chimique et que l'on souhaite quantifier plus précisément la nature de chaque sucre.

CONCLUSIONS REVUE DE LITTERATURE

L'exploitation de la biomasse végétale prend de multiples formes et dépend de la ressource utilisée comme du produit fini. Les liqueurs de bois qui font l'objet de la présente étude sont obtenues par un procédé nommé autohydrolyse ou hydrolyse acide catalysée appliquée dans le cadre d'une bioraffinerie lignocellulosique en amont du procédé papetier. Ce procédé propre conduit à la solubilisation des oligosaccharides voire des monosaccharides issus des hémicelluloses grâce à leur propre acidité. Là encore, le choix de l'application dépend de la composition des hydrolysats, et donc des conditions d'extraction comme de l'essence de bois. Ces liqueurs complexes car également constituées de produits de dégradation et de lignine soluble et solide, nécessitent de nombreuses étapes de purification, pour leur propre caractérisation et l'isolation de biomacromolécules d'intérêt.

C'est grâce à la multiplication des techniques de purification (précipitation à l'éthanol et ultrafiltration étant les plus utilisées pour les autohydrolysats de bois aujourd'hui) et l'association des différentes méthodes analytiques que l'élucidation de la structure des oligosaccharides d'hémicelluloses est possible. La chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions et la chromatographie en phase gazeuse sont parmi les plus adaptées à l'analyse de la composition osidique de ce type d'échantillon. Pour connaitre la masse molaire, la structure et la séquence d'un oligosaccharide, on utilise en général de la chromatographie d'exclusion stérique puis de la spectrométrie de masse et infrarouge alliées à de la résonance magnétique nucléaire. L'analyse des impuretés d'un hydrolysat de bois passe aussi par de la chromatographie liquide d'exclusion d'ions et de la spectroscopie UV-visible. Deux exemples typiques de schéma de méthodes à suivre pour la purification et la caractérisation des hémicelluloses extraites par autohydrolyse, hydrolyse acide, traitement à la vapeur ou micro-ondes sont présentés Figure 33. Sur ces schémas on observe que Tunc (a) et Palm (b) ont utilisé une grande partie des techniques présentées dans ce chapitre (Mehmet Sefik Tunc et van Heiningen 2011; Magnus Palm et Zacchi 2003).

La voie d'extraction des hémicelluloses choisie dans ce projet est l'autohydrolyse, pour des raisons écologiques et économiques. Il s'agit bien du procédé le plus durable et le plus propre déjà appliqué à échelle industrielle et de manière intégrée, en termes de solubilisation d'hétéropolysaccharides issus du bois. C'est sans doute également, un des procédés qui, une fois optimisé, dégrade le moins les hémicelluloses. L'application majeure visée pour les oligosaccharides ainsi extraits dans ce contexte se niche dans le secteur pharmaceutique, nutraceutique et médical. En trame de fond vient la comparaison permanente entre essence de bois utilisée et sévérité d'autohydrolyse comme paramètres impactant la composition et les propriétés des liqueurs obtenues.



FIGURE 33 PRESENTATION DE DEUX ORGANIGRAMMES SOUS FORME DE SCHEMA DE PRINCIPE POUR L'EXTRACTION ET LA VALORISATION DES OLIGOSACCHARIDES D'HEMICELLULOSES GRACE A LA CARACTERISATION DES HYDROLYSATS DE BOIS (MEHMET SEFIK TUNC ET VAN HEININGEN 2011; MAGNUS PALM ET ZACCHI 2003)

Deux mélanges industriels de bois résineux et feuillus utilisés pour la production de fibres cellulosiques sont étudiés, ainsi que deux températures d'extraction, choisies par leur prépondérance dans l'industrie comme dans le milieu scientifique pour l'autohydrolyse des copeaux de bois. Nous souhaitons définir un modèle réunissant plusieurs techniques de purification et différentes méthodes d'analyse déjà connues. Ainsi, la conception d'une approche de caractérisation globale et adaptée aux propriétés de chaque hydrolysat constitue le fil conducteur de ce projet.

En premier lieu est présentée l'étude de la nanofiltration et de l'ultrafiltration frontales sur membranes de cellulose régénérée, à différents seuils de coupure, des hydrolysats de bois. Ensuite vient le deuxième chapitre concernant la détoxification des liqueurs par adsorption au charbon actif, seule ou combinée à de la filtration membranaire, et leur modification par hydrolyse enzymatique. Enfin, la troisième partie porte sur les résultats expérimentaux de purification et de fractionnement des échantillons, obtenus grâce aux essais du deuxième chapitre, par chromatographie liquide d'exclusion stérique (gel filtration). Au fil des chapitres l'objectif est d'accroître la pureté d'un mélange ou d'une famille d'un ou plusieurs oligosaccharides différenciés par leur nature et leur structure chimique, leur taille et leur masse molaire.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

II.A. MATIERES PREMIERES

II.A.1. MELANGE INDUSTRIEL DE COPEAUX DE BOIS

Le bois de résineux utilisé pour cette étude a été fourni par l'usine Fibres Excellence de Tarascon (Bouches-du-Rhône, France), il s'agit d'un mélange composé à 35% de Pin Sylvestre, 24% de Pin Noir, 18% de Pin d'Alep, 16% de Pin Douglas et 7% d'Epicéa. Lucie Boiron et Jérémy Boucher ont étudié la composition de ce mélange de bois résineux durant leurs travaux de thèse au LGP2, présentée dans le Tableau 3 ci-dessous.

TABLEAU 3 COMPOSITION EN G POUR 100 G DE BOIS SEC DU MELANGE DE RESINEUX

	(Boucher, Chirat, et Lachenal 2014)	(Boiron 2012)
Cellulose	37,6 ± 0,7	39
Arabinoxylanes	6,9± 0,8	6,1
Galactoglucomannanes	14,6 ± 0,7	15,7
Groupes acétyles	1,3 ± 0,01	-
Lignine de Klason	27,9 ± 0,5	26,7
Lignine soluble	0,35 ± 0,02	-
Extraits	2,5 ± 0,5	2,5

Tandis que le mélange de bois feuillus constitué à 47% de peuplier (*Populus alba L.*), 24% de hêtre (*Fagus sylvatica L.*), 17% de chêne (*Quercus robur L.*) et 12% de châtaignier (*Castanea sativa Mill.*) provient de l'usine Fibres Excellence située à Saint Gaudens, France. Des travaux de thèse ont également été réalisés sur l'étude de la préhydrolyse du même mélange de bois feuillus précédemment au laboratoire par Hélène Curmi et Valentin Guigon. La Tableau 4 donne la composition en g pour 100g de bois sec, provenant directement de leur résultats expérimentaux.

TABLEAU 4 COMPOSITION EN G POUR 100 G DE BOIS SEC DU MELANGE DE FEUILLUS

	(Guigon 2019)	(Curmi 2018)
Cellulose	48,4 ± 2,4	47,8
Xylanes	18,9 ± 1,0	20,9
Glucomannanes	$6,2 \pm 0,3$	5,3
Groupes acétyles	3,1 ± 0,2	3,0
Lignine de Klason	23,7 ± 1,20	23,7
Lignine soluble	2,2 ± 0,1	3,3
Extraits	2,5 ± 0,1	2,0

73

La large distribution en taille des copeaux présente des dimensions hétérogènes qui varient entre 2 et 7 cm de longueur, 1 et 4 cm de largeur et 0,5 et 1,5 cm d'épaisseur. Les morceaux d'écorce et les nœuds présents dans le mélange peuvent altérer l'homogénéité de la réaction d'autohydrolyse, ces derniers ont donc été retirés à la main des lots utilisés. Ces mélanges industriels sont typiquement représentatifs de la matière première utilisée pour la production de pâte à papier et y sont d'ailleurs destinés.

Les copeaux ont été disposés dans des sacs plastique thermoscellés et congelés à -18°C à l'abri de l'humidité et de la lumière. La siccité de chaque lot a été systématiquement mesurée après décongélation lente et avant utilisation, en triplica selon la norme NF V 03–903.

II.A.2. PATE DE FEUILLUS BLANCHIE

La pâte de feuillus utilisée dans cette étude est composée de celullose à 76,3% et d'hémicellulose à 23,7%, parmi lesquelles on trouve 91,7% de xylanes et 8,3% de galactoglucomannanes et a également été fournie par Fibres Excellence en containeurs de 40kg humide. Cette pâte a été blanchie selon une séquence ODEDD et n'a pas été séchée. A réception la pâte a été lavée plusieurs fois et filtrée jusqu'à obtention d'une eau claire en sortie. A la suite de quoi elle a été centrifugée pour être stockée à une siccité comprise entre 30 et 40% dans des sacs plastique thermoscellés de 200g à -18°C.

II.B. PROCÉDÉS D'EXTRACTION

II.B.1. AUTOHYDROLYSE

Avant chaque extraction par préhydrolyse du bois, la siccité des copeaux humides est calculée en tripliqua selon l'équation (1). Les copeaux sont décongelés, puis placés à l'étuve à 105°C (par lot d'environ 30g) durant 24 et 48 h. Ainsi la siccité est calculée à deux temps de séchage pour s'assurer que les copeaux sont bien secs, il s'est avéré dans la plupart des cas que 24 h suffisent.

Siccité (%) =
$$100 \times \frac{Masse sèche}{Masse humide}$$
 (1)

Le lessiveur rotatif pilote ERTAM a été utilisé pour l'extraction solide liquide des hémicelluloses contenues dans le bois. Il est composé de six obus en acier inoxydable d'une contenance de 3,3 litres, chacun capable de supporter 8 bars de pression et équipé de thermomètres. Un bain d'huile thermorégulé dans lequel sont immergés les six obus en rotation permanente permet d'amener le réacteur à la température souhaitée. Ainsi, les six obus peuvent être utilisés en parallèle à condition que le profil de température choisi ainsi que leur masse soient identiques.

Chaque obus préalablement lavé et séché, est rempli de copeaux de bois humides (entre 150 et 300 g) et complété d'eau distillée en respectant un ratio liqueur sur bois (L/B) de 4 pour chaque essai (cf. équation (2)). La masse de liquide comprend l'eau présente dans les copeaux de bois humides préalablement calculée par différence de masse après séchage.

$$L/B (\%) = \frac{Masse \ de \ la \ phase \ liquide}{Masse \ de \ la \ phase \ solide}$$
(2)

Les obus sont ensuite scellés à l'aide de collier de serrage métallique afin d'être fermés hermétiquement par vissage pneumatique. Au temps t₀ le réacteur est à température ambiante. Une rampe de 30 min de montée est appliquée via un logiciel pour atteindre une température T_{Plateau} (°C), cette consigne est maintenue durant 60 min pour chaque extraction. Une fois que la réaction d'autohydrolyse a eu lieu le réacteur est refroidi, il faut attendre 30 min pour que la température du bain atteigne de nouveau 25°C. Le même profil de température est appliqué pour chaque extraction, seule T_{Plateau} prendra deux valeurs différentes : 150 et 170°C. Le pression à l'intérieur des obus est déterminée par la température de travail.

A la fin de chaque batch, les liqueurs (hydrolysats de bois) sont filtrées sur 0,2 µm et séparées des copeaux préhydrolysés, puis centrifugées trois fois à 4000 rpm durant 1 h, à l'aide d'un appareil SIGMA 3 – 16 P comportant 4 socles dans lesquels des récipients coniques avec couvercle à vis (et joint hermétique) sont introduits. Dans chaque cône doit être versée la même masse d'hydrolysat, afin que tous les supports (cône, couvercle et socle) pèsent la même masse, à 0,1 g près, de l'eau distillée peut être introduite entre le socle et le cône. Ces centrifugations successives ont été appliquées à chaque hydrolysat dans le but d'éliminer la lignine solide et les composés insolubles dans la liqueur. Les liqueurs sont stockées entre 2 et 5°C à l'abri de la lumière dans des bouteilles en verre fermées pour une utilisation sous 5 jours, pour une plus longue durée de conservation elles sont congelées à -18°C.

Le culot de centrifugation, constituant la partie solide de la lignine extraite, est récupéré pour être lyophilisé et pesé. Additionné à la masse sèche des copeaux préhydrolysés (une siccité en tripliqua a été effectuée sur les copeaux après autohydrolyse pour chaque batch), on peut déterminer la quantité totale de matière sèche après réaction. Selon l'équation (3), on obtient le rendement de préhydrolyse en divisant cette dernière par la masse sèche de bois initialement introduite dans le réacteur :

Rendement (%) =
$$100 \times \frac{Masse \ sèche \ après \ réaction}{Masse \ sèche \ avant \ réaction}$$
 (3)

Le Tableau 5 donne le récapitulatif de toutes les extractions réalisées, ainsi que le calcul du rendement (%). En premier lieu, six autohydrolyses de bois résineux ont été effectuées à 170°C afin d'observer la répétabilité de la réaction, suite au calcul du coefficient de variation (4%) il a été décidé de faire seulement quatre essais à 150°C (2,4%). Enfin, deux préhydrolyses uniques de bois feuillus sont réalisées à 150 et 170°C.

T _{Plateau} °C	Matière première	Rendement %
150	Mélange résineux	89,7
150	Mélange résineux	94,7
150	Mélange résineux	93,8
150	Mélange résineux	92,6
170	Mélange résineux	89,6
170	Mélange résineux	81,3
170	Mélange résineux	82,9
170	Mélange résineux	88,7
170	Mélange résineux	84,7
170	Mélange résineux	82,4
170	Mélange feuillus	82,3
150	Mélange feuillus	94,9

TABLEAU 5 RECAPITULATIF DES ESSAIS D'AUTOHYDROLYSE REALISES AVEC LE LESSIVEUR

II.B.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Ce travail a été fait en collaboration avec Jahan Golestani. Dans cette partie l'objectif est de couper aléatoirement les chaines d'hémicelluloses solubles présentes dans les hydrolysats de bois afin d'en diminuer le DP moyen à l'aide de deux enzymes. Une solution commerciale d'endomannanase (NS-51180, activité enzymatique : 0,06 MIUM/g) et une d'endo-1,4-xylanase (NS-51164, activité enzymatique : 5200 FXU/g). Les quantités d'enzymes appliquées pour ces traitements sont basées sur les recommandations de Novozyme, soit une concentration de 5µl de xylanase et 500µl de mannanase par gramme de masse sèche d'hémicellulose pure. Les conditions optimales pour ces enzymes se situent à une température de 75°C et un pH 6. Des essais préliminaires sur un hydrolysat de feuillus réalisés en 2018 ont amené à la conclusion qu'il serait intéressant de tester l'action simultanée des deux enzymes pour observer une éventuelle synergie.

L'hydrolysat de résineux brut extrait à 170°C (SW170), après centrifugation pendant 1h à 4200 tr.min⁻¹, a été filtré sous vide par Buchner avec un filtre à 0,2 µm puis lyophilisé afin de retirer la partie insoluble de la lignine et les solides en suspension. Le milieu réactionnel est constitué de 500 mg d'hydrolysat sec dans un volume total de 100 ml d'eau distillée, soit à une concentration de 5 g/l dans une bouteille en verre hermétique. Le pH est ajusté à 6 grâce à l'ajout de quelques gouttes de NaOH à 1M et la température du bain thermostaté dans lequel les bouteilles en verre fermées hermétiquement contenant le milieu réactionnel sont disposées est maintenue à 75°C. L'agitation magnétique est fixée à 100 tr.min⁻¹ afin d'éviter de casser ou de déstructurer les enzymes. Ici, la pureté en sucre de l'hydrolysat ayant été déterminée par GC FID à 60% (coefficient de variation 8%), la masse sèche de sucre d'hémicelluloses vaut 300mg. Ainsi, 1,5µl de solution de xylanase et 150µl de solution de mannanse ont été introduits dans le milieu réactionnel. A la fin du temps d'incubation (deux temps ont été sélectionnés : 15 min et 1h), les bouteilles contenant l'hydrolysat sont placées dans un bain marie porté à ébullition durant 15 min afin d'inhiber les enzymes et mettre fin à la réaction.

L'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C et ultrafiltré sur 500 Da a été également été traité mais selon un protocole différent. De ce rétentat a été éliminé 60% de la lignine soluble initiale dans l'hydrolysat et la quasi-totalité des monomères. Une filtration assez longue a permis d'éliminer 100% des autres composés inhibiteurs tel que les petits acides organiques, le furfural et l'hydroxymethylfurfural, afin d'optimiser l'action des enzymes. Les mêmes conditions de température, d'agitation, de concentration et de pH que celles décrites dans le paragraphe précédent ont été utilisées. La différence réside dans l'emploi séparé de chaque enzyme et le temps de réaction. Pour chaque temps de réaction, respectivement choisi à 10 min, 30 min, 1 h et 8 h, deux milieux réactionnels sont créés séparément, un avec la xylanase et un autre avec la mannanase, dans les mêmes concentrations que décrites afin d'éviter de perturber le milieu réactionnel.

II.C. PURIFICATION

II.C.1. ULTRAFILTRATION

Les autohydrolysats ont été ultrafiltrés afin de subir une séparation basée sur la masse moléculaire des oligosaccharides (Beaufils 2019), selon un procédé de diafiltration à volume constant. Pour ce faire, des membranes Ultracel de chez Merck Millipore (référence : YC05, diamètre : 63.5mm, CAT N° 13032) en acétate de cellulose à quatre seuils de coupure différents ont été utilisées : 500, 1000, 3000 et 5000 Da. Les filtrations sont toutes réalisées en dupliqua, dans les mêmes conditions. Pour la plupart des expériences, le rétentat est conservé pour analyse. Certains perméats sont réutilisés pour être ultrafiltrés et devenir à leur tour un rétentat : cette technique permet d'obtenir la fraction de l'hydrolysat filtré entre deux seuils de coupure membranaire. Ainsi, les hydrolysats bruts et traités au charbon actif ont subi une ou plusieurs filtrations.

Le dispositif comporte un contenant en inox de 5L avec une entrée reliée à un tuyau d'air comprimé dont la pression est fixée à 3 bars maximum et une sortie reliée à l'entrée de la cellule d'ultrafiltration d'une contenance de 200ml. Un bouchon présent sur le dessus de la cocotte joue le rôle de soupape, lorsqu'on veut « purger » l'appareil c'est-à-dire retirer l'air comprimé du système. Après avoir été remplie d'eau MilliQ, la cocotte doit être refermée avec son couvercle et joint étanche, et les tuyaux d'alimentation à l'aide d'une clé de serrage. La cellule d'UF est enfermée dans un socle en plastique, afin de maintenir l'étanchéité aussi bien au-dessus qu'en dessous de la membrane, et placée sous agitation à l'aide d'une pâle magnétique tournant à 375rpm. La pression pousse l'eau vers la cellule, il s'agit d'une ultrafiltration frontale. Pour concentrer le rétentat, solution surnageant la membrane, il suffit de court-circuiter le système qui fait entrer l'eau dans la cellule, afin d'y faire entrer directement l'air comprimé, sans passer par la cocotte (actionnement du bouton liquide→gaz).

Lors de l'allumage du système, il est nécessaire de se placer en gaz, pour ensuite ouvrir la vanne d'air comprimé, et constater l'écoulement en sortie de cellule avant de basculer en liquide. Cette action permet également de purger le système. Avant chaque filtration, le système est lancé avec une solution éthanol/eau dans un ratio volumique de 10% durant au moins 3 h. Malgré cette étape, certains échantillons de feuillus (autohydrolyse à 150°C) ont subi une contamination lors de leur filtration. Pour ce type d'échantillon il a donc été décidé d'ajouter de l'éthanol dans un ratio volumique de 5% à l'eau contenue dans le dispositif de filtration. Le niveau du rétentat dans la cellule d'ultrafiltration est régulièrement surveillé de sorte que le volume reste constant. Le pH en sortie de cellule est également mesuré à intervalles de 6h en moyenne. C'est lorsque ce dernier atteint au moins 5, ce qui correspond à 2 I de perméat et environ 3 jours de filtration en continu, que le dispositif est stoppé. Afin d'arrêter le dispositif, il faut passer en gaz, arrêter l'agitation, fermer la vanne d'air. Le joint piston (sous le couvercle supérieur de la cellule), doit être délicatement retiré, après avoir dévissé le tuyau d'arrivée d'air dans la cellule. Après chaque filtration l'ensemble du système est rincé à l'eau MilliQ. Les filtrations sont plus longues lorsque les seuils de coupure des membranes sont plus petits, notamment à 1 kDa et 500 Da.

II.C.2. TRAITEMENT AU CHARBON ACTIF

Du charbon actif granulé (CAS 7440440) a été ajouté à l'hydrolysat à hauteur de 30 et 50 g.l⁻¹, afin de le détoxifier en partie. Toutes les expérimentations ont été réalisées à température ambiante, durant 2 h, sous agitation magnétique. A la fin de chaque traitement le charbon actif est séparé de l'hydrolysat traité par trois centrifugations successives de 1 h à 4200 tours par minute, puis filtré sous vide par Buchner avec un filtre à 0,2 µm de taille de pores. Des essais préliminaires à 20 g.l⁻¹ ont été réalisés afin de tester quatre charbons actifs différents : Le Chemviron F400, le Norit Darco 12x20, le Norit Darco 10x20 et le Desotec Organosorb 10-AA, dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 6. Une fois le meilleur charbon actif sélectionné, chaque hydrolysat a été traité à deux concentrations 30 et 50 g.l⁻¹ (sauf l'hydrolysat de résineux extrait à 150°C).

	Chemviron Filtrasorb 400	Norit Darco 12x20	Norit Darco 10x20	Desotec Organosorb 10
Indice d'iode (mg/g)	1050	650	1000	1010
Surface spécifique (m²/g)	1050 - 1200	650	1000	950
Taille (mm)	0,425 – 1,7	0,84 – 1,7	0,84 – 2,0	0,6 – 2,36
Diamètre moyen (mm)	1,0	1,3	1,4	1,5
Taille effective (mm)	0,55 – 0,75	0,7 – 1,0	0,80 – 1,1	0,7 – 1,0
Taille en Mesh	12x40	12x20	10x20	8x30
Source	Bitume	Lignite	Bitume	Bitume

TABLEAU 6 SPECIFICATIONS DES QUATRE CHARBONS ACTIFS UTILISES DANS CETTE ETUDE

II.C.3. FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

Cette section concerne la purification par chromatographie d'exclusion stérique des échantillons d'hydrolysat déjà purifiés soit par traitement au charbon actif, soit par ultrafiltration, soit les deux. Le but de cette étape est de séparer les oligosaccharides contenus dans l'hydrolysat des impuretés non retirées par les deux précédents traitements et/ou de séparer les oligosaccharides en solution en fonction de leur taille (volume hydrodynamique) et de leur charge. Les trois sections suivantes traitent des trois types de gel utilisés, pour lesquels plusieurs systèmes chromatographiques ont été montés. Chaque collecte est effectuée de la même facon sur chaque système avec un raque comportant une centaine de tubes à essais. La détection se fait par réfractométrie sur tous les systèmes étudiés. Le collecteur est programmé à chaque injection, en fonction du débit, du temps d'élution (connu grâce à une première injection) et du volume à collecter. Sur le Chromatogramme 4, on observe la superposition des temps de collecte pour chaque tube à essais (lignes verticales) sur le signal réfractométrique obtenu après séparation d'un échantillon de feuillus par chromatographie d'exclusion stérique sur deux colonnes BioGel P-2 placées en série à 50°C, en eau à un débit de 0.4 ml.min⁻¹. On comprend alors que chaque intervalle entre deux traits verticaux correspond à un tube, le premier tube recevant la première goutte en sortie de détecteur se trouvant à 200 min de temps de rétention c'est-à-dire le temps défini comme étant le début de l'élution. Il suffit de compter les tubes pour déterminer dans quel tube se trouve la fraction d'intérêt. lci l'élution dure 500 minutes, elle dépend du système étudié.



Chromatogramme 4 Signal refractometrique obtenu apres separation par chromatographie d'exclusion sterique d'un echantillon de feuillus traite par de la Xylanase sur deux colonnes BioGel P-2 placees en serie a 50° C, en eau a un debit de 0,4 ml.min⁻¹

Après chaque collecte, les fractions sont réunies dans des ballons en verre pour être lyophilisées et enfin pesées sur une balance de précision (au mg). Elles sont conservées au sec dans des piluliers en verre fermés hermétiquement, placés dans un dessiccateur avant d'être analysées en spectrométrie de masse.

GEL SUPERDEX

La chromatographie à perméation de gel couplée à un détecteur réfractométrique à échelle semi-préparative a été conduite à l'aide de trois type de colonnes Superdex, dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 7. Les colonnes achetées sont déjà packées, aucune réhydratation du gel n'a donc été nécessaire. Chaque échantillon est filtré sur 0,2 µm avant injection et placé dans une seringue dont le volume est compris entre 3 et 15 ml. Pas plus de 250 mg d'analyte sec est utilisé par injection. La séparation des échantillons étudiés se fait soit en eau déionisée soit en carbonate d'ammonium à 0,1 M. De manière générale, le débit d'éluant est compris entre 1,1 et 1,2 ml.min⁻¹ et la pression totale interne au système chromatographique n'excède pas 2 bars. Plusieurs montages, inspirés de deux études (Lundqvist et al. 2003; Teleman et al. 2000), ont été réalisés et utilisés à 25°C :

- Trois Superdex[™] 30 en série
- Une Superdex[™] 200 en série avec une Superdex[™] 30
- Deux Superdex[™] 75 en série
- Une Superdex[™] 200 en série avec deux Superdex[™] 75

			HiLoad™	
	HiLoad™ 26/600	HiLoad™ 26/600	26/600	
	Superdex™ 30	Superdex™ 75	Superdex™	
	prep grade	prep grade	200 prep	
			grade	
Matrice du gel	Dextran lié à de l'agarose hautement réticulé			
Taille des particules	34 µm			
Volume / dimensions de colonne	319 ml correspond à L= 60 cm et Ø=2,6 cm			
Pression tolérée	3 bar			
Domaine de fractionnement (g.mol ⁻¹)	< 10 000	5×10^2 à 7 × 10 ⁴	1 × 10³ à 6 × 10⁵	

TABLEAU 7 CARACTERISTIQUES DES COLONNES UTILISEES AVEC DU GEL SUPERDEX

GEL HW TOYOPEARL

Une seule taille de gel a été utilisée, le HW-40S dont les particules ont une taille moyenne comprise entre 20 et 40 µm, et une taille de pores de 50 Å. Il s'agit d'un lit polymérique de polyméthacrylique hautement fonctionnalisé de groupes hydroxyles qui permet des interactions de type polaire. Cette résine hydrophobe semi-rigide est plus résistante à la température à la pression qu'un gel Superdex de type dextran – agarose et peut supporter jusqu'à 7 bar. Il s'agit du gel de plus petit domaine de fractionnement de chez Toyopearl, cet intervalle de masses molaires varie de 100 à 3000 Da pour les oxides et glycols de polyéthylène, de 100 à 7000 Da pour le

dextran et de 100 à 10000 Da pour les protéines globulaires. Le grade S a été choisi pour la grande résolution des petites masses molaires qu'il offre, les chromatogrammes obtenus avec trois différents grades : Superfine (S), Fine (F) et Coarse (C) sont présentés Chromatogramme 5.



Chromatogramme 5 signal uv a 280 nm obtenu apres separation par chromatographie d'exclusion sterique de 1 : thyroglobulin (0.3%), 2 : r-globulin (0.3%), 3 : B-lactoglobulin (0.3%), 4 : cytochrome c (0.1%), sur une colonne toyopearl hw-55, 26 mm id x 70 cm l eluee en naci a 0,2 m avec un tampon phosphate a 33,3 m (ph 7.0), a 106 mL/h et a 25°C (travail effectue par toyopearl)

Dans la présente étude, cette résine est utilisée pour de la chromatographie d'exclusion par la taille à 25°C couplée à un réfractomètre. Deux éluants ont été utilisés, de l'eau déionisée et du carbonate d'ammonium à 0,1 M. Ainsi que deux colonnes constituant chacune deux systèmes chromatographiques séparés : L=1 m, \emptyset =1,5 cm (considéré comme une échelle semi-préparative dans cette étude) et L=1 m, \emptyset =5 cm (considéré comme une échelle préparative pour cette étude) pour lesquels le débit est respectivement fixé à 1,2 et 2 ml.min⁻¹. Chaque échantillon est filtré sur 0,2 µm avant injection et placé dans une seringue dont le volume est compris entre 3 et 15 ml.

BIO-GEL

Ce type de gel est très utilisé pour effectuer du dessalage et de la séparation rapide de petits hydrates de carbone. Ses caractéristiques (présentées Tableau 8), lui confèrent un caractère très hydrophile et souple, plus qu'un copolymère dextran agarose, c'est pourquoi il ne supporte pas la pression. Des essais ont été réalisés à la fois en eau et en bicarbonate d'ammonium à 0,1M, à température ambiante et à 50°C, le débit d'éluant ne dépasse pas 0,4 ml.min⁻¹. Chaque échantillon est filtré sur 0,2 µm avant injection et placé dans une seringue dont le volume est compris entre 3 et 15 ml. De la même façon que pour les systèmes précédents, en sortie de colonnes est placé un détecteur réfractomètrique pour l'enregistrement du chromatogramme.

La résolution s'améliore avec la température croissante, selon le fabricant, c'est pourquoi il a été décidé de tester ces deux températures. Il est à noter que des problèmes de surpression ont été rencontrés suite à l'augmentation de température. En effet à 50°C la solvatation du gel par le solvant est améliorée et il gonfle. Les colonnes ont donc été vidées et repackées à la main avec du gel déshydraté neuf, suivant le protocole donné par Bio-Rad.

	Bio-Gel P-2, fine	Bio-Gel P-4, fine		
Matrice du gel	Résine obtenue par copolymérisation d'acrylamide et de N,N'-méthylène-bis-acrylamide			
Taille des particules	45 à 90 μm			
Volume / dimensions de colonne	177 ml correspondant à L=100 cm, Ø=1,5 cm (considéré semi-préparatif)	 - 177 ml correspondant à L=100 cm, Ø=1,5 cm - 1963 ml correspondant à L=100 cm, Ø=5 cm (considéré préparatif) 		
Pression tolérée		1 bar		
Température	4	à 80°C		
Domaine de fractionnement (g.mol ⁻¹)	1 × 10² to 1,8 × 10³	8 × 10 ² to 4 × 10 ³		

TABLEAU 8 CARACTERISTIQUES DES COLONNES UTILISEES AVEC DU BIO-GEL P

II.D. METHODES ANALYTIQUES DE CARACTERISATION

Ces analyses sont utilisées sur les échantillons bruts, ultrafiltrés (rétentats et perméats), traités au charbon actif, et purifiés sur colonnes liquides. De manière générale toutes ces techniques nécessitent un échantillon exsangue de substances autres que des sucres susceptibles d'interagir avec la phase mobile comme la phase stationnaire, ou encore de se lier par affinité ou de manière covalente aux sucres et ainsi perturber l'analyse. Il est nécessaire de placer l'échantillon à une certaine concentration afin de ne pas endommager les colonnes, de les centrifuger pour éliminer toute particule solide et de les filtrer sur 0,2 μ m.

Toutes les analyses sont au moins réalisées en triplica sur un échantillon. Ils sont injectés les uns après les autres et 30 min d'élution supplémentaire est ajoutée à chaque échantillon afin de faire sortir tous ses constituants et ne pas perturber l'analyse suivante.

II.D.1. CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE

Le calcul de la concentration d'un ose notée C(i) grâce à la chromatographie haute performance est toujours basé sur la valeur de l'aire sous le pic de cet ose notée A(i), l'aire sous le pic et la concentration connues notées respectivement A(e) et C(e) des étalons internes et externes. La calibration est toujours effectuée grâce à une gamme étalon d'au moins quatre concentrations différentes (cinq dans la plupart des cas). Le calcul de l'erreur sur le résultat est basé à la fois sur la répétabilité de l'analyse par l'appareil chromatographique en effectuant au minimum trois injections pour chaque échantillon et l'incertitude induite par la manipulation elle-même.

II.D.1.a. CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ION

Un système haute performance de chromatographie à échange d'anion couplée à un détecteur d'ampérométrie pulsée est utilisé pour la quantification des monosaccharides de différente nature. Le temps de rétention de chaque sucre : arabinose, galactose, glucose, xylose et mannose dépend de leur capacité à se dissocier. Plus le pKa de l'ose étudié sera faible, plus il aura de chances de se trouver sous forme anionique. C'est une fois sous forme anionique, grâce à une élution isocratique en chlorure de potassium à 2 mM alimenté par un générateur d'éluant, qu'il peut interagir avec les sites ammonium quaternaires greffés sur la matrice de la colonne. On comprend donc, en se basant sur le Tableau 9, que le mannose sera élué en dernier et l'arabinose en premier, comme présenté Chromatogramme 6.

Mannose	Xylose	Glucose	Galactose	Arabinose
12,08	12,15	12,28	12,39	12,43

TABLEAU 9 PKA DES CINQ SUCRES SEPARES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'ANION

Le système utilisé, Dionex ICS 5000 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) thermostaté à 25°C, est équipé d'une pré-colonne (50 mm × 4 mm) placée en série avec une CarboPac[™] PA10 (250 mm × 4 mm). Pour chaque injection de 25 µl d'échantillon l'élution dure 30 min à un débit de 1 ml.min⁻¹. Elle est succédée d'une montée en concentration de l'éluant à 100 mM pendant 20 min, pour revenir à 2 mM durant 15 min avant l'élution suivante. La mesure du courant électrique (signal récupéré en nanoCoulomb) généré par l'oxydation des sucres sur l'électrode d'or par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl et la récupération des données relatives à chaque chromatogramme se font via le logiciel Chroméléon sur ordinateur. La variation mesurée lors des essais de répétabilité de l'appareil n'excède pas 3%.

La relation entre l'aire A(i)=y d'un ose (délimitée par une ligne de base rouge sur le Chromatogramme 6 et sa concentration C(i)=x est décrite par une fonction : un polynôme de second degré. L'étalonnage d'un sucre standard (étalon) avec au moins cinq concentrations différentes permet d'obtenir une courbe de calibration à cinq points, six avec l'échantillon de concentration inconnue. Une gamme d'étalons externes (arabinose, galactose, glucose, xylose, mannose) est préparée à 5, 10, 20, 30 et 40 mg.l⁻¹ et injectée tous les dix échantillons. C'est la résolution du polynôme qui décrit chaque courbe y=f(x) qui permet d'obtenir la concentration C(i) inconnue, lorsque l'aire A(i) correspondante est donnée par l'analyse chromatographique. Un facteur correctif correspondant au quotient entre la concentration théorique en fucose et la concentration réelle en fucose est appliqué au résultat. Il s'agit d'un étalonnage interne, défini par l'ajout de fucose, dans chaque échantillon lors de sa préparation (la concentration de chaque ose doit être comprise en 5 et 40 mg.l⁻¹). L'étalon interne est ajouté à une concentration de 20 mg.l⁻¹. Cette méthode permet donc la quantification des monosaccharides.



Chromatogramme 6 Signal Amperometrique (NC) obtenu apres separation d'un echantillon de feuillus par chromatographie a echange d'anion sur une colonne CarboPac PA10 en elution isocratique en KCl a 2 mmol/L a 25° C

Dans les liqueurs de bois la quantification des monosaccharides et des polysaccharides est nécessaire, c'est pourquoi deux injections différentes sont effectuées. La première consiste en l'injection de l'échantillon dilué dans les conditions décrites plus haut et filtré sur 0,2 µm, afin de quantifier les monosaccharides contenus dans la liqueur grâce à l'application du facteur de dilution. La deuxième consiste en l'injection de l'hydrolysat secondaire de la ligueur. oligosaccharides solubles L'hydrolyse totale des dans les liqueurs en monosaccharides est réalisée dans un autoclave en plaçant 5 ml de ligueur avec 1 ml d'acide sulfurique à 24% dans un tube à essai autoclavable hermétiquement fermé. L'autoclave, contenant 3L d'eau et le panier contenant le tube à essais, monte en température à 121°C. Ainsi durant 1h la vapeur sous pression permet l'hydrolyse totale de l'échantillon. Une fois refroidi, l'échantillon est filtré, dilué et injecté dans le ∔ système pour quantification. En tenant compte du facteur de dilution de l'hydrolyse acide secondaire (1,2), la quantité oligomérique de chaque ose (noté C[ose] dans les équations ci-dessous) est alors calculée par différence avec la quantité initiale en monosaccharides obtenue par la première injection.

Les quantités en oligomères d'hémicelluloses sont calculées grâce aux équations de Janson modifiées (Janson 1970; 1974; M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008), et grâce à des ratios molaires théoriques trouvés dans la littérature (Tore E Timell 1964; T. E. Timell 1967; R. M. Rowell 2012; Sixta 2006b; Fengel et Wegener 1984). Les ratios molaires expérimentaux des hydrolysats de feuillus et de résineux extraits à 150°C (également de l'hydrolysat de feuillus extrait à 170°C) sont très éloignés de la littérature. Il a donc été décidé d'utiliser des ratios théoriques pour le calcul des galactoglucomannanes (3), des glucomannanes (4), et des arabinoxylanes (5). C'est par différence avec les quantités oligomériques excédentaires de chaque ose que l'on obtient les quantités en glucanes (7), arabinanes (8) et (8'), mannanes (9), galactanes (10) et (10)'. Bien qu'une petite part du xylose oligomérique puisse être lié à des xyloglucanes, il a été décidé d'utiliser la totalité du xylose oligomérique pour le calcul des xylanes dans les hydrolysats, avec la formule présentée équation Dans la liqueur de résineux extraite à 170°C, les quantités de (6). galactoglucomannanes et des arabinoxylanes sont obtenues par simple addition comme montrent les équations (1) et (2), car les ratios molaires expérimentaux sont proches des ratios molaires calculés dans le bois de départ et de ceux trouvés dans la littérature. Les concentrations entre crochet désignées par C[ose], désignent les concentrations oligomériques.

Calcul des xylanes dans les hydrolysats de résineux extraits à 170°C :

Arabinoxylanes =
$$\left(\frac{132}{150}\right) \times C[Arabinose] + C[Xylose]$$
 (1)

Calcul des galactoglucomannanes dans les hydrolysats de résineux extraits à 170°C :

$$Galactoglucomannanes = \left(\frac{162}{180}\right) \times C[Galactose] + C[Glucose] + C[Mannose]$$
(2)

Calcul des galactoglucomannanes dans les hydrolysats de résineux extraits à 150°C :

$$Galactoglucomannanes = \left(\frac{162}{180}\right) \times C[Glucose] \times [1 + 0.5 + 2.9]$$
(3)

Calcul des glucomannanes dans les hydrolysats de feuillus :

$$Glucomannanes = C[Mannose] \times \left(\frac{162}{180}\right) \times \left[1 + \frac{1}{1,6}\right]$$
(4)

Calcul des xylanes dans les hydrolysats de résineux extraits à 150°C :

Arabinoxylanes =
$$\binom{132}{150} \times C[Xylose] \times [0,1+1]$$
 (5)

Calcul des xylanes dans les hydrolysats de feuillus :

$$Xylanes = \left(\frac{132}{150}\right) \times C[Xylose]$$
(6)

Calcul des glucanes dans les hydrolysats de feuillus :

$$Glucanes = C[Glucose] \times \left(\frac{162}{180}\right) - \left[\frac{C[Mannose]}{1,6}\right] \times \left(\frac{162}{180}\right)$$
(7)

Calcul des arabinanes dans les hydrolysats de résineux :

Arabinoxylanes =
$$\binom{132}{150} \times C[Arabinose] - \binom{132}{150} \times C[Xylose] \times 0,1$$
 (8)

Calcul des arabinanes dans les hydrolysats de feuillus :

Arabinanes =
$$\binom{132}{150} \times C[Arabinose]$$
 (8')

Calcul des mannanes dans les hydrolysats de résineux :

$$Mannanes = C[Mannose] \times \left(\frac{162}{180}\right) - C[Glucose] \times \left(\frac{162}{180}\right) \times 2,9$$
(9)

Calcul des galactanes dans les hydrolysats de résineux :

$$Galactanes = C[Galactose] \times \left(\frac{162}{180}\right) - C[Glucose] \times \left(\frac{162}{180}\right) \times 0,5$$
(10)

Calcul des galactanes dans les hydrolysats de feuillus :

$$Galactanes = \left(\frac{162}{180}\right) \times C[Galactose]$$
(10')

II.D.1.b. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZ

Le ratio molaire des monosaccharides constitutifs de polysaccharides est déterminé selon la méthode de (Kamerling et al. 1975) modifiée par Montreuil et al. (1986). L'identification et le dosage des monosaccharides nécessitent une hydrolyse par méthanolyse du polymère de façon à n'obtenir que des monomères. Les résidus glycosidiques sont ensuite triméthylsilylés afin de les rendre volatils. Ils sont ainsi identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse sous forme de méthylglycosides O-triméthylsilylés.



FIGURE 34 SCHEMA REACTIONNEL DE METHANOLYSE ET DERIVATISATION DES OLIGOSACCHARIDES CONTENUS DANS LES LIQUEURS

Réactifs

- Solution de methanol/HCI 3N (Supelco)
- Anhydride acétique
- Carbonate d'argent
- Myo-inositol
- Pyridine
- Réactif Sylon BFT (BSTFA + TMCS 99 :1) (Supelco)
- Dichlorométhane

Environ 0,4 mg d'échantillon et 100 μ g de pentaerythritol et 50 μ g de myoinositol (références internes) sont placés dans un bain à sec en présence de 500 μ l d'un mélange méthanol/acide chlorhydrique 3 N (Supelco) pendant 4 heures à 110°C. Après refroidissement à température ambiante, le méthanolysat est neutralisé à l'aide de carbonate d'argent, puis 50 μ l d'anhydride acétique sont ajoutés afin de réacétyler les osamines présentes. Après une nuit à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 3000 tr/min et le surnageant est évaporé sous jet d'azote. Les composés sont ensuite dissous dans 70 μ l de pyridine et incubés la nuit à température ambiante avec 70 μ l de sylon (BSTFA : TMCS. 99:1. Supelco), voir Schéma 1.

Après évaporation douce des réactifs en excès sous jet d'azote, les méthylglycosides triméthylsilylés sont repris par 700 µl de dichlorométhane puis injectés en chromatographie en phase gazeuse (Système GC-6850 AGILENT, injection in-colonne, détecteur FID : ionisation de flamme). Le gaz vecteur est l'hydrogène. La colonne de type HP-5MS (30 m. 0,25 mm de diamètre interne) est apolaire. Le programme de montée en température est le suivant : 120°C maintenu pendant 1 minute puis un gradient de 1.5°C/min jusqu'à 180°C suivi d'un gradient de 2°C/min jusqu'à 200°C.



CHROMATOGRAMME 7 OBTENU APRES SEPARATION DU D-GLCP, DU D-XYLP ET DU 4-O-MEGLCAP PAR CHROMATOGRAPHIE GAZ HAUTE PERFORMANCE SUR LE SYSTEME CHOISI POUR CETTE ETUDE Chaque monosaccharide est identifié par comparaison de ses temps de rétention relatifs par rapport à l'étalon interne avec ceux des monosaccharides purs traités dans les mêmes conditions. Par exemple, on observe sur le Chromatogramme 7, les deux pics à 12,9 et 13,4 min de temps de rétention qui correspondent aux pics du xylose, distincts des pics à 19,9 et 20,6 min qui correspondent au glucose. Un coefficient de réponse (facteur de calibration) est calculé pour chaque monosaccharide par rapport à l'étalon interne afin de définir la proportion de chaque monosaccharide au sein du polysaccharide. La répétabilité de l'analyse est plutôt bonne, la variation sur trois injections d'un même échantillon se situe autour de 3%. Ce facteur est calculé par un produit en croix entre les aires A et masses injectées m respectives de l'étalon interne (e) et du monosaccharide à quantifier (i) selon l'équation suivante :

$$Fp(i) = \frac{m(i) \times A(e)}{m(e) \times A(i)}$$

Méthode particulière adaptée pour la séparation de l'acide 4-O-MeGlcAp

Sundberg (Sundberg et al. 1996) prend le même facteur de calibration pour l'acide glucuronique et le 4-O-Méthylglucuronique. Suivant le programme de montée en température décrit plus haut et après injection du 4-O-MeGlcAp, on observe un pic de temps de rétention différent de l'acide glucuronique et un facteur réponse (Fp) différent. L'acide 4-O-Méthylglucuronique a été calibré à l'aide de deux étalons internes différents : le Myo-Inositol (M) (t = 26,8 min) et le Pentaerytritol (P) (t = 8,7 min). Pour exemple, on observe une légère différence dans les facteurs réponse lorsqu'ils sont quantifiés avec P ou M, calculés pour le xylose, l'acide 4-O-Méthylglucuronique a5.



Figure 35 Valeurs des facteurs reponses , du glucose, de l'acide 4-O-methylglucuronique et du xylose, calcules avec M et P comme etalons internes respectifs. Facteurs correspondant au chromatogramme 7

II.D.1.c. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (GEL FILTRATION)

La séparation des hydrates de carbone qui composent les liqueurs en fonction de leur taille est effectuée par chromatographie liquide haute performance d'exclusion stérique (ou gel filtration) couplée à un détecteur à diffusion de la lumière statique à 3 angles sur un système GPC MALS (Minidawn Treos, Wyatt), auquel est ajouté un détecteur UV et un détecteur réfractométrique (Optilab TrEx, Wyatt). *Toutes les analyses sont réalisées à 30°C à un débit de 0,5 ml/min, l'éluant utilisé est à 0,1 M NaNO₃ et contient 0,3% NaN₃. Le débit du solvant dans les colonnes quand il n'y a pas d'injection est de 0,1 ml/min. Avant de préparer les injections, mettre le débit à 0,3 ml/min, laisser équilibrer 15 min. Puis mettre le débit à 0,5 ml/min, laisser équilibrer 15 min. Plusieurs colonnes Shodex OHPack SB 800 HQ ont été utilisées, le détail des spécifications de chaque colonne est présenté Figure 37. Elles sont remplies d'un gel formé par des billes sphériques de polyhydroxyméthacrylate, et sont particulièrement adaptées à la séparation d'oligosaccharides solubles dans l'eau. Chaque échantillon est injecté trois fois. Le seuil de variation entre trois injections toléré est de 5%, si l'écart-type calculé sur un échantillon est supérieur à cette valeur l'échantillon est injecté pour une nouvelle analyse.

$$M_{w} = \frac{\sum_{i}^{i} n_{i} M_{i}^{2}}{\sum_{i}^{i} n_{i} M_{i}} = \frac{\sum_{i}^{i} c_{i} M_{i}}{\sum_{i}^{i} c_{i}}$$

$$M_{n} = \frac{\sum_{i}^{i} n_{i} M_{i}}{\sum_{i}^{i} n_{i}} = \frac{\sum_{i}^{i} c_{i}}{\sum_{i}^{i} c_{i} / M_{i}}$$
(ii)

FIGURE 36 FORMULES DE CALCUL DE MW (A) ET MN (B)

Le calcul des masses molaires moyennes en poids notée Mw et en nombre notée Mn, donné par les équations (i) et (ii) Figure 36, est effectué par le logiciel Astra 6.1. La concentration est donnée par le signal du réfractomètre et le le dn/dc, ici fixé à 0,147. Cette valeur est une valeur moyenne qui ne représente pas la valeur exacte de chaque oligosaccharide d'hémicelluloses étudiée. En effet le dn/dc varie avec la structure et la nature du polysaccharide et le solvant. Il a été défini à 0,142 pour du xyloglucane et 0,147 pour du pullulan. Après utilisation de ces deux valeurs sur un même échantillon, la variation dans le calcul des masses molaires est considérée comme négligeable. La masse molaire Mi, proportionnelle au (dn/dc)², à la concentration et au signal de diffusion, est obtenue selon le Formalisme de Zimm.

Au vue des domaines de fractionnement des colonnes Shodex Figure 37 (b), les SB 802,5 HQ et SB 803 HQ semblent les plus adaptées à l'étude des hémicelluloses de bois solubles extraites par autohyrolyse (Reyes et al. 2013; Mehmet Sefik Tunc et van Heiningen 2011; Song et al. 2008). C'est pourquoi le premier montage étudié est composé de ces deux colonnes placées en série. Les résultats obtenus avec les hydrolysats extraits à 170°C sont corrects en termes de répétabilité et comparativement à la littérature, à la fois pour les feuillus et les résineux.

(0)

(a)	Product Name	Plate Number (TP/column)	Particle Size (µm)	Pore Size (Å)	Column Size (mm) I.D.x Length
. ,	OHpak SB-802 HQ	≥ 12,000	8	100	8.0 x 300
	OHpak SB-802.5 HQ	≥ 16,000	6	200	8.0 x 300
	OHpak SB-803 HQ	≥ 16,000	6	800	8.0 x 300
	OHpak SB-804 HQ	≥ 16,000	10	2,000	8.0 x 300
	OHpak SB-805 HQ	≥ 12,000	13	7,000	8.0 x 300
	OHpak SB-806 HQ	≥ 12,000	13	15,000	8.0 x 300
	OHpak SB-806M HQ	≥ 12,000	13	15,000	8.0 x 300
	OHpak SB-G 6B	(guard column)	10	-	6.0 x 50
	OHpak SB-807 HQ	≥ 1,500	35	30,000	8.0 x 300
	OHpak SB-807G	(guard column)	35	-	8.0 x 50



FIGURE 37 DOCUMENTATION FOURNIE PAR SHODEX CONCERNANT LES CARACTERISTIQUES (A) ET (B) DES COLONNES ETUDIEES, ET LEURS COURBES DE CALIBRATION OBTENUES AVEC DU PULLULAN EN EAU A 1 ML/MIN A 30°C (C)

Or, les autohydrolysats obtenus à 150°C présentent tous des agrégats qui perturbent la mesure de la masse molaire. Un agrégat est identifié par un signal de diffusion alors que le signal réfractométrique est nul. Le Chromatogramme 8 illustre bien ce phénomène : la courbe rose (LS) correspondant au signal de diffusion obtenu après chromatographie à perméation de gel du rétentat sur 1 kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C, montre un pic haut et large en amont du signal réfractométrique (bleu, noté dRi). On observe que le signal bleu commence à être non nul à partir de la base du deuxième pic du LS (rose), qui représente la majeure partie des sucres de l'échantillon. Cependant, l'agrégat fait partie de l'échantillon et le caractérise. Ce chromatogramme illustre à titre d'exemple un phénomène récurrent dans les hydrolysats extraits à 150°C à la fois chez les feuillus et les résineux. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer la présence d'un agrégat : une affinité chimique particulière avec la colonne, dans ce cas on peut penser à modifier la force ionique de l'éluant, la température ou dans certains cas changer la phase stationnaire.



8 OBTENUS CHROMATOGRAMME CHROMATOGRAMMES APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE DU RETENTAT SUR 1 KDA (72H) DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 150°C SUR UNE SB 803 HQ EN SERIE AVEC UNE SB 802,5 HQ (A)

Le collage stérique est caractérisé par une ou plusieurs molécules enchevêtrées qui se « coincent » dans les pores de la colonne, et sont ainsi exclues plus tard qu'elles ne le devraient. Le principe d'une telle séparation chromatographique est basé sur le fait que plus les composés ont une faible masse molaire, plus ils sont élués tard, ainsi, les grosses molécules sont exclues en amont des petites.

Si l'on trace la masse molaire en fonction du temps de rétention (courbe de calibration), celle-ci est censée diminuer de façon exponentielle. Or on observe bien une remontée des masses molaires sur le Chromatogramme 10 (a). Cette remontée a été corrigée grâce à l'outil d'extrapolation d'Astra du modèle exponentiel d'ordre 1 (onglet Results Fitting), cf. Chromatogramme 10 (b). On sous-estime alors la Mn et on surestime la dispersité. Cependant, cette correction ne suffit pas à obtenir un calcul des masses molaires moyennes qui soit suffisamment proche de la réalité.

Tableau 10 Calcul de la masse molaire moyenne en poids (Mw) et de la Dispersite (Mw/Mn) obtenus a	APRES
SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIOUE AVEC DIFFERENTES COMBINAISONS DE COLONNES ET DIFFERENTS MI	ODES
	ODLO
DE PREPARATION D'ECHANTILLON. L'ECHANTILLON ETUDIE EST LE RETENTAT SUR 1KDA DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTR	AIT A
150°C. Toutes les elutions sont realisees dans les memes conditions*	

Préparation de l'échantillon	Montage de colonnes	M _w (Dalton)	Dispersité
Eau osmosée	SB 803 HQ et SB 802,5 HQ	1,36×10 ⁴ ± 2,2%	1,78 ± 3,7%
Eau osmosée	SB 806 M HQ SB 803 HQ et 802,5	1,33×10 ⁴ ± 3,5%	1,59 ± 5,2%
Eau osmosée	2 SB 806 M HQ	1,14×10 ⁴ ± 1,7%	1,7 ± 2,8%
Eau osmosée UF 96h	2 SB 806 M HQ	8,19×10 ³ ± 2%	1,7 ± 4%
Eau osmosée	3 SB 806 M HQ	1,09×10 ⁴ ± 2,9%	1,58 ± 4,7%
Eau osmosée ultrasons	3 SB 806 M HQ	1,15×10 ⁴ ± 2,4%	1,60 ± 3,5%
Eau osmosée	2 SB 807 HQ et SB 806 M HQ	$1,18 \times 10^4 \pm 3,6\%$	1,58 ± 5,2%
DMSO 25mg/l	2 SB 806 M HQ	1,05×10 ⁴ ± 3,4%	2,06 ± 1,9%
KOH 25mg/l	2 SB 806 M HQ	2,67×10 ⁴ ± 1,1%	1,71 ± 1,5%
EDTA (10mM dans solvant)	2 SB 806 M HQ	1,02×10 ⁴ ± 2,8%	1,69 ± 5,1%
EDTA ultrasons	2 SB 806 M HQ	$1,10 \times 10^{4} \pm 2,7\%$	1,66 ± 5,1%



Chromatogramme 9 Chromatogrammes obtenus apres separation par chromatographie d'exclusion sterique du retentat sur 1 kDa (72h) de l'hydrolysat de feuillus extrait a 150° C sur differents montages de colonnes (A), prepare dans differents solvants avant injection sur deux SB 806 HQ en serie (B) et ultrafiltre pendant 72h et 96h sur deux SB 806 HQ en serie (c). Toutes les elutions sont realisees dans les memes conditions^{*}.

On comprend donc que la masse molaire moyenne de chaque échantillon d'hydrolysat extrait à 150°C est grandement surestimée. C'est pourquoi une série de tests a été réalisée sur le même échantillon (rétentat sur 1kDa du feuillus extrait à 150°C) avec plusieurs montages de colonnes Chromatogramme 9 (a), plusieurs solvants utilisés uniquement pour la préparation de l'échantillon sauf l'EDTA qui a été ajouté au solvant Chromatogramme 9 (b). Enfin l'influence d'une plus longue ultrafiltration (96h) a été comparée à une filtration classiquement réalisée en 72h Chromatogramme 9 (c). Les résultats de Mw et de dispersité de chaque essai sont présentés Tableau 10.



CHROMATOGRAMME 10 SIGNAUX DE REFRACTOMETRIE (BLEU), UV (VERT), DE DIFFUSION (ROUGE) ET MASSE MOLAIRE (NOIR) OBTENUS APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE DU RETENTAT SUR 1 KDA (96H) DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 150°C SUR DEUX SB 806 HQ EN SERIE. TOUTES LES ELUTIONS SONT REALISEES DANS LES MEMES CONDITIONS*.

Ces résultats montrent que malgré une meilleure séparation de l'agrégat du pic d'intérêt avec des colonnes de plus hauts domaines de fractionnement ou un solvant tel que le DMSO, le calcul de Mw reste sensiblement le même, et l'ordre de grandeur n'est toujours pas le bon. Les ultrasons pourraient être une piste intéressante mais l'objectif n'est pas de casser les oligosaccharides. On remarque que la durée croissante de l'ultrafiltration est la meilleure option pour la séparation du pic de 👝 l'agrégat. Cette solution n'en est pas une car on dénature l'échantillon et on perd des 🐻 sucres.



CHROMATOGRAMME 11 SIGNAL DE DIFFUSION DU LS2 OBTENU APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE DU RETENTAT SUR 1 KDA (96H) DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 150°C SUR DEUX SB 806 HQ EN SERIE. TOUTES LES ELUTIONS SONT REALISEES DANS LES MEMES CONDITIONS*.

La méthode choisie pour palier à ces problèmes d'agrégat se situe donc au niveau du traitement des données avec le logiciel Astra 6.1. La ligne de base des trois signaux de diffusion de lumière est tronquée sur le pic d'intérêt sous lequel se trouve la majeure partie de l'échantillon c'est-à-dire le signal réfractomètrique. De cette façon, on s'affranchit de la contribution de l'agrégat, cf. Chromatogramme 11 (a) en comparaison au Chromatogramme 11 (b). La déconvolution de chaque pic serait sans doute la méthode la plus adaptée et la plus précise (A.-L. Dupont et al. 2018). En effet tronquer la ligne de base revient à sous-estimer la Mw.

II.D.1.d. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION D'ION SUR COLONNE A ECHANGE DE LIGAND

Les produits de dégradation générés par l'autohydrolyse qui se trouvent en solution avec les monosaccharides et les oligosaccharides d'hémicelluloses extraits : furfural, 5-hydroxyméthylfurfural, acide formique, acide acétique, sont quantifiés par chromatographie haute performance d'exclusion d'ion sur un système Shimadzu (Nexera XR) équipé d'une pré-colonne Varian (3 mm x 5 mm) en série avec une colonne à échange de ligand Hiplex H (7,7 mm x 300 mm, Agilent). Cette colonne est constituée d'un gel de styrène copolymérisé avec du divinylbenzène sulfoné sous forme hydrogène, et permet la compétition entre les H⁺ des produits de dégradation et de l'éluant (acide sulfurique à 5 mM) qui est débité à 0,6 ml.min⁻¹. Le système est thermostaté à 60°C, la détection se fait par réfractométrie à 40°C en sortie de colonne et les résultats sont traités par le logiciel LabSolutions de Shimadzu. De la même manière que pour les analyses chromatographiques précédentes, des gammes d'étalons externes, dont les concentrations sont présentées Tableau 11 (Guigon 2019), sont injectés tous les dix échantillons pour calibrer l'appareil et quantifier chaque produit de dégradation. L'intervalle d'incertitude ne dépasse pas 1% de la valeur du résultat pour chaque composé.

	Concentrations en g.l-1			
5-hydroxyméthylfurfural	0,650	1,300	1,950	2,600
Furfural	1,237	2,475	3,713	4,950
Acide formique	1,486	2,971	4,458	5,942
Acide acétique	1,493	2,985	4,479	5,971

TABLEAU 11 CONCENTRATIONS DES GAMMES DE STANDARDS INJECTES TOUS LES DIX ECHANTILLONS EN G.L⁻¹

Les quantités d'acide acétique ainsi mesurées dans les hydrolysats secondaires, noté Ac totaux, (protocole identique à celui décrit dans la section II.D.1.A. Chromatographie d'échange d'ion : ajout de H_2SO_4 à 24% pendant 1h à 121°C dans un ratio volumique de 5 :1) donnent accès, par différence avec les quantités détectées dans les hydrolysats bruts Ac libre, aux groupements acétyle liés aux oligosaccharides, selon l'équation (11) :

$$Ac\acute{e}tyles\ li\acute{e}s\ (g.\ l^{-1}) = \frac{42}{60} \times (C[Ac\ totaux] \times \frac{6}{5} - C[Ac\ libre]) \tag{11}$$

Le pourcentage massique moyen en groupement acétyle de chaque famille d'hémicelluloses est ensuite déterminé par le quotient entre la quantité de groupements acétyle liés dans un échantillon et la quantité d'oses oligomériques acétylés. Par exemple dans les échantillons de résineux, on considère dans la littérature que seuls les mannanes sont acétylés et non les xylanes. Ainsi le pourcentage moyen en acétyle des chaines de galactoglucomannanes (noté %Acétyle_{GGM}) est donné par le quotient de la masse d'acétyles liés sur la masse de galactoglucomannanes (notés GGM) dans l'échantillon de liqueur de bois. Par opposition, les hydrolysats de feuillus comportent à la fois des xylanes acétylés et des mannanes acétylé.

Les deux hypothèses formulées à priori sont les suivantes :

- La quantité totale des groupements acétyle liés déterminés par HPLC pour chaque échantillon est allouée à 100% aux xylanes. Le degré moyen d'acétylation des xylanes (X) qui en découle est noté D_{AC1 X}, équation (13)
- La quantité totale des groupements acétyle liés déterminée par HPLC pour chaque échantillon est allouée à 10 % aux glucomannanes (notés GM, donc le degré moyen d'acétylation est noté D_{GM}) et 90% aux xylanes (notés X, donc le degré moyen d'acétylation est noté D_{AC2 X}), selon (Johnson et al. 2017; Teleman et al. 2003), cf équations (14) et (15).

Le calcul du degré d'acétylation moyen des oligosaccharides (Xu et al. 2010). Il est adapté en fonction des conditions décrites ci-dessus.

Résineux

$$D_{AC \ GGM \ résineux} \ (\%) = \frac{162 \times \% \ Acetyle_{GGM}}{\left(M_{Ac\acute{e}tyle} \ \times \ 100\right) - \left(M_{Ac\acute{e}tyle} \ -1\right) \times \% \ Acetyle_{GGM}} \tag{12}$$

Feuillus

$$D_{AC1 X feuillus} (\%) = \frac{132 \times \% Acetyle_X}{(M_{Acétyle} \times 100) - (M_{Acétyle} - 1) \times \% Acetyle_X}$$
(13)

$$D_{AC2 X feuillus} (\%) = \frac{132 \times 0.9 \times \% Acetyle_X}{(M_{Acétyle} \times 100) - (M_{Acétyle} - 1) \times 0.9 \times \% Acetyle_X}$$
(14)

$$D_{AC\ GM\ feuillus}\ (\%) = \frac{162 \times 0.1 \times \%\ Ac\acute{e}tyle_{GM}}{\left(M_{Ac\acute{e}tyle}\ \times\ 100\right) - \left(M_{Ac\acute{e}tyle}\ -\ 1\right) \times 0.1 \times \%\ Ac\acute{e}tyle_{GM}} \tag{15}$$

II.D.2. SPECTROMETRIE

II.D.2.a. SPECTROMETRIE UV-VIS

La quantité de lignine soluble extraite dans les liqueurs de bois est déterminée grâce à la norme TAPPI UM 250 (TAPPI 1991). Les liqueurs une fois centrifugées et filtrées sur 0,2 μ m, sont diluées dans de l'acide sulfurique à 3% de sorte que leur absorbance à 205 nm soit comprise entre 0,2 et 0,7. Les cuves en quartz utilisées font 1 cm de côté, de cette façon la concentration en g.l⁻¹ en lignine, notée C[lignine], dans chaque échantillon est calculée par la relation suivante, où le coefficient d'extinction ϵ vaut 110 l.g⁻¹.cm⁻¹ (Maekawa, Ichizawa, et Koshijima 1989):

 $C[lignine] = \frac{Absorbance \times Facteur \ de \ dilution}{\epsilon \times largeur \ cuve}$

II.D.2.b. SPECTROMETRIE DE MASSE

L'emploi d'une spectrométrie de masse ESI (Electron Spray Ionization Mass Spectrometry) convient à la caractérisation des fractions d'oligosaccharides de faible DP car la fragmentation des oligomères est importante avec cette méthode. Les analyses sont réalisées en mode positif et négatif sur une gamme de 50 à 1500 m/z (capillaire : 3500) sur un spectromètre AmaZon Speed (Bruker Daltonics) avec analyser de type trappe d'ions. L'addition de différents ions sont observés : Na⁺, K⁺, NH₄⁺, H⁺.

Les analyses de MALDI-ToF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) sont réalisées sur un spectromètre MALDI-TOF/TOF modèle Autoflex Speed (Bruker Daltonics) équipé d'un laser SmartBeam II (355 nm), en modes linéaires positif et réflectron positif. Les échantillons sont dilués à 3 ou 30 mg/ml dans l'eau, 0,5 µl d'échantillon dilué est mélangé à 0,5 µl de solution de matrice (20 mg d'acide 2,5-Dihydroxybenzoique diluée dans 200 µl d'un mélange eau/acetonitrile 50/50 +4 µl de N,N-Diméthylaniline). Seul 1 µl de ce mélange est déposé sur la cible MALDI (plaque aluminium MTP 384 Bruker Daltonics), puis laissés à l'air pour cristallisation. Un spectre de résolution suffisante est obtenu grâce à environ 20 tirs de laser aléatoires sur la cible. Les sucres s'ionisent avec l'addition d'un sodium Na⁺. Des blancs sont réalisés afin de soustraire tous les pics de matrice aux spectres des échantillons. Le calcul de la masse molaire de l'oligosaccharide correspondant à chaque pic du spectre donné en m/z est réalisé par l'addition de la masse de chaque unité monomérique composant la chaine de l'oligosaccharide ainsi que ses groupes de substitution, et enfin l'ion adduit qui peut différer selon la technique mais qui est majoritairement l'ion sodium. Le Tableau 12 regroupe un grand nombre des unités constitutives des hémicelluloses utilisés pour le calcul de leur masse (Sanglard 2013).

Unité	Abréviation	Masse (uma*)
Pentose	Р	132
Xylose	Х	132
Hexose	Н	162
Groupement acétyle	OAc	42 = 43 - 1
Acide 4-O-methylglucuronique	MeGlcA	190 = 208 - 18
Groupement methoxyle	OMe	14=31-17
Deoxyhexose	-	146 = 164 - 18
Extrémité d'une chaîne de polysaccharides	-	18 = 16 + 1 + 1
Sodium	Na	23
Potassium	К	39

TABLEAU12MASSEDESUNITESMONOMERIQUESETGROUPEMENTSFONCTIONNELSDESHEMICELLULOSES DU BOIS (SANGLARD 2013)

* unité de masse atomique

SYNTHESE DE LA METHODE EXPERIMENTALE

Sur le Schéma 1 est présentée la majeure partie des expériences menées en laboratoire dans le but d'extraire, de purifier et de caractériser les oligosaccharides d'hémicelluloses de bois feuillus et résineux solubles dans l'eau. On peut découper cette étude en trois chapitres. Le premier concerne essentiellement la filtration membranaire, le deuxième l'adsorption au charbon actif combinée ou non à la filtration membranaire et le troisième chapitre traite du fractionnement des hydrolysats, purifiés grâce à la filtration et au charbon actif, par chromatographie liquide d'exclusion stérique. Des essais d'hydrolyse enzymatique ont également été effectués dans le but de diminuer le DP moyen des oligosaccharides et dans une certaine mesure, d'en simplifier la caractérisation et la séparation. Tout au long des expérimentations, l'influence de la sévérité de l'autohydrolyse ainsi que l'essence de bois étudiée constituent deux points de comparaison quant à la nature chimique, la quantité extraite et la structure des oligosaccharides d'hémicelluloses solubilisés. Ces deux paramètres font aussi l'objet d'une méthode de purification et de caractérisation adaptée à chaque cas.



CHAPITRE III

CARACTERISATION DES HYDROLYSATS DE BOIS BRUTS ET ULTRAFILTRES : INFLUENCE DE L'ESSENCE ET DE LA TEMPERATURE D'EXTRACTION

Dans cette première partie expérimentale est présentée l'étude de l'influence de la température d'autohydrolyse ainsi que de l'essence de bois sur la composition des hydrolysats bruts et ultrafiltrés. Deux températures d'autohydrolyse sont étudiées, 150°C et 170°C, ainsi que deux mélanges industriels de copeaux de bois, résineux et feuillus. Le procédé d'autohydrolyse, permettant la libération des oligosaccharides d'hémicelluloses solubles dans l'eau, engendre également la dépolymérisation partielle de la lignine et la transformation des monosaccharides en produits de dégradation (correspondant à ce que l'on nommera « impuretés » dans l'hydrolysat). Chaque hydrolysat a subi de la nanofiltration avec une membrane de 500 Daltons, ou de l'ultrafiltration avec trois seuils de coupures à 1000, 3000 et 5000 Daltons. Le principal objectif de cette technique est d'abord de retirer la lignine soluble en fonction de sa masse moléculaire, les produits de dégradation issus des sucres (de faible masse molaire) et les monomères, puis de fractionner l'hydrolysat en fonction de la masse moléculaire des oligosaccharides en mélange.

La caractérisation des hydrolysats bruts et filtrés sur membrane est effectuée par analyse des hémicelluloses dans un premier temps, et de la lignine et des impuretés dans un second temps. L'analyse des hémicelluloses extraites est faite en utilisant les méthodes suivantes :

- La quantification des hexoses et des pentoses par nature (arabinose, galactose, glucose, xylose et mannose) est réalisée grâce de la chromatographie d'échange d'anion ;
- La quantification des déoxyhexoses (rhamnose et fucose) ainsi que des acides hexuroniques qui composent les hémicelluloses dites chargées (galacturoniques, glucuroniques et méthylglucuroniques) est effectuée par chromatographie en phase gaz;
- La quantification des groupements acétyles des hémicelluloses est effectuée par chromatographie d'exclusion ionique afin de déterminer leur degré d'acétylation;
- La masse moléculaire moyenne ainsi que les principales structures d'hémicelluloses sont déterminées grâce à de la chromatographie à perméation de gel couplée à de la diffusion de lumière et de la spectrométrie de masse.

III.A. COMPOSITION OSIDIQUE DES AUTOHYDROLYSATS

La quantité et la nature des hémicelluloses extraites est étudiée pour chaque température et mélange d'essences. Le rendement d'autohydrolyse ainsi que la pureté des hydrolysats sont également présentés dans cette partie. Les principaux hydrates de carbone composant les hémicelluloses, l'arabinose, le galactose, le glucose, le xylose, le rhamnose et le mannose, sont quantifiés dans les hydrolysats bruts et ultrafiltrés, la distinction est faite entre leur forme monomérique et oligomérique. L'influence de la température d'extraction sur le type d'hémicelluloses solubilisé sera étudiée, ainsi que la comparaison entre essences de bois feuillus et résineux. En fonction des ratios molaires entre sucres de différentes natures dans les hydrolysats, des hypothèses sur la structure des hémicelluloses extraites seront émises, et mises en corrélation avec les résultats de spectrométrie de masse dans la dernière section de ce chapitre.

On constate que le rendement massique d'une préhydrolyse à 170°C est logiquement plus faible en comparaison à 150°C et ce pour les deux mélanges d'essences (cf. Tableau 13), ce qui signifie que la masse solubilisée dans les hydrolysats, est plus grande à 170°C qu'à 150°C. En effet, on extrait en moyenne environ 18% de la masse du bois de départ à 170°C, après quantification des sucres sur cette masse solubilisée on constate que la quantité de sucres neutres est d'environ 10% (Tableau 13). Considérant que le mélange de résineux contient environ 22% d'hémicelluloses (oligomères de sucres neutres pour comparaison) et le mélange de feuillus 26% en masse, ceci montre que l'on en retire 44% du bois résineux et 38% du bois feuillus, tandis qu'à 150°C on en extrait respectivement 16% et 8%. Les concentrations en hydrates de carbone sont plus faibles dans les hydrolysats extraits à 150°C. Ces résultats sont comparables à la littérature (Guigon 2019), (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008), (Deloule et al. 2017).

	Rendement massique moyen d'autohydrolyse	Concentration en g de sucres neutres par litre d'hydrolysat	Pureté en g de sucres totaux par g d'hydrolysat sec	Quantité en g de sucres neutres pour 100g de bois sec
SW170	82,8 ± 3,5%	23,8 ± 1,4 g.l ⁻¹	83,5 ± 2,7%	9,5 ± 0,5%
SW150	92,7 ± 2,2%	8,5 ± 0,1 g.l ⁻¹	84,0 ± 1,1%	3,4 ± 0,1%
HW170	82,3	24,4 ± 1,4 g.l ⁻¹	72,0 ± 3,6%	9,8 ± 0,6%
HW150	94,9	5,1 ± 0,3 g.l ⁻¹	57,4 ± 0,4%	2,0 ± 0,1%

TABLEAU 13 RENDEMENT D'AUTOHYDROLYSE, CONCENTRATION, PURETE ET QUANTITE DES SUCRES NEUTRES EXTRAITS DANS LES HYDROLYSATS DE BOIS

III.A.1. HYDROLYSATS BRUTS : COMPARAISON DES ESSENCES

La part des monomères dans les hydrolysats de feuillus représente en moyenne 15% de la masse totale des hydrates de carbone neutres extraits, tandis que chez les résineux cette part vaut 29% (cf. Figure 38). On constate, logiquement, qu'elle est plus élevée pour des préhydrolyses à 170°C qu'à 150°C, en effet des températures d'extraction plus élevées engendrent une plus grande dépolymérisation des polysaccharides dans le bois et donc la solubilisation d'une plus grande part de monomères (Pu et al. 2013). Ceci est illustré dans les hydrolysats de résineux (Figure 39) : 12% seulement du xylose est présent sous forme de monomères à 150°C contre 44% à 170°C (contre 10% et 15% chez les feuillus). Ces résultats sont classiquement trouvés dans la littérature (Pu et al. 2013). La même tendance est observée pour le mannose et le galactose (respectivement à 100% et 80% sous forme oligomérique à 150°C et 88% et 62% à 170°C). On remarque que 74% de l'arabinose est présent sous forme monomérique à 170°C et 68% à 150°C.



FIGURE 38 REPARTITION ENTRE MONOMERES ET OLIGOMERES DANS LES HYDROLYSATS BRUTS EN G/L

Dans tous les hydrolysats, feuillus y compris, l'arabinose est le sucre le plus présent sous forme de monomères (au minimum à 50% et jusqu'à 100%), ce résultat semble être en accord avec les structures les plus connues d'hémicelluloses comportant de l'arabinose et les études précédentes (Desharnais, Du, et Brosse arabinoxylanes arabinogalactanes 2011). Effectivement les et qui sont respectivement substitués en α-1,3 et α-1,6, et les arabinanes avec un squelette en α -1,5 et des groupes substitués en α -1,3, constituent des polysaccharides plus facilement hydrolysables du fait de ce type de liaisons glycosidiques. Les hydrolysats de feuillus présentent de manière générale de plus faibles proportions de monomères aux deux températures étudiées.



FIGURE 39 CONCENTRATION D'ARABINOSE, DE GALACTOSE, DE GLUCOSE, DE XYLOSE ET DE MANNOSE SOUS FORME MONOMERIQUE DANS LES HYDROLYSATS BRUTS

La Figure 40 donne la composition des oligomères présents en mélange dans les hydrolysats bruts. Comme attendu, dans l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C, le mannose oligomérique représente la majorité des oligomères en mélange (55% des oligosaccharides en mélange), à température identique chez les feuillus c'est le xylose oligomérique qui est majoritaire et représente 73% des oligosaccharides (notés OS par la suite). Dans les hydrolysats extraits à 150°C, les mannanes (SW150) et xylanes (HW150) constituent 39 et 41% de la masse des oligomères. Des traces de rhamnose oligomériques (pourcentage de la masse totale en hydrates de carbone) sont détectées dans les hydrolysats obtenus à 150°C : 1,9 ± 0,02% (SW) et 2 ± 0,01% (HW), pouvant provenir des structures de type rhamnogalacturonane, rhamnoarabinogalactane.



FIGURE 40 CONCENTRATION D'ARABINOSE, DE GALACTOSE, DE GLUCOSE, DE XYLOSE ET DE MANNOSE SOUS FORME OLIGOMERIQUE DANS LES HYDROLYSATS BRUTS

III.A.2. HYDROLYSATS ULTRAFILTRES : INFLUENCE DE LA TAILLE DE LA MEMBRANE

III.A.2.a. HYDROLYSATS DE RESINEUX

Les Figure 41 et Figure 42 décrivent les compositions osidiques des hydrolysats de résineux extraits à 150 et 170°C, et de leurs rétentats ultrafiltrés sur des membranes de 1, 3 et 5 kDa. Dès le premier seuil de coupure à 1kDa les monomères sont éliminés (passés à travers la membrane) en quasi-totalité pour les deux températures d'extraction. On observe la présence majoritaire de galactose, glucose et mannose oligomérique (SW170), un très faible pourcentage de xylane subsiste mais devient nul à 5kDa (Figure 42). Il est à noter qu'il s'agit d'un résultat marquant : l'ultrafiltration dans le cas des hydrolysats de résineux extraits à 170°C permet la séparation des galactoglucomannanes du reste des oligosaccharides (OS) en mélange (Tableau 16). Ceci s'explique par le fait que les chaines de xylane sont plus courtes que celles des mannanes, pour ce mélange d'essence, à cette température.



Figure 41 Concentration d'arabinose, de galactose, de glucose, de xylose et de mannose sous forme oligomerique dans les hydrolysats ultrafiltres de resineux a $150^{\circ}C$



Figure 42 Concentration d'arabinose, de galactose, de glucose, de xylose et de mannose sous forme oligomerique dans les hydrolysats ultrafiltres de resineux a $170^{\circ}C$

En revanche pour l'autohydrolysat obtenu à 150°C, en comparaison à la Figure 41, bien que les mannanes représentent plus de 40% des oligosaccharides, on observe des quantités non négligeables d'arabinose et de xylose oligomériques et ce jusqu'au seuil de coupure le plus haut. On extrait, assez logiquement, des pentosanes de plus haut poids moléculaire à 150°C, en effet ils représentent encore 13% des oligomères dans le rétentat de plus haut seuil de coupure (Tableau 15). Dans le Tableau 14, on observe une perte en oligosaccharides (OS), due à l'ultrafiltration, par rapport à l'hydrolysat brut plus grande à haute température. On peut donc penser que les oligomères extraits à 150°C ont des chaînes plus longues ou bien un poids moléculaire moyen plus haut. De manière générale, la majeure partie des oligomères solubles ont une masse moléculaire inférieure 5000 g.mol⁻¹.

104

TABLEAU 14 CONCENTRATION, QUANTITE EXTRAITE EN POURCENTAGE MASSIQUE DU BOIS DE DEPART ET PERTE DES SUCRES NEUTRES EXTRAITS DANS LES HYDROLYSATS ULTRAFILTRES DE BOIS RESINEUX

	Concentration en g d'OS neutres par litre de rétentat	Quantité correspondante en g d'OS neutres pour 100g de bois sec	Perte en OS par rapport à l'hydrolysat brut
SW150 1kDa	5,77 ± 0,35 g.l ⁻¹	2,31 ± 0,14%	4%
SW150 3kDa	4,63 ± 0,27 g.l ⁻¹	1,85 ± 0,11%	24%
SW150 5kDa	3,45 ± 0,1 g.l⁻¹	1,38 ± 0,04%	44%
SW170 1kDa	7,72 ± 0,53 g.l ⁻¹	3,09 ± 0,21%	54%
SW170 3kDa	5,44 ± 0,15 g.l⁻¹	2,18 ± 0,06%	67%
SW170 5kDa	2,41 ± 0,10 g.l ⁻¹	0,97 ± 0,04%	86%

Le ratio molaire Man :Glu :Gal du mélange des bois résineux utilisés pour cette étude vaut 2,9:1:0,5 (Boucher, Chirat, et Lachenal 2014), cette valeur est comparable à ce que l'on trouve dans la littérature, (2,8:1:0,2) (Fengel and Wegener 1984). Ce même ratio calculé dans les hydrolysats ultrafiltrés extraits à 170°C est similaire (cf. Tableau 16). Toutefois, ce ratio peut varier en fonction des espèces et peut prendre les valeurs suivantes : 3-4 :1 :0,5-1 (Stålbrand et al. 2003), (E. Sjöström 1993). Il est également connu que deux types de structures existent avec une majorité de galactoglucomannanes (10 à 15% dans le bois) présentant un ratio molaire Man :Glu :Gal de 4 :1 :0,1, et une minorité (5 à 8%) avec un ratio de 3 :1 :1 (T. E. Timell 1967) (R. Rowell 2012).

En observant les ratios du Tableau 15, il apparaît deux interprétations :

- Les chaines de galactoglucomannanes extraites à 150°C ont des structures différentes de celles extraites à 170°C. Il y a plus de chaines avec un ratio molaire de 4 :1 :0,1.
- Les chaines de galactoglucomannanes extraites à 150°C ont les mêmes ratios molaires que celles extraites à 170°C, et dans ce cas, des galactanes et des mannanes de structure inconnue sont solubilisés.

Dans le bois résineux les ratios molaires des arabinoxylanes classiquement observés sont compris entre 1,3 :10 et 1,1 :10 (Ara:Xyl), ce qui semble être cohérent avec le ratio calculé dans le Tableau 16 (SW170), bien que ce dernier soit légèrement supérieur. Les quantités de xylanes dans les hydrolysats de résineux ultrafiltrés sont si faibles, que la quantité d'arabinoses liés à leurs chaines n'a pas été détectée après hydrolyse secondaire car 10 fois moins concentrée donc en dessous du seuil (après vérification aucune formation de furfural n'est observée, produit de dégradation des pentoses). A 150°C (Tableau 15), on observe que les ratios molaires Ara:Xyl et Man :Glu :Gal sont très éloignés des ratios actuellement connus et également de ceux trouvés à 170°C. De plus des traces de rhamnose oligomérique sont toujours détectées à 1,4 ±0,1 %, 1,5±0,1% et 1,63±0,03% de la masse totale des échantillons SW150 1kDa, 3kDa et 5kDa, en revanche on n'observe pas de rhamnose dans les hydrolysats extraits à 170°C. Ces résultats laissent présager que des pectines de type galactane, arabinane ou encore rhamnogalacturonane sont solubilisées à 150°C, puis hydrolysées en monomères à 170°C et éventuellement ensuite dégradés en composés furaniques en partie.

Il a donc été décidé de calculer la quantité de galactoglucomannanes et d'arabinoxylanes avec les ratios trouvés dans le bois de départ (qui sont très proches de ceux calculés dans les hydrolysats extraits à 170°C), soit Ara:Xyl 0,1 :1 et Man :Glu :Gal 2,9:1:0,5. Ainsi les quantités d'arabinose oligomérique ne provenant pas des arabinoxylanes et de galactose et mannose oligomériques ne provenant pas des galactoglucomannanes ont été également calculés par différence, ces résultats sont présentés dans les Tableau 15 et Tableau 16. On constate alors, Tableau 15, qu'avec cette méthode de calcul les galactanes solubles ont un volume hydrodynamique assez gros pour représenter 15% de la masse des oligomères en mélange dans le rétentat de 5kDa, il semble même que leur pourcentage augmente avec le seuil de coupure. Concernant les arabinanes qui représentent 13% des oligosaccharides dans l'hydrolysat brut à 150°C, leur proportion diminue avec l'augmentation du seuil de coupure, puis reste stable à partir de 3kDa.

	SW150	SW150 1kDa	SW150 3kDa	SW150 5kDa
Galactoglucomannanes/OS (calculés avec un ratio théorique de 2,9 : 1 : 0,5)	29,6	37,6	49,2	54,1
Man :Glu :Gal (ratio expérimental)	5,8 :1 :2,1	5,4 :1 :1,9	3,9 :1 :1,9	3,8 :1 :1,8
Mannanes/OS	19,2	17,4	10,8	11,3
Arabinoxylanes/OS (calculés avec un ratio théorique de 0,1 :1)	27,6	19,5	18,6	13,1
Ara:Xyl (ratio expérimental)	0,6 :1	0,7 :1	0,4 :1	0,6 :1
Arabinanes/OS	13,1	10,4	5,7	5,9
Galactanes/OS	10, 5	15,0	15,7	15,5

TABLEAU 15 POURCENTAGE ENTRE OLIGOSACCHARIDES (OS) CALCULES AVEC LES RATIOS MOLAIRES TROUVES DANS LE BOIS DE DEPART ET RATIOS MOLAIRES EXPERIMENTAUX DANS LES HYDROLYSATS DE RESINEUX EXTRAITS A 150° C

TABLEAU 16 POURCENTAGE ENTRE OLIGOSACCHARIDES (OS) ET RATIOS MOLAIRES EXPERIMENTAUX DANS LES HYDROLYSATS DE RESINEUX EXTRAITS A 170° C

	SW/170	SW170	SW170	SW170
	300170	1kDa	3kDa	5kDa
Galactoglucomannanes/OS	78	99	99	100
Man :Glu :Gal (ratio expérimental)	4,8 :1 :1,1	2,9 :1 :0,4	2,9 :1 :0,4	2,9 :1 :0,6
Arabinoxylanes/OS	22	1	1	0
Ara:Xyl (ratio expérimental)	0,2 :1	0 :1	0 :1	-

Par ailleurs, dans les rétentats sur 3 et 5 kDa des hydrolysats produits à basse température, on observe que les quantités de galactanes et d'arabinanes sont stables et dans un ratio molaire Gal :Ara de 2,3 :1 et 2,1 :1. En comparaison à une étude réalisée en 2004 (Stefan Willför et Holmbom 2004), ce ratio pour des arabinogalactanes solubles extraits d'Epicéa de Norvège et de Pin Sylvestre vaut respectivement 3,6 :1 et 3,8 :1. Il a été rapporté que ce ratio peut également avoir une valeur moyenne de 3 :1 dans le bois de résineux (R. Rowell 2012),(T. E. Timell 1967).

Tenant compte du ratio théorique des arabinogalactanes de Pin Sylvestre (Gal :Ara 3.8 :1), seulement 2.3 % de l'arabinose oligomérique y serait liés, et les 10,7% restant correspondraient à des arabinanes (SW150 brut). Nous choisissons le ratio du Pin Sylvestre car cette essence est l'essence majoritaire du mélange étudié. Les parts d'arabinose oligomérique, calculées grâce à ce ratio, lié aux arabinogalactanes et aux arabinanes valent respectivement dans les rétentats sur 1, 3, 5kDa: 3,3 et 7%, 3,5 et 2,2%, 3,4 et 2,5%. Dans ce cas de figure, on fait l'hypothèse que 100% des galactanes (la différence du galactose oligomérique lié aux galactoglucomannanes étant prise en compte comme décrit plus haut), sont des arabinogalactanes. Or, il existe dans les bois résineux des galactanes linéaires et ramifiés (liés ou non à des arabinanes également ramifiés) qui ne sont pas substitués avec des unités arabinose. Ce que l'on peut dire de manière générale, c'est que ces structures sont présentes dans les hydrolysats extraits à 150°C mais non détectées à 170°C. Pour leur isolation une filtration à 10 voire 20 kDa aurait sans doute été nécessaire, car ils sont liés aux galacturonanes pectiques du bois et ont donc un très gros volume hydrodynamique en comparaison aux mannanes et xylanes.

La proportion des galactoglucomannanes calculée avec le ratio molaire 2,9 :1 :0,5 (trouvé dans le mélange de bois de départ) ne fait qu'augmenter avec le seuil de coupure mais représente seulement 54% des oligomères en mélange à 5kDa, le poids moléculaire moyen des galactoglucomannanes extraits à 150°C ne permettent donc pas l'isolation à ce seuil de coupure. Dans l'optique où tous les mannanes proviennent de galactoglucomannanes (dont la structure diffère des chaines extraites à 170°C), alors la proportion de ces derniers est plus grande et augmenterait de 56 à 65% de 1 à 5kDa.

III.A.2.b. HYDROLYSATS DE FEUILLUS

Contrairement aux résineux, les xylanes de feuillus sont dépourvus d'arabinose (Tore E Timell 1964), cf. Figure 43 et Figure 44 présentant les compositions osidiques des rétentats ultrafiltrés sur des membranes de 500 Da, 1, 3 et 5 kDa hydrolysats de feuillus extraits à 170 et 150°C.



FIGURE 43 CONCENTRATION D'ARABINOSE, DE GALACTOSE, DE GLUCOSE, DE XYLOSE ET DE MANNOSE SOUS FORME OLIGOMERIQUE DANS LES HYDROLYSATS ULTRAFILTRES DE FEUILLUS A 170°C
Dans l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C, au vu des quantités non négligeables d'arabinose, de rhamnose et de galactose oligomériques (Figure 44) dans tous les rétentats excepté le 5 kDa, la présence d'arabinogalactanes, d'arabinanes, de rhamnoarabinogalactanes, ainsi que certains hétéropolysaccharides de pectines constitués d'arabinose est fortement suspectée.

Ces derniers représentent (rhamnose, arabinose et galactose oligomériques) en moyenne 21,4 ± 1,8 % des oligosaccharides en mélange dans l'hydrolysat brut et tous les rétentats, excepté le rétentat du 5kDa dans lequel les arabinanes sont complètement éliminés (Tableau 18). Etant donné le trop grand nombre d'inconnus et les hypothèses ne pouvant pas être vérifiées, il paraît difficile d'imaginer quelles structures d'arabinanes et de galactanes sont présentes, sachant qu'ils peuvent également être liés entre eux, de la même façon que les rhamnogalacturonanes (RG) peuvent également être liés de manière covalente à certains galactanes. De la même manière que dans les essences de résineux, la quantité de galactanes extraits à 150°C augmente avec le seuil de coupure des membranes, et celle des arabinanes diminue pour devenir nulle à 5kDa.



Figure 44 Concentration d'arabinose, de galactose, de glucose, de xylose et de mannose sous forme oligomerique dans les hydrolysats ultrafiltres de feuillus a $150^{\circ}C$

Le ratio Man :Glu des oligomères de bois feuillus utilisés pour cette étude est 1,2 :1 alors que cette valeur est généralement entre de 2 :1 et 1 :1 (Timell and Syracuse 1967), (Shimizu, Hon, et Shiraishi 1991), en particulier 1,6 :1 pour les peupliers. Les ratios molaires Man :Glu (Tableau 18) des hydrolysats extraits à 150°C en étant très éloignés, il est donc à noter que des structures de type xyloglucanes sont certainement présentes en quantité non négligeable. Dans le cas contraire, il est possible que ces glucanes résultent directement de la solubilisation de la cellulose du bois durant l'autohydrolyse (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008). Si l'on calcule les quantités de glucomannanes théoriques selon la méthode de Tunc en utilisant un ratio Man :Glu de 1,6 habituellement trouvé dans les bois feuillus (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008), on peut en déduire les proportions de glucanes en mélange (potentiellement des xyloglucanes) pouvant atteindre jusqu'à 30% en masse des oligomères solubilisés, voir Tableau 18. Par opposition, les hydrolysats à 170°C présentent une très grande majorité de xylanes (Figure 43) qui sont complètement isolés à 5kDa (Tableau 17), bien que la quantité retenue sur membrane ne représente plus que 2% de la masse d'oligomères totale extraite dans l'hydrolysat brut (Tableau 19). Les ratios molaires Man :Glu sont également, à contrario, proches du bois de départ et de ceux trouvés dans littérature, et donc les hydrolysats contiennent très peu de glucanes. A une température d'autohydrolyse plus élevée (170°C), comme vu précédemment, les polysaccharides du bois sont plus fortement dégradés et donc les oligosaccharides extraits avec une plus faible masse moléculaire moyenne car les pertes en sucres dues à la filtration membranaire observées sont plus grandes (Tableau 19). Et de la même façon que pour les résineux, on observe que les structures complexes et très ramifiées de pectines ou autres bois de cœur ou de compression (comportant rhamnose et arabinose oligomériques) ne sont pas présentes donc ont probablement été hydrolysées et ou dégradées. Seuls les galactanes sont présents en très faible quantité.

	HW170	HW170 500Da	HW170 1kDa	HW170 3kDa	HW170 5kDa
Glucomannanes/OS (calculés avec un ratio théorique de 1,6 : 1)	21,1	21,8	21,2	19,5	0,0
Man:Glu (ratio expérimental)	1,3:1	1,2:1	1,2:1	0,9:1	-
Glucanes/OS	2,2	2,5	2,8	5,3	0,0
Xylanes/OS	72,3	71,7	73,1	72,5	100,0
Galactanes/OS	4,0	4,1	2,9	2,7	0,0

TABLEAU 17 POURCENTAGE ENTRE OLIGOSACCHARIDES (OS) CALCULES AVEC DES RATIOS MOLAIRES THEORIQUES (JANSON 1974) ET RATIOS MOLAIRES EXPERIMENTAUX DANS LES HYDROLYSATS DE FEUILLUS EXTRAITS A 170°C

TABLEAU 18 POURCENTAGE ENTRE OLIGOSACCHARIDES (OS) CALCULES AVEC DES RATIOS MOLAIRES THEROQUES (JANSON 1974) ET RATIOS MOLAIRES EXPERIMENTAUX DANS LES HYDROLYSATS DE FEUILLUS EXTRAITS A 150°C

	HW150	HW150 500Da	HW150 1kDa	HW150 3kDa	HW150 5kDa
Glucomannanes/OS (calculés avec un ratio théorique de 1,6 : 1)	22,3	27,8	22,9	28,3	0,0
Man:Glu (ratio expérimental)	0,5:1	0,8:1	0,5:1	0,6:1	0:1
Glucanes/OS	17,4	11,5	16,9	16,4	29,9
Xylanes/OS	40,8	39,6	39,6	39,7	58,1
Arabinanes/OS	9,8	12,5	11,2	6,3	0,0
Galactanes/OS	9,6	8,7	9,5	9,4	12,0

TABLEAU 19 CONCENTRATION, QUANTITE EXTRAITE EN POURCENTAGE MASSIQUE DU BOIS DE DEPART ET PERTE DES SUCRES NEUTRES EXTRAITS DANS LES HYDROLYSATS ULTRAFILTRES DE BOIS FEUILLUS

	Concentration en g d'OS neutres par litre de rétentat	Quantité correspondante en g d'OS neutres pour 100g de bois sec	Perte en OS par rapport à l'hydrolysat brut
HW150 500 Da	3,64 g.l ⁻¹	1,5 %	18%
HW150 1kDa	3,28 ± 0,29 g.l ⁻¹	1,31 ± 0,12%	26%
HW150 3kDa	2,93 ± 0,11 g.l ⁻¹	1,17 ± 0,05%	34%
HW150 5kDa	0,36 ± 0,01 g.l ⁻¹	0,15 ± 0,01%	92%
HW170 500Da	8,90 g.l ⁻¹	3,56 %	58%
HW170 1kDa	6,40 ± 0,32 g.l ⁻¹	2,56 ± 0,03 %	69%
HW170 3kDa	3,65 ± 0,40 g.l ⁻¹	1,46 ± 0,04 %	82%
HW170 5kDa	0,50 ± 0,01 g.l ⁻¹	0,20 ± 0,00 %	98%

Au vu des résultats concernant la composition osidique des hydrolysats de bois de manière générale, on peut dire que plus la température d'autohydrolyse est élevée, plus le rendement est haut, mais plus les chaines solubilisées sont courtes et donc les pertes en oligosaccharides dues à l'ultrafiltration sont grandes. Les hydrolysats extraits à 170°C sont composés assez classiquement, majoritairement de xylanes chez les feuillus et de galactoglucomannanes chez les résineux. A contrario, à des températures plus faible, la diversité moléculaire et la complexité des hydrolysats augmente, avec la présence de galactanes, d'arabinanes et de glucanes avec un poids moléculaire suffisant pour faire partie des rétentats sur le plus haut seuil de coupure membranaire.

III.B. GROUPEMENTS DE SUBSTITUTION DES OLIGOSACCHARIDES SOLUBLES

III.B.1. OLIGOSACCHARIDES ACETYLES

III.B.1.a. HYDROLYSATS DE RESINEUX

Dans cette partie sont présentées les quantités d'acide acétique libre et lié sous forme de groupes acétyles, ainsi que le calcul du degré d'acétylation des oligosaccharides et plus précisément des hexosanes, en fonction du seuil de coupure des membranes utilisées pour l'ultrafiltration.

TABLEAU 20 RATIO MOLAIRE ENTRE GROUPE ACETYLE ET UNITE ANHYDROMANNOSE DANS LES OLIGOSACCHARIDES PRESENTS DANS LES AUTOHYDROLYSATS DE BOIS RESINEUX DE DEPART ET LEURS RETENTATS A DIFFERENTS SEUILS DE COUPURE

	Ratio molaire Man:Ac			
	Brut	1 kDa	3 kDa	5 kDa
150 °C	2,0:1	2,4:1	2,1:1	2,1:1
170 °C	2,2:1	2,8:1	3,3:1	2,6:1

On admet que seules les galactoglucomannanes et les galactanes sont acétylés, et non les 4-O-methylglucuronoarabinoxylanes (T. E. Timell 1967), pour le calcul du degré d'acétylation des hémicelluloses de résineux. Les ratios molaires dans les hydrolysats bruts (Tableau 20) sont très proches du ratio calculé dans le bois de départ qui vaut 2 :1. Les galactoglucomannanes natifs des bois résineux les plus communs ont un ratio molaire Man :Ac plus élevé : 4 :1 (Tore E Timell 1964), (R. Rowell 2012). On peut donc en déduire à priori que les mannanes du mélange étudié sont plus acétylés que la moyenne.

Ce ratio molaire est plus élevé de manière générale dans les hydrolysats extraits à 170°C plutôt qu'à 150°C, ceci pourrait être expliqué par la quantité non négligeable de galactanes dans ces derniers et le fait qu'ils sont potentiellement acétylés. Il semble également que les oligosaccharides dans les rétentats (donc avec des chaines plus longues) présentent des ratios molaires plus élevés que dans les hydrolysats bruts. Ceci pourrait être dû au fait que des oligomères à chaines courtes autre que des mannanes (suffisamment courts pour passer à travers les pores des membranes) sont acétylés, ainsi les ratios calculés dans les hydrolysats bruts sont faussés et sont en réalité plus élevés car tous les groupes acétyles présents dans l'hydrolysat brut ne proviendraient pas uniquement des mannanes. De plus, les oligosaccharides solubles dans l'eau extraits par hydrolyse ont généralement un degré d'acétylation plus faible que dans le bois brut (certains groupes acétyles sont hydrolysés en acide acétique) donc un ratio molaire Man :Ac plus élevé. Les quantités d'acide acétique total correspondent à la somme des quantités d'acide libre et liés, on constate que cette quantité diminue drastiquement entre les hydrolysats bruts et ultrafiltrés (Figure 45 et Figure 46), ce qui est expliqué par la perte en oligosaccharides, mais également par l'élimination quasi totale de l'acide acétique libre à partir du premier seuil de coupure de membrane. Les groupes acétyles liés sont en quantité presque identique dans les hydrolysats extraits à 150°C et ultrafiltrés, on constate tout de même une légère diminution, alors qu'à 170°C la diminution est plus forte, de la même manière que la perte en oligomères est plus grande.



FIGURE 45 CONCENTRATION EN G/L DE L'ACIDE ACETIQUE LIBRE, TOTAL (OBTENU PAR HYDROLYSE SECONDAIRE), ET LIE SOUS FORME DE GROUPE ACETYLE DANS LES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE RESINEUX EXTRAITS A 170°C

Ces résultats sont à corréler avec le degré d'acétylation moyen des galactoglucomannanes, cf. Figure 47. Les hémicelluloses du mélange de bois résineux utilisés dans cette étude présentent un D_{AC} légèrement plus élevé en comparaison à la littérature (Shimizu, Hon, et Shiraishi 1991), (T. E. Timell 1967), compris de manière générale entre 0,17 et 0,36.



Figure 46 Concentration en g/l de l'acide acetique libre, total (obtenu par hydrolyse secondaire), et lie sous forme de groupe acetyle dans les hydrolysats bruts et ultrafiltres de resineux extraits a 150° C

N

Dans cette étude les galactoglucomannanes ont un D_{AC} de 0,37 ± 0,04 dans le bois avant préhydrolyse, contre 0,33 pour les glucomannanes d'épicéa et 0,36 pour les galactoglucomannanes de pin (Tenkanen et al. 1993), (Tenkanen, Thornton, et Viikari 1995), (Lindberg, KG, et Svensson 1973). Le degré d'acétylation moyen des galactoglucomannanes suit la tendance du ratio molaire (Tableau 20). Les hydrolysats présentent des valeurs de D_{AC} proches de la littérature (McDonald-Wharry 2010), (Lundqvist et al. 2003). On observe une augmentation avec le seuil de coupure. Ce D_{AC} semble plus élevé dans les hydrolysats extraits à 150°C par rapport à ceux extraits à 170°C, en effet il est possible qu'à température plus élevée on déacétyle les oligosaccharides solubilisés, d'où également la quantité totale en acide acétique plus élevée dans l'hydrolysat brut SW170 (Figure 45).



FIGURE 47 DEGRE D'ACETYLATION DES GALACTOGLUCOMANNANES ET DES GALACTANES DANS LES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE RESINEUX

III.B.1.b. HYDROLYSATS DE FEUILLUS

Le ratio molaire Ac :10Xyl vaut 5,15 dans le bois de départ, résultat assez classique pour un mélange comparable (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008). On observe, à contrario des essences de résineux, que le ratio dans les hydrolysats bruts est plus élevé que dans le bois, cf. Tableau 21. Pour une autohydrolyse de 1h à 150°C, une étude trouve un ratio de 6 (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008), les xylanes extraits dans cette étude sont donc plus acétylés car il ne s'agit pas exactement des mêmes essences, ou bien d'autres oligosaccharides sont acétylés dans les hydrolysats. On n'observe pas d'évolution particulière avec l'effet de l'ultrafiltration, cependant il est intéressant de constater qu'à 170°C le ratio retombe à 5,2 dans le rétentat du 5kDa, rétentat essentiellement composé de xylanes (Tableau 17).

TABLEAU 21 RATIO MOLAIRE ENTRE UN GROUPES ACETYLES ET 10 UNITES ANHYDROXYLOSE DANS LES OLIGOSACCHARIDES PRESENTS DANS LES AUTOHYDROLYSATS DE BOIS FEUILLUS DE DEPART ET LEURS RETENTATS A DIFFERENTS SEUILS DE COUPURE

	Ratio molaire Ac : Xyl				
	Brut	500 Da	1 kDa	3 kDa	5 kDa
150 °C	6,8:10	7,2:10	6,1:10	6,9:10	7,3:10
170 °C	5,7:10	6,0:10	5,6:10	6,2:10	5,2:10

113

La quantité d'acide acétique totale dans chaque échantillon (Figure 48 et Figure 49), est liée à la quantité d'oligosaccharides en mélange, de la même manière que dans les hydrolysats de résineux.



Figure 49 Concentration en g/l de l'acide acetique libre, total (obtenu par hydrolyse secondaire), et lie sous forme de groupe acetyle dans les hydrolysats bruts et ultrafiltres de feuillus extraits a $170^{\circ}C$



FIGURE 48 CONCENTRATION EN G/L DE L'ACIDE ACETIQUE LIBRE, TOTAL (OBTENU PAR HYDROLYSE SECONDAIRE), ET LIE SOUS FORME DE GROUPE ACETYLE DANS LES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE FEUILLUS EXTRAITS A 150°C

Pour rappel, le mélange de bois feuillus utilisé durant ces travaux est constitué de peuplier à près de 47% en masse. Le calcul du D_{AC} des oligosaccharides présents dans les hydrolysats de feuillus est basé sur plusieurs études ayant prouvé qu'à la fois les glucomannanes et les methylglucuronoxylanes (D_{AC} compris entre 0,6 et 0,75) de peuplier solubles dans l'eau sont acétylés (Teleman et al. 2003), (Teleman et al. 2000). Comme vu dans la sous-section III.A.2.b. Hydrolysats de feuillus, les hydrolysats de feuillus extraits à 150°C présentent des quantités importantes de glucanes et glucomannanes (en moyenne 40,9 ± 2,5 % des oligomères).

On sait que ces hémicelluloses peuvent être acétylées (Johnson et al. 2017). Le D_{AC} des glucomannanes solubles extraits de peuplier est à 0,3 en moyenne (Teleman et al. 2003). Cependant, il a été démontré que 90% des acétates dans le bois de peuplier sont attachés à des unités xylopyranose et que la quantité d'acétate libérée dans les hydrolysats est corrélée positivement aux quantités de xylose, rhamnose et mannose (négativement pour le glucose et galactose) pour le peuplier (Johnson et al. 2017). Ceci implique que la part d'acétyles liés aux xyloglucanes et galactanes est faible pour cette essence. Cependant la part des acétyles liés aux mannanes ne doit pas être négligée.

Deux hypothèses sont donc à examiner à priori, soit d'une part les glucanes non liés aux glucomannanes proviennent de la cellulose du bois qui serait en partie dépolymérisée durant l'extraction (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008), soit d'autre part, on admet que la somme des quantités oligomériques de xylose, glucose et mannose détectées dans les hydrolysats sont directement liées à la solubilisation des hémicelluloses de structures suivantes :

- Xyloglucanes potentiellement acétylés
- Glucomannanes potentiellement acétylés
- 4-O-Methylglucuronoxylanes acétylés et xylanes acétylés

Il convient donc d'examiner deux cas de figure différents, les plus probables :

- Seuls les xylanes sont acétylés, dans ce cas 100% des groupes acétyles quantifiés sont utilisés pour le calcul du degré d'acétylation des xylanes nommé D_{AC1}
- Les xylanes et les glucomannanes sont acétylés, dans ce cas on attribue 90% des groupes acétyles aux xylanes et 10% aux glucomannanes. Le degré d'acétylation des xylanes sera alors nommé D_{AC2}.



Figure 50 Degre d'acetylation moyen des Xylanes dans le bois de depart (hardwood chips), les hydrolysats bruts et ultrafiltres de feuillus extraits a 170°C. Legende : 1 pour D_{AC1} , 2 pour D_{AC2}



FIGURE 52 DEGRE D'ACETYLATION MOYEN DES XYLANES DANS LE BOIS DE DEPART (HARDWOOD CHIPS), LES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE FEUILLUS EXTRAITS A 150°C. LEGENDE : 1 POUR D_{AC1} , 2 POUR D_{AC2}

Les hydrolysats de feuillus extraits à 150° C contiennent des xyloolgosaccharides avec des degrés d'acétylation plus élevés en comparaison à 170° C, résultats présentés dans les Figure 50 et Figure 52. Dans les deux cas, on ne peut pas dire que le degré de substitution des xylanes suive une évolution particulière au vu des écarts types. Il est à noter que les D_{AC2} calculés dans tous les hydrolysats sont en accord avec les degrés connus des xylanes de feuillus solubles (Teleman et al. 2000), alors que les degrés (D_{AC1}) sont anormalement élevés.



FIGURE 51 DEGRE D'ACETYLATION MOYEN DES GLUCOMANNANES DANS LE BOIS DE DEPART (HARDWOOD CHIPS), LES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE FEUILLUS EXTRAITS A 150°C ET 170°C

De plus, les degrés de substitution des glucomannanes présenté sur la Figure 51, sont similaires à ceux présentés dans une étude menée sur le bois de peuplier (Teleman et al. 2003). On peut donc imaginer que les xylanes ne sont pas les seuls oligosaccharides acétylés. Par ailleurs, dans les rétentats sur 5 kDa, la valeur du D_{AC2} n'a plus de sens car tous les mannanes sont éliminés. On constate alors qu'à 170°C le D_{AC1} redevient égal à celui du bois départ, ce résultat semble cohérent car dans ce rétentat 100% des oligosaccharides sont des xylanes. A l'inverse, le D_{AC1} des xylanes extraites à 150°C et ultrafiltrés sur 5kDa est anormalement élevé (0,91). Il faut dire que dans ce rétentat tous les glucomannanes ont été éliminés sous la membrane, et le pourcentage massique des glucanes et des galactanes s'élève respectivement à 30 et 12%. On peut donc y voir la confirmation qu'une partie de ces deux oligosaccharides est potentiellement acétylée surtout s'il s'agit de xyloglucanes et de galactanes pectiques.

Dans l'ensemble, il apparait que les xylanes de feuillus et les mannanes de résineux extraits par autohydrolyse dans cette étude soient légèrement plus acétylés que dans la littérature. Il semble qu'à haute température les oligosaccharides sont moins acétylés, ceci est probablement dû au fait que l'acidité de la réaction, exacerbée à haute température, peut désacétyler les oligomères déjà solubilisés. Il est important de mentionner que les hydrolysats de feuillus extraits à 150°C peuvent contenir des xyloglucanes acétylés et ceux de résineux des arabinogalactanes acétylés (ce résultat est confirmé par les résultats de spectrométrie de masse section III.D.2. Spectrométrie de masse : structure et composition des oligosaccharides).

III.B.2. QUANTIFICATION DES ACIDES HEXURONIQUES ET RATIOS MOLAIRES

Les Figure 53 et Figure 54 donnent l'histogramme des pourcentages massiques sur certains échantillons d'acide galacturoniques et 4-O-methylglucuronique. Cette dernière quantité semble diminuer avec l'augmentation du seuil de coupure dans les hydrolysats de résineux. Au contraire, cette quantité augmente avec le seuil de coupure dans les hydrolysats de feuillus extraits à 150°C, et semble rester stable entre 1 et 3kDa à 170 °C.



Figure 53 Pourcentage de la masse totale de certains echantillons des hydrolysats bruts et ultrafiltres de resineux en acide galacturonique et 4-O-methylglucuronique

Il semble donc, au vu des résultats obtenus dans la section III.A.2. Hydrolysats ultrafiltrés : influence de la taille de la membrane, que la quantité d'acide 4-O-methylglucuronique soit directement proportionnelle à la part des xylanes dans chaque échantillon, ce qui est logique. De manière générale, les pourcentages d'acide galacturonique sont supérieurs à ceux des acides 4-O-methylglucuronique et ne suivent pas de tendance évolutive particulière, au vu des écarts types.

Dans les échantillons SW150 et SW150 1kDa on détecte des traces d'acide glucuronique, respectivement 0,6 et 1% de la masse totale. Le ratio Ara :GlcA des arabinogalactanes solubles dans l'eau extraits du bois de cœur de l'épicéa de Norvège vaut 1:1 (ratio molaire 1 :0,8) et du pin Sylvestre 1 :0,2 (ratio molaire 1 :0,2) (Stefan Willför et Holmbom 2004). Si l'on calcule ce ratio à partir de la quantité d'arabinose oligomérique non lié aux arabinoxylanes, il vaut 1 :0,1, et est identique dans l'hydrolysat brut et ultrafiltré. A présent si l'on calcule, comme précédemment

dans la sous-section III.A.2.a. Hydrolysats de résineux, la quantité d'arabinose lié aux arabinogalactanes avec un ratio Gal :Ara de 3,8 (Pin Sylvestre), alors le ratio Ara :GlcA prend les valeurs suivantes 1 :0,4 dans l'hydrolysat brut et 1 :0,2 dans l'hydrolysat ultrafiltré sur 1kDa.



FIGURE 54 POURCENTAGE DE LA MASSE TOTALE DE CERTAINS ECHANTILLONS DES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE FEUILLUS EN ACIDE GALACTURONIQUE ET 4-O-METHYLGLUCURONIQUE

Les xylanes composant les bois feuillus sont généralement composés de 9 à 10 unités de xylose pour une unité acide 4-O-méthylglucuronique (Timell 1964), contrairement aux xylanes de résineux qui sont généralement plus acides avec 5 à 6 unités xylose pour un acide 4-O-methylglucyronique (T. E. Timell 1967), ceci correspond respectivement à des ratio molaires 4-O-Me GlcA:Xyl de 1,1-1 :10 chez les feuillus et 1,7-2 :10 chez les résineux. On voit dans le Tableau 22 que ces ratios sont comparables bien que légèrement inférieurs pour les résineux, alors que les hydrolysats de feuillus présentent des ratios molaires 2 à 3 fois plus faibles que ceux donnés dans la littérature. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que ces ratios sont calculés sur l'ensemble des xylanes dans les liqueurs, or il est tout à fait possible d'extraire lors de l'autohydrolyse, des xylanes (acétylés chez les feuillus et non acétylés chez les résineux) qui ne sont pas substitués avec des groupes acides 4-O-methylglucuronique, notamment des chaines de bas degré de polymérisation.

TABLEAU 22 RATIOS MOLAIRES 4-O-ME GLCA POUR 10 UNITES XYLOSE ET GALA POUR UNE UNITE RHAMOS
--

	4-O-Me GlcA: Xyl	GalA: Rha
SW150	1,6:10	2,0:1
SW150 1kDa	2,1:10	2,6:1
SW170 1kDa	1,3:10	-
SW150 3kDa	1,2:10	2,6:1
SW150 5kDa	1,3:10	2,2:1
HW150	0,6:10	2,2:1
HW150 1kDa	0,5:10	1,0:1
HW150 3kDa	0,6:10	1,1:1
HW170 1kDa	0,3:10	0,8:1
HW170 3kDa	0,3:10	1,3:1

118

Les acides galacturoniques solubilisés peuvent provenir des rhamnogalacturonanes. Ce type d'hémicelluloses est aussi bien présent dans les pectines de feuillus que de résineux, deux structures sont principalement connues (notées RG-I et RG-II). Ces acides peuvent également exister sous forme d'homogalacturonanes, ces derniers représentent 65% des pectines (Babbar et al. 2016) (Sista Kameshwar et Qin 2018a). Il est à noter qu'une étude assez récente prouve la présence de rhamnogalacturonanes (RG-I) et d'homogalacturonanes (HG, uniquement composés d'acide galacturonique) dans la pectine des parois primaires de xylem chez le Populus alba L. (Yang et al. 2020), essence qui constitue à 47% en masse le mélange étudiée dans ce projet. Dans le bois de peuplier le ratio molaire GalA : Rha peut s'élever jusqu'à 5 :1 (Simson et Timell 1978) pour les RG-II, et vaut 1:1 pour les RG-I. Les acides galacturoniques peuvent également être à l'origine des substituants sur certaines chaines de galactane dans les bois résineux (d'où leur pourcentage plus élevé dans les extraits à 150°C qu'à 170°C) et le rhamnose peut également provenir de rhamnoarabinogalactanes. Dans le Tableau 22, on constate que le ratio GalA :Rha moyen vaut 1,1 :1 dans les hydrolysats de feuillus ces résultats sont tout à fait en accord avec une étude précédemment menée (Z. Li et al. 2013), on peut penser que des RG-I sont présents (Yang et al. 2020). Le ratio molaire moyen observé est de 2,3 :1 dans les hydrolysats de résineux, cela laisse présager soit la présence d'HG en plus grande quantité et de RG-I, soit de RG-II (situé principalement dans la paroi primaire des cellules). Les RG-II ont été trouvés dans le Douglas (Thomas et al. 1987), cette essence représente 16% du mélange de résineux étudié, ces résultats sont donc assez cohérents.

En résumé, une extraction à basse température permet de conserver ou d'extraire en plus grande quantité les pectines du bois, et notamment les rhamnogalacturonanes. La structure des RG extraits dépend non pas de la sévérité de l'autohydrolyse mais de l'essence de bois. Les hydrolysats de feuillus comme ceux de résineux peuvent donc contenir des rhamnogalacturonanes de type I et II mais également des homogalacturonanes, en faible quantité en comparaison aux oligomères neutres. Comme trouvé dans la littérature, les xylanes de résineux sont plus acides que les xylanes de feuillus donc plus substitués en acide 4-Omethylglucyronique. Ces derniers semblent deux fois plus substitués dans les hydrolysats de feuillus extraits à 150°C en comparaison à une autohydrolyse à 170°C. Ce résultat est logique puisqu'à des conditions plus sévères un groupement de substitution acide hexuronique a plus de chance d'être hydrolysé. Enfin les traces alucuronique détectées cohérentes d'acide sont avec la présence d'arabinogalactanes suspectée dans la partie précédente.

III.C. IMPURETES DANS LES HYDROLYSATS DE BOIS

III.C.1. PRODUITS DE DEGRADATION

Les quantités de furfural et hydroxyméthylfurfural, produits de dégradation en conditions acides générés lors de l'autohydrolyse par les pentoses et hexoses (Figure 55), détectés par HPLC dans les hydrolysats de résineux sont similaires avec les résultats obtenus au laboratoire sur les mêmes mélanges d'essences (Deloule et al. 2017). C'est aussi le cas pour les hydrolysats de feuillus (Guigon 2019). On constate cependant que l'acide formique est assez élevé dans les hydrolysats extraits à 150°C, il est donc possible que la majorité du furfural se soit transformé. L'acide lévulinique n'a été détecté dans aucun échantillon. Par ailleurs, la nanofiltration et l'ultrafiltration membranaire permet d'éliminer 100% des contaminants. Cependant des traces de furfural et hydroxyméthyfurfural sont détectées dans les hydrolysats filtrés sur 500Da de feuillus extraits à 150°C, des temps de filtration plus longs pourraient palier au problème pour cet échantillon.



FIGURE 55 CONCENTRATION EN HYDROXYMETHYLFURFURAL, FURFURAL ET ACIDE FORMIQUE DANS LES HYDROLYSATS BRUTS

III.C.2. LIGNINE SOLUBLE

Une partie de la lignine est dépolymérisée pendant l'étape d'autohydrolyse (Curmi 2018). Il existe plusieurs méthodes pour quantifier la lignine (G.S. Chua et Wayman 1979), (INNVENTIA 2016), (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008). Etant donné que le furfural et l'hydroxyméthylfurfural absorbent à 280 nm (Marraccini et Kleinert 1959), il est préférable d'utiliser la méthode TAPPI UM 250 (Maekawa, lchizawa, et Koshijima 1989) qui tient compte uniquement de l'absorbance à 205nm et non à 280 nm. Par ailleurs, ces composés ne contribuent qu'à hauteur de 1% au maximum à la valeur d'absorbance mesurée à 205nm dans les hydrolysats, pour le mélange d'essences de feuillus étudié ici (Guigon 2019).

Le spectre d'absorbance de l'hydrolysat brut de résineux extrait à 170°C montre une large gaussienne avec un maxima à 280 nm, écrasé à 150°C (en effet, les quantités de furfural et hydroxyméthylfurfural sont quasi nulles dans le SW150, Figure 57). On constate également qu'à 200 nm et non à 205 nm (la démarcation par une ligne verticale rouge en pointillés correspondant à la valeur à 205 nm), un maximum est atteint pour les deux spectres et celui qui correspond au SW170 est plus élevé (Figure 57). On observe la même tendance pour les hydrolysats de feuillus, à la différence que l'absorbance est plus élevée dans les hydrolysats extraits à 150°C (Figure 58), ce qui est très bien illustré par la photo de la Figure 56. Ce type de spectres est assez classique, avec un maximum qui n'est pas atteint à 205 nm (Maekawa, Ichizawa, et Koshijima 1989).

On remarque également que la nanofiltration à 500 Da suffit à éliminer quasi complètement les composés phénoliques et aromatiques qui absorbent à 280nm dans l'autohydrolysat de bois feuillus obtenu à 170°C (Figure 58) alors que ce n'est pas le cas pour l'autohydrolysat obtenu à 150°C. Ce résultat est en accord avec les résultats de la section III.C.1. Produits de dégradation. Sur le spectre donné Figure 59, on observe l'influence de l'ultrafiltration sur l'absorbance des hydrolysats de résineux extraits à 150°C. Il faut aller jusqu'au seuil de 5 kDa pour complètement écraser le signal à 280 nm. Le maximum est progressivement décalé vers les plus faibles longueurs d'ondes avec un seuil de coupure croissant, ainsi l'absorbance à 205 nm baisse. Ce décalage vers des longueurs d'ondes plus faibles est dû à la diminution de la concentration en lignine soluble, et ce phénomène est particulièrement connu dans les bois résineux (Maekawa, Ichizawa, et Koshijima 1989).



Figure 56 Photo des hydrolysats bruts centrifuges, de gauche a droite : SW170, HW150 et HW170



FIGURE 59 SPECTRE UV-VIS DES ECHANTILLONS DE RESINEUX ULTRAFILTRES EXTRAITS A 150°C



FIGURE 57 SPECTRE UV-VIS DES HYDROLYSATS BRUTS DE RESINEUX EXTRAITS A 150°C ET 170°C



Figure 58 Spectre UV-VIS des hydrolysats de feuillus ultrafiltres sur 500Da extraits a 150°C et 170°C



FIGURE 60 CONCENTRATION EN LIGNINE SOLUBLE (AXE DE GAUCHE), PERTE EN LIGNINE PAR RAPPORT A LA QUANTITE DANS L'HYDROLYSAT BRUT (AXE DE DROITE), RATIO MASSIQUE DE LA QUANTITE DE LIGNINE SOLUBLE PAR RAPPORT A LA QUANTITE D'OLIGOSACCHARIDES NEUTRES (AXE DE DROITE)

Les concentrations en lignine soluble quantifiée par UV grâce à la méthode TAPPI UM 250 sont présentées pour chaque échantillon étudié dans ce chapitre sur la Figure 60. En comparaison à la littérature, la quantité extraite dans les hydrolysats bruts de feuillus extraits à 170°C semble légèrement plus élevée (Guigon 2019), (Beaufils 2019) et à 150°C plus faible (M. Sefik Tunc et van Heiningen 2008). En revanche les résultats obtenus pour les essences de résineux sont équivalents aux résultats d'études précédentes (Deloule et al. 2017). La concentration en lignine soluble diminue à hauteur de 90%, 87%, 91% et 83% (Figure 60) entre les hydrolysats bruts et ultrafiltrés sur 1kDa des échantillons SW170, SW150, HW170, HW150. La perte en lignine augmente avec le seuil de coupure. Toutes les filtrations sont réalisées dans les mêmes conditions, à l'exception de la pression relative appliquée qui change avec le seuil de coupure, afin d'obtenir un même pH au rétentat. Ces résultats signifient donc que la majorité des fragments de lignine solubilisés pendant l'autohydrolyse sont de faible masse moléculaire.

Etant données les pertes en sucres considérables avec la filtration membranaire, il serait plus pertinent d'observer l'évolution du ratio lignine/oligosaccharides, ce dernier est présenté Figure 60 par les croix bleues. On remarque que les meilleurs ratios (les plus faibles) sont obtenus dans les rétentats sur 1 kDa pour tous les échantillons sauf le HW150 (3kDa).

Ces ratios semblent augmenter aux plus hauts seuils de coupure (3 et 5 kDa), ceci signifie que l'on n'élimine alors plus de sucres que de lignine à partir de ces seuils. Il est à noter que la lignine soluble de si haut poids est plus difficilement soluble, sauf si elle est très acétylée comme les oligosaccharides. Par ailleurs, on sait que les oligosaccharides solubles d'hémicelluloses chargées, notamment les méthylglucuronoxylanes, constituent la part la plus importante des hémicelluloses liées de manière covalente aux fragments de lignine solubilisés lors de la préhydrolyse du bois (Yongchao Zhang et al. 2019), (Giummarella et Lawoko 2017). Ces résultats peuvent laisser penser que soit une petite part de lignine solubilisée est de haut poids moléculaire, soit elle est impliquée dans des complexes lignine hydrate de carbone (LCC). Les LCC ont une masse moléculaire et un volume hydrodynamique supérieurs aux mêmes hydrates de carbone non liés à la lignine. On pourrait même penser que les xylanes des hydrolysats de feuillus ne sont présents dans les rétentats sur 5 kDa que grâce à leur liaison à la lignine.

En conclusion, la lignine extraite à plus haute température est de plus faible masse molaire donc plus facilement éliminée par ultrafiltration. Au plus haut seuil de coupure la quantité de lignine retirée est plus grande dans les hydrolysats de feuillus que de résineux.

III.D. MASSE MOLAIRE DES OLIGOSACCHARIDES D'HEMICELLULOSES PRESENTS DANS LES AUTOHYDROLYSATS

Les hydrolysats de bois sont des mélanges de monomères et d'oligomères d'hémicellulose très polydisperses. La principale technique employée dans ce chapitre, l'ultrafiltration, consiste à fractionner l'hydrolysat en fonction de la taille et de la masse moléculaire des hydrates de carbone en mélange. Nous avons vu que cette technique permet notamment de séparer les mannanes et les xylanes à haut seuil de coupure dans les hydrolysats de résineux et de feuillus extraits à 170°C.

Dans cette partie est présentée l'analyse des hydrolysats de bois par chromatographie à perméation de gel couplée à un détecteur à diffusion de la lumière 3 angles (MALS dont le signal sera noté LS par la suite) et à un détecteur réfractométrique (dont le signal sera noté RI). Grâce aux équations données par le formalisme de Zimm (cf. Chapitre Matériels et Méthodes), la masse moléculaire moyenne pondérée en nombre (notée Mn) et en poids (notée Mw) ainsi que la dispersité sont calculées pour les hydrolysats bruts et leurs rétentats ultrafiltrés aux différents seuils de coupure étudiés dans ce chapitre. Le but est de comprendre dans quelle mesure l'ultrafiltration influe sur la masse moléculaire moyenne des oligosaccharides en mélange. Un troisième détecteur d'ultraviolet est également placé en sortie de colonne et fixé à 280nm afin d'observer l'absorbance de la lignine soluble ainsi que des composés aromatiques et furaniques présents dans l'hydrolysat. Cette analyse donnera accès à des informations précieuses concernant la distribution de masse des hémicelluloses solubilisées lors de l'autohydrolyse ainsi que de la lignine (analyse qualitative) pour compléter la compréhension des phénomènes mis en jeu lors de l'ultrafiltration et de l'impact de cette technique de purification sur la masse molaire des oligosaccharides retenus sur les membranes.

III.D.1. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE

III.D.1.a. SIGNAUX REFRACTOMETRIQUES DES CHROMATOGRAMMES D'EXCLUSION STERIQUE

Chromatogramme 12 et Chromatogramme Les 13 donnent les chromatogrammes obtenus après séparation par filtration de gel et détection par réfractométrie différentielle pour tous les hydrolysats et rétentats étudiés dans ce chapitre (bois résineux et feuillus). On observe en premier lieu que l'ultrafiltration semble plus efficace dans les hydrolysats de résineux (Chromatogramme 12) que de feuillus (Chromatogramme 13), et en particulier lorsqu'ils sont extraits à haute température (170°C) car le décalage des gaussiennes (signaux du réfractomètre) ainsi que l'élimination des populations de faible masse moyenne sont plus nets. Cette hypothèse est confirmée par les chromatogrammes d'exclusion stérique présentés en Annexe, Chromatogramme 18 (b) et (c). Le pic le mieux résolu à un temps de rétention de 43,4 min du signal lié au réfractomètre (Chromatogramme 12) de l'hydrolysat brut extrait à 150°C (courbe violette) correspond à une masse moyenne de 250 Dalton soit allant de 170 à 400 Daltons. Il est important de mentionner que de la lignine soluble de faible masse moléculaire est éluée en même temps, au vu du Chromatogramme 17 en Annexes, par conséguent le calcul des masses même avec le dn/dc choisi est faussé. L'épaulement à droite du pic correspond en moyenne à la N masse d'un monomère de sucre. Il semble que ces deux populations disparaissent 🐻 totalement avec l'ultrafiltration et ce à partir du plus petit seuil de coupure.

Ce même pic est retrouvé dans la distribution de masse Figure 62 (courbe jaune). Pour tous les autres chromatogrammes le temps de rétention du monomère se trouve à 41,2 min, le pic correspondant est éliminé dans les rétentats sur 3kDa. Les chromatogrammes des hydrolysats de feuillus bruts et ultrafiltrés obtenus à 150°C (Chromatogramme 13) montrent un épaulement toujours présent au sommet des gaussiennes même au plus haut seuil de coupure, alors qu'à 170°C au même seuil (5kDa), on observe un seul pic mieux défini, bien qu'il montre également plusieurs populations.



CHROMATOGRAMME 12 CHROMATOGRAMMES OBTENUS APRES SEPARATION PAR PERMEATION DE GEL ET DETECTION PAR REFRACTOMETRIE DIFFERENTIELLE DES HYDROLYSATS DE RESINEUX EXTRAITS A 170 (COLONNES SB 803 HQ EN SERIE AVEC SB 802,5 HQ) ET 150°C (2 COLONNES SB 806 HQ EN SERIE) ET DE LEURS RETENTATS SUR 1,3 ET 5KDA

On remarque également que la courbe du réfractomètre commence à monter bien plus tôt à 150°C qu'à 170°C, le signal apparaît comme non nul à 18 min de temps d'élution contre 24 min respectivement (cette comparaison n'est pas valable pour le Chromatogramme 12 car des colonnes différentes ont été utilisées pour la chromatographie des hydrolysats de résineux extraits à 150°C afin d'éviter des problèmes d'agrégats). Ce phénomène plus clairement observé sur le Chromatogramme 18 (a). Ceci signifie que les plus hautes masses éluées en premier sont plus grandes dans les hydrolysats extraits à 150°C et plus simplement que ces derniers sont constitués d'oligosaccharides de plus haut poids moléculaire qu'à 170°C. Cette observation est confirmée par le calcul d'une masse moyenne pondérée en poids notée Mw plus élevée de manière générale dans les hydrolysats extraits à 150°C (cf. Tableau 23).



CHROMATOGRAMME 13 CHROMATOGRAMMES OBTENUS APRES SEPARATION PAR PERMEATION DE GEL ET DETECTION PAR REFRACTOMETRIE DIFFERENTIELLE DES HYDROLYSATS DE FEUILLUS EXTRAITS A 170 ET 150°C ET DE LEURS RETENTATS SUR 500, 1000, 3000 ET 5000 DA (COLONNES SB 803 HQ EN SERIE AVEC SB 802,5 HQ)

127

On observe dans tous les échantillons une absorbance significative à 280nm sur l'ensemble du chromatogramme (cf. Annexe Chapitre III Chromatogramme 14 à Chromatogramme 17) et en particulier dans l'intervalle de temps de rétention où le signal du réfractomètre indique l'élution des hydrates de carbone. Ceci peut correspondre à de la lignine libre de même poids que les oligosaccharides extraits ou bien liée elle-même aux sucres. De plus, dans les hydrolysats extraits à 170°C on observe plusieurs pics après le temps de rétention du monomère ce qui indique la présence de fragments de lignine soluble de faible masse molaire, et de contaminants qui absorbent à cette longueur d'onde (comme notamment le furfural, présent en plus grande concentration dans les hydrolysats extraits à haute température).

Par ailleurs à 150°C, Chromatogramme 16 et Chromatogramme 17, on observe une forte absorbance en amont du signal du réfractomètre dans les hydrolysats bruts (courbes violettes), montrant ainsi qu'à plus faible température on extrait de la lignine soluble dont une partie est de très haut poids moléculaire, bien supérieur au poids moyen des hydrates de carbone extraits. Ainsi, il est essentiel de noter que les masses molaires moyennes calculées ne sont en aucun cas les masses molaires moyennes absolues des oligosaccharides en mélange mais bel et bien la masse molaire moyenne globale calculée par le détecteur à diffusion de lumière. La contribution de la lignine soluble au calcul de cette masse est d'autant plus grande dans les hydrolysats bruts, à priori plus le seuil de coupure d'ultrafiltration est élevé plus la masse calculée doit se rapprocher de la masse réelle des oligomères d'hémicellulose en mélange.

III.D.1.b. DISTRIBUTION ET CALCUL DES MASSES MOLAIRES

Les distributions de masse sont obtenues à partir du différentiel de la fraction massique. Il s'agit de la répartition des masses molaires le long du signal du réfractomètre. En chaque tranche du signal de différence d'indice de réfraction, on calcule la masse molaire correspondante (proportionnelle aux signaux de RI et de LS et calculée selon le formalisme de Zimm) ainsi que sa concentration, obtenue grâce à l'aire sous le signal du RI. On peut donc représenter en abscisse la masse molaire et en ordonnée la quantité relative correspondante. Ces distributions sont représentées Figure 61 et Figure 62 pour les échantillons de résineux extraits à 170 et 150°C bruts et leurs rétentats ultrafiltrés (respectivement Figure 63 et Figure 64 pour les hydrolysats de feuillus dans les Annexes du Chapitre III).

Comme expliqué dans le Chapitre intitulé Matériels et Méthodes, les signaux de LS des hydrolysats extraits à 150°C montrent de gros agrégats qui sortent non pas au volume mort de colonne mais juste avant le pic d'intérêt correspondant à l'échantillon étudié. Il se trouve que, de manière générale pour tous les échantillons comportant ces agrégats, le calcul de la masse molaire s'en trouve faussé et grandement surestimé. La masse correspondant à l'agrégat et la manière dont l'agrégat impacte le calcul de la masse et sa distribution, varie selon les échantillons. Les rayons de giration et les masses molaires (Mw) calculés en prenant uniquement la fenêtre de temps de rétention correspondant à l'agrégat peuvent varier respectivement de 25 à 60 nm et de 10⁵ à 10⁷ Daltons. Il s'agit d'une grosse approximation puisque le dn/dc choisi est celui des hémicelluloses en solution et utilisé pour le calcul des oligosaccharides et non le dn/dc d'un enchevêtrement de N molécules.

Or la limite d'exclusion des colonnes utilisées est de 2.10⁶ Daltons, et on sait que les hémicelluloses natives du bois n'excèdent pas, à priori, un DP de 300 et une masse de 60kDa (Lundqvist et al. 2002), (S Willför et al. 2003b). On sait également que lors de l'extraction (autohydrolyse) une partie des hémicelluloses est dépolymérisée pour être solubilisée. Il paraît donc évident que la masse moyenne des hémicelluloses extraites soit plus faible que la masse moyenne de ces hétéropolysaccharides dans le bois initial. De plus, des polysaccharides si gros sont difficilement solubles dans l'eau, bien que très acides et ramifiés. Il est donc possible d'envisager que les molécules responsables de ce collage de l'agrégat à la colonne, se conforment en pelote et leurs interactions avec la colonne peuvent être de différentes natures (affinités chimiques, gêne stérique...). Il paraît donc peu probable d'observer des populations de masse molaire supérieure à 105, pour une température d'hydrolyse autour de 150°C (Reyes et al. 2013), cette observation est vérifiée par les résultats obtenus grâce à la spectrométrie de masse (section suivante). En effet, dans les hydrolysats de feuillus extraits à 150°C, la majorité des échantillons ultrafiltrés présentent des structures de m/z inférieur à 5000 Daltons, et aucune masse supérieure à 7000 Daltons n'est détectée.



Figure 61 Distribution de masse moleculaire des hydrolysats de resineux extraits a 170° C et de leurs retentats sur 1,3 et 5kDa

Par ailleurs ces agrégats représentent un très faible pourcentage massique de chaque échantillon, autrement dit le signal du réfractomètre est très faible, mais non nul, lors de son élution, si bien qu'il n'est pas pertinent d'intégrer l'aire sous le pic correspondant à l'agrégat. Toutefois cette masse fait partie de l'échantillon et donne une information sur les oligosaccharides présents dans les hydrolysats extraits à 150°C.

Au vu de ces résultats, il convient de comprendre que le LS voit une masse réunissant plusieurs molécules qui pourraient former un amas qui se coince dans les pores de la colonne, et donne une masse très éloignée de la réalité. Cet agrégat vient donc perturber le calcul de la masse tout au long de l'élution car la masse molaire calculée en chaque tranche du chromatogramme, après avoir atteint un minimum lors de sa décroissance exponentielle, remonte de manière continue jusqu'à la fin de l'élution. Il a donc été décidé d'adopter une méthode particulière pour traiter et analyser les données obtenues pour les hydrolysats extraits à 150°C, permettant de s'affranchir au mieux des agrégats. Afin de présenter au mieux et de manière détaillée les essais supplémentaires mis en place afin de palier à ces problèmes d'agrégats ou du moins d'améliorer la compréhension de ces phénomènes observés dans les hydrolysats de résineux et de feuillus extraits à 150°C, le lecteur peut se référer à la section II.D.1.c. Chromatographie d'exclusion stérique (gel filtration) dans le Chapitre intitulé Matériels et Méthodes. Les résultats obtenus par cette méthode du Mw, Mn ainsi que de la dispersité de chaque échantillon sont présentés dans le Tableau 23.

Les distributions de masses molaires (Figure 62 et Figure 64 en Annexes du Chapitre III) correspondent aux hydrolysats de résineux et de feuillus extraits à 150°C. Ils montrent la présence de saccharides dont le Mw est supérieur à celui des hydrolysats extraits à 170°C (Figure 61 et Figure 63). En effet, ils contiennent des oligomères plus longs et/ou plus volumineux et plus acides (deuxième partie de ce chapitre), potentiellement liés de manière covalente entre eux mais également à la lignine, et contiennent également de la lignine soluble de haut poids moléculaire. Il est important de noter que la lignine présente un signal d'absorption UV sous le pic de LS correspondant à l'agrégat pour tous les échantillons extraits à 150°C. Dans une étude de 2011 (Mehmet Sefik Tunc et van Heiningen 2011), il est expliqué que la contribution de la lignine n'intervient que dans les faibles masses molaires.

De manière générale, les masses molaires en nombre et en poids calculées sont plus grandes dans les hydrolysats extraits à faible température à la fois pour les feuillus et les résineux, bien que sous-estimées avec la méthode employée (Tableau 23). En effet la masse molaire moyennée en poids des hydrolysats de feuillus et résineux extraits à 150°C et 145°C (1h, L/B=3,7 et 5) est rapportée comme étant respectivement proche de 7.10³ g/mol et 5.10⁴ g/mol (Mehmet Sefik Tunc et van Heiningen 2011; Reyes et al. 2013). La présence d'amidon de bois ou bien « d'oligo-glucose » a été toutefois mentionnée avec des masses de l'ordre de 100 kDa dans les hydrolysats de feuillus extraits à faible température (Mehmet Sefik Tunc et van Heiningen 2011), bien que l'on ne connaisse pas la proportion de cette masse dans l'hydrolysat, dans le bois elle est de quelques pourcents en masse. Pour rappel, les rétentats ultrafiltrés des hydrolysats de feuillus à 150°C présentent une importante quantité de glucanes, ce qui n'est pas le cas dans les hydrolysats analogues de résineux.



FIGURE 62 DISTRIBUTION DE MASSE MOLECULAIRE DES HYDROLYSATS DE RESINEUX EXTRAITS A 150° C et de leurs retentats sur 1,3 et 5kDa

La distribution de masse de l'hydrolysat de résineux extrait à 150°C semble assez cohérente avec une étude qui applique une autohydrolyse à 145°C pendant 75 min avec un ratio L/B de 5 (contre un L/B de 4 et 1 h de traitement dans la présente étude) sur du Pinus Radiata (Reyes et al. 2013), du moins par rapport à la présence de molécules de très haute masse molaire (entre 10⁵ et 10⁷), même si on ne sait pas si ces masses proviennent bien des hémicelluloses solubles extraites ou de leur enchevêtrement. Dans cette étude n'est pas détaillée la perturbation de la mesure par la présence de complexes lignine hydrates de carbone. La polydispersité élevée est également caractéristique de ce type d'échantillons (Reyes et al. 2013), car non seulement on extrait des oligosaccharides plus gros mais on dégrade moins les plus faibles masses solubilisées qu'à 170°C.Concernant les hydrolysats extraits à 170°C, les masses calculées sont cohérentes avec la littérature (Deloule et al. 2017), et montrent des dispersités plus faibles (Tableau 23), ce qui confirme le fait que l'ultrafiltration avec les seuils de coupure étudiés est plus efficace dans ce type d'hydrolysat. De plus la majeure partie des masses se trouvent en dessous de 1,5 kDa selon les distributions (Figure 61 et Figure 63).

TABLEAU 23 MASSE MOLECULAIRE MOYENNE PONDEREE EN MASSE (Mw), EN NOMBRE (Mn) et indice de polydispersite (D) des hydrolysats de feuillus et de resineux bruts et ultrafiltres (retentats) extraits a 170 et 150 °C

	Mw (kDa)	Mn (kDa)	D (Mw/Mn)
SW170	1,5 ± 3%	0,7 ± 2%	2,0 ± 1%
SW170 1 kDa	3,1 ± 3%	2,2 ± 5%	1,4 ± 1%
SW170 3 kDa	4,0 ± 4%	2,7 ± 8%	1,5 ± 1%
SW170 5 kDa	4,7 ± 7%	3,2 ± 7%	1,5 ± 1%
HW170	1,3 ± 2%	0,6 ± 4%	2,4 ± 5%
HW170 500 Da	2,0 ± 5%	1,7 ± 7%	1,3 ± 2%
HW170 1 kDa	2,5 ± 4%	2,0 ± 8%	1,3 ± 1%
HW170 3 kDa	3,2 ± 3%	2,6 ± 4%	1,2 ± 1%
HW170 5 kDa	4,2 ± 5%	3,7 ± 5%	1,1 ± 5%
SW150	4,1 ± 2%	1,4 ± 5%	2,8 ± 6%
SW150 1 kDa	4,9 ± 5%	2,9 ± 4%	1,7 ± 2%
SW150 3 kDa	5,1 ± 3%	3,3 ± 3%	1,6 ± 3%
SW150 5 kDa	5,7 ± 2%	3,8 ± 3%	1,5 ± 2%
HW150	2,6 ± 4%	1,2 ± 2%	2,1 ± 2%
HW150 500 Da	3,2 ± 5%	2,2 ± 7%	1,5 ± 1%
HW150 1 kDa	3,4 ± 2%	2,5 ± 3%	1,4 ± 4%
HW150 3 kDa	4,6 ± 2%	3,3 ± 3%	1,4 ± 5%
HW150 5 kDa	5,4 ± 8%	4,7 ± 6%	1,1 ± 2%

La polydispersité montre qu'il y a plusieurs populations distinctes et en particulier dans les hydrolysats extraits à 150°C. De plus certaines chaines sont très acétylées mais aussi substituées d'acides méthylglucuroniques dont le ratio molaire peut difficilement être déterminé de manière fiable. Enfin, une partie de ces chaînes est ramifiée et liée de manière covalente avec d'autres et aussi des morceaux de lignine solubles. Il est par conséquent trop simplificateur de parler de degré de polymérisation moyen qui pourrait être calculé à partir de la masse moyenne des échantillons. Ces explications montrent qu'à une même masse on peut très bien observer un oligomère très substitué mais de DP plus bas qu'une chaine longue et linéaire faiblement acétylée par exemple. On peut donc penser que les chaines de galactoglucomannanes extaits à 150°C sont de plus haut DP que les xylanes de feuillus chargés d'acides hexuroniques extraits à température identique. Cette hypothèse est à mettre en lien avec par la perte en OS plus faible chez les résineux que chez les feuillus engendrée par l'ultrafiltration à 150°C.

III.D.2. SPECTROMETRIE DE MASSE : STRUCTURE ET COMPOSITION DES OLIGOSACCHARIDES

Le Spectre 2 représente le spectre de masse de l'hydrolysat brut de bois résineux extrait à 170°C. Le pic de plus haute intensité correspond à une structure de DP 4, entouré d'un DP 3 et 5 constituée d'unités anhydrohexose et non acétylée. La majeure partie des oligosaccharides se trouvent à un m/z inférieur à 4000 Daltons. La plus haute masse (détectée à 4593), à une intensité très faible, correspond à une chaine (probablement de galactoglucomannane) d'hexosane acétylée avec la structure suivante : DP 26 comportant 8 groupes acétyle. Ceci correspond à un ratio molaire Man:Ac de 3,3 :1, ratio beaucoup plus proche de la littérature que le ratio calculé dans la partie III.B.1. Oligosaccharides acétylés. Le spectre de son analogue provenant de feuillus montre une masse maximum calculée à 3788 daltons et détectée à un m/z de 3790 correspondant à une pentosane composé de 21 unités monomériques substitué avec 11 groupes acétyle et 2 acides 4-0methylglucuronique. Cette chaine présente un ratio molaire Ac :Xyl de 5,2 :10 et 4-0-Me GlcA: Xyl de 1 :10, ce qui semble également plus cohérent vis-à-vis de la littérature que les ratios calculés, et ceci pour des raisons évidentes exposées dans les parties III.B.1. Oligosaccharides acétylés et III.B.2. Quantification des acides hexuroniques. A intensité identique (environ 7000), le pic observé sur le Spectre 2 à un m/z de 3699 dans l'échantillon comparable de résineux correspond à un DP 21 avec 6 groupes acétyle.

Concernant l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C, à intensité identique que le plus haut pic dans l'hydrolysat de feuillus extrait à 170°C (à un m/z de 3790 et une intensité de 7000), le pic de plus haut m/z vaut 5412, et correspond à une masse calculée de 5408 daltons qui est à l'origine d'une structure de type pentosane à 31 unités substituée de 14 groupes acétyle et 5 acides 4-O-methylglucuronique. Le pic de m/z le plus élevé se trouve à 6712 daltons dans cet hydrolysat. Ces résultats montrent bien que les hydrolysats extraits à 150°C contiennent des oligosaccharides de plus haute masse, et confirment les résultats obtenus dans la partie précédente.



SPECTRE 2 SPECTRE DE MASSE DE L'HYDROLYSAT BRUT DE RESINEUX EXTRAIT A 170°C

Les Spectre 4 et Spectre 5 (spectres de masses des hydrolysats bruts et ultrafiltrés de feuillus extraits à 150 et 170°C) illustrent également bien cette observation. Par ailleurs, en comparant les spectres des Spectre 3 et Spectre 5, on constate, ce qui semble moins évident dans le Tableau 24 (qui ne donne que quelques pics de plus haute intensité), que la masse moyenne semble plus élevée dans les hydrolysats de résineux que de feuillus extraits à la même température (170°C).

Les degrés d'acétylation moyens sont proches de ceux calculés dans la partie III.B.1. Oligosaccharides acétylés, de l'ordre de 0,3 pour les mannanes de résineux et 0,7 pour les xylanes de feuillus. Ils sont toutefois légèrement plus élevés de manière générale dans tous les échantillons. Ceci semble logique car lors de la manipulation des hydrolysats et lors de l'hydrolyse secondaire nécessaire pour le calcul du degré d'acétylation, il est possible d'une très petite partie d'acide acétique ait été perdue.



Spectre 3 Spectre de masse des retentats de l'hydrolysat de bois resineux extrait a 170°C sur 1, 3 et 5kDa

Concernant les ratios molaire 4-O-Me GlcA: Xyl dans les hydrolysats de feuillus, les structures correspondantes aux principaux pics de masse présentent des ratios en moyenne autour de 1 :10 (pouvant aller de 1,2 :10 à 0,9 :10), ce qui semble beaucoup plus cohérent que les ratios calculés précédemment (*III.B.2.* Quantification des acides hexuroniques), faussés car ne prenant pas en compte le fait que plus de la moitié des xylanes acétylés ne sont pas substitués avec des groupements 4-O-Me GlcA (résultats de spectrométrie).

Il est à noter que l'on observe, en plus petite quantité, des structures de type :

- P_n H_m OAc_p
- P_nH_m4-O-Me GlcA OAc_p
- P_n H_m Rha 4-O-Me GlcA OAc_p
- $GalA/GlcA_n H_m OAc_p$
- Rha_m GalA_n OAc_p
- Pn 4-O-Me GlcAx GalA/GlcAm OAcp
- Pn GalA/GlcAm Rha OAcp ou Pn GalA/GlcAm OAcp

Ces structures sont en accord avec les résultats obtenus dans les parties III.A. Composition osidique des autohydrolysats et III.B.2. Quantification des acides hexuroniques et ratios molaires, notamment la présence d'arabinogalactanes et de xyloglucanes acétylés et de rhamnogalacturonanes. D'autre part, observer des structures de type P_n H_m Rha 4-O-Me GlcA OAc_p (principalement dans les hydrolysats de feuillus) semble cohérent avec une étude précédemment réalisée au laboratoire (Sanglard 2013) et donne également la possibilité que certains oligomères d'hémicelluloses soient liés entre eux de manière covalente.



SPECTRE 4 SPECTRE DE MASSE DES RETENTATS DE L'HYDROLYSAT DE BOIS FEUIILLUS EXTRAIT A 150°C SUR 500DA, 1, 3 ET 5KDA



Spectre 5 Spectre de masse des retentats de l'hydrolysat de bois feuillus extrait a 170°C sur 500da, 1, 3 et 5kda

En conclusion, la spectrométrie de masse est un outil plus précis que la chromatographie liquide ou gazeuse haute performance en ce qui concerne la détermination du degré de substitution d'un polysaccharide, mais plus complexe pour faire de la quantification ou une moyenne sur un mélange.

Tableau 24 Principaux pics obtenus par spectrometrie de masse des hydrolysats de feuillus extraits a 150 et 170° C ultrafiltres, et de resineux brut et ultrafiltres extraits a 170°C

	Pics classés par ordre décroissant d'intensité		
	Pentosanes	Hexosanes	
	P4	H ₄	
SW170	P ₄ OAc	H₅	
	P ₃ 4-O-MeGlcA	H ₃	
	5.11.04	H ₁₀ OAc ₄	
	P ₂ H ₃ OAC ₂	H ₁₁ OAc ₄	
SW170 1 kDa	P ₂ H ₃ OAC ₃	H ₉ OAc ₃	
	P ₂ H ₄ OAC ₃	H ₁₂ OAc ₄	
		H ₁₃ OAc ₄	
SW170 3 kDa	P7 4-O-MeGIcA	H ₁₂ OAc ₄	
	P ₂ H ₃ OAC ₃	H ₁₄ OAc ₄	
		H ₁₃ OAC ₄	
SW170 5 kDa	Non détecté		
		$H_{12}OAc_4$	
		Η ₄	
HW170		H ₇	
	Pz OAc 5	H.	
HW170 1 kDa	$P_0 OAc_0$		
	Pr OAcr		
HW170 5 kDa		Non détecté	
	P ₉ 4-O-IVIEGICA UAC ₅		
	P ₆ 4-O-MeGICA OAC ₃		
HW150 500Da	P ₆ 4-O-MeGICA OAC ₄	H ₆	
		H ₈	
	P7 4-O-MeGICA OAC5	H5	
	P94-O-MeGICA OAC5	H ₉	
HW150 1 kDa	P ₈ 4-O-MeGICA OAC ₅		
	P74-O-MeGICA OAc5	H ₈	
	P ₆ 4-O-MeGICA OAc ₄	H ₁₁ OAC ₃	
	P ₉ 4-O-MeGICA OAc ₅		
HW150 3 kDa	P ₈ 4-O-MeGICA OAc ₅		
	P ₁₀ 4-O-MeGIcA OAc ₅	H ₁₄ OAc ₄	
	P114-O-MeGIcA OAc5	H ₁₂ OAc ₃	
	P ₉ 4-O-MeGIcA OAc ₅	H ₁₄ OAc ₄	
	P ₁₀ 4-O-MeGlcA ₂ OAc ₆	H ₁₂ OAc ₄	
HW150 5 kDa	P ₈ 4-O-MeGIcA OAc ₅	H ₁₄ OAc ₅	
	P ₉ 4-O-MeGIcA OAc ₆	H ₁₅ OAc ₅	
	P ₁₀ 4-O-MeGlcA ₂ OAc ₇	H ₁₆ OAc ₅	
	P ₁₁ 4-O-MeGlcA OAc ₆	H ₁₈ OAc ₆	

137

CONCLUSIONS CHAPITRE III

De manière générale, selon la taille et la nature d'hémicellulose ciblées, la purification par ultrafiltration à appliquer varie. Globalement la perte en oligosaccharides induite par la filtration membranaire est conséquente (autour de 90% sur 5kDa dans les hydrolysats extraits à haute température) et un compromis doit être réalisé en fonction du niveau de pureté désiré. Également, si l'on souhaite isoler certaines familles d'hémicelluloses, comme les methylglucuronoxylanes acétylés chez les feuillus et les galactoglucomannanes acétylés chez les résineux, il est préférable d'effectuer une autohydrolyse à 170°C et d'ultrafiltrer en utilisant une membrane de 5kDa. Les hydrolysats extraits à plus faible température donnent de plus faible rendements, mais sont plus concentrés en oligosaccharides chargés et pectiques, comme les rhamnogalacturonanes et les arabinogalactanes tous deux acétylés. Les oligosaccharides qu'ils contiennent sont également plus acétylés et de plus haut poids moléculaire qu'à 170°C, donc difficilement fractionnables par nature avec l'ultrafiltration. Ce constat est illustré par des écarts de perte en oligomères plus rapprochés entre différents seuils de coupure et une polydispersité globalement plus élevée qu'à 170°C. De manière générale on retire la totalité des impuretés de faible masse ainsi que les monomères avec une simple filtration sur 500 daltons.

Les tendances de concentration et de distribution de masse molaire données par les oligosaccharides sont semblables pour la lignine. Autrement dit à faible température la lignine soluble a une masse moléculaire plus élevée et une concentration plus faible qu'à 170°C et est donc moins facilement éliminée par ultrafiltration aux faibles seuils de coupure. Les quantités extraites sont largement supérieures dans les hydrolysats de feuillus que de résineux, et pourtant le pourcentage de lignine retirée par ultrafiltration dans les rétentats sur 5 kDa est plus grand en comparaison aux rétentats de bois résineux (respectivement à 150 et 170°C : 90 et 95 contre 99%). Par ailleurs, les chromatogrammes d'absorption UV montrant une absorbance dans le même intervalle de temps de rétention que le signal dédié aux hémicelluloses et le fait que le ratio entre lignine soluble et oligosaccharides augmente avec le seuil de coupure peut laisser penser que des complexes lignine hydrates de carbone sont solubilisés dans les liqueurs de bois étudiées.

138

ANNEXES CHAPITRE III



Chromatogramme 15 Chromatogrammes superposes obtenus par detection UV a 280nm en chromatographie a permeation de gel des hydrolysats bruts et ultrafiltres de feuillus extraits a $170^{\circ}C$



CHROMATOGRAMME 14 CHROMATOGRAMMES SUPERPOSES OBTENUS PAR DETECTION UV A 280NM EN CHROMATOGRAPHIE A PERMEATION DE GEL DES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE RESINEUX EXTRAITS A 170°C



CHROMATOGRAMME 17 CHROMATOGRAMMES SUPERPOSES OBTENUS PAR DETECTION UV A 280NM EN CHROMATOGRAPHIE A PERMEATION DE GEL DES HYDROLYSATS BRUTS ET ULTRAFILTRES DE RESINEUX EXTRAITS A 150°C



Chromatogramme 16 Chromatogrammes superposes obtenus par detection UV a 280nm en chromatographie a permeation de gel des hydrolysats bruts et ultrafiltres de feuillus extraits a $150^{\circ}C$



FIGURE 63 DISTRIBUTIONS DE MASSE DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 170°C BRUT (HW170) ET DE SES RETENTATS SUR 500DA, 1, 3 ET 5KDA



FIGURE 64 DISTRIBUTIONS DE MASSE DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 150°C BRUT (HW150) ET DE SES RETENTATS SUR 500DA, 3 ET 5KDA



Chromatogramme 18 Chromatogrammes obtenus par chromatographie d'exclusion sterique sur colonnes S200 en serie avec une Speptide eluees en eau salee a 0,1M couplee a un refractometre, des hydrolysats de feuillus bruts et ultrafiltres (a) et (b), et de resineux brut et ultrafiltres (c)

143

CHAPITRE IV

DETOXIFICATION ET MODIFICATION DES HYDROLYSATS DE BOIS PAR ADSORPTION AU CHARBON ACTIF ET HYDROLYSE ENZYMATIQUE

e chapitre concerne la modification des hydrolysats de bois par adsorption au charbon actif, parfois combiné à de l'ultrafiltration et par hydrolyse enzymatique. Ces trois traitements impactent de manière différente la composition des hydrolysats de bois. Comme vu précédemment l'ultrafiltration membranaire permet de fractionner les oligosaccharides et la lignine soluble en fonction de la masse moléculaire et d'éliminer les produits de dégradation des sucres ainsi que les monomères dans les rétentats.

L'emploi de charbon actif est connu pour la détoxification des hydrolysats de bois, car en fonction de sa surface spécifique, de sa nature et de son traitement physico-chimique, il possède une affinité plus ou moins grande avec les composés aromatiques (comme le furfural par exemple), les composés phénoliques (comme les fragments de lignine solubilisés lors de l'autohydrolyse), mais aussi avec les hydrates de carbone dans une moindre mesure. Il a donc été choisi de tester différentes concentrations de charbon actif après avoir déterminé un charbon actif préférentiel à l'aide d'essais préliminaires sur les hydrolysats de feuillus. Les hydrolysats de feuillus présentent en effet une plus forte concentration de lignine et d'impuretés. C'est pourquoi il a été choisi d'effectuer une sélection sur ce type d'hydrolysat, en supposant par la suite que le charbon actif choisi aurait une efficacité comparable dans les hydrolysats de résineux. Cette technique a également été combinée avec de la filtration membranaire afin d'atteindre de plus hauts niveaux de pureté.

Comme vu dans le Chapitre 1, les hydrolysats extraits à 150°C sont très polydispersés et présentent une grande diversité moléculaire, avec une plus grande proportion d'oligomères acides, qui peuvent également remplir une fonction prébiotique intéressante (Nascimento et al. 2013). Seulement ces hydrolysats contiennent des oligosaccharides de masse moléculaire trop élevée si l'on considère l'application prébiotique (Deloule 2017), c'est pourquoi il a été décidé de tester l'hydrolyse enzymatique sur quelques échantillons afin d'évaluer son intérêt pour diminuer le DP moyen d'un échantillon.

IV.A. TRAITEMENT AU CHARBON ACTIF

IV.A.1. SELECTION DU CHARBON ACTIF

Dans cette première sous-partie l'hydrolysat brut de feuillus extrait à 170°C est nommé « Référence » car il constitue l'échantillon étudié pour constater l'impact du charbon actif. Le charbon actif est directement ajouté à l'hydrolysat brut qui a été au préalable filtré sur 0,2µm et centrifugé. Quatre charbons actifs ont été testés :

- Les Norit 12x20 mesh provenant de lignite et Norit 10x20 mesh provenant de charbon bitumineux, avec respectivement une surface spécifique de 650 m²/g et 1000 m²/g
- Le Desotec Organosorb 10k1 avec une surface spécifique d'environ 950 m²/g
- Le Chemviron F400 12x40 mesh d'une surface spécifique de 1050 m²/g



FIGURE 66 CONCENTRATION EN G/L EN MONOSACCHARIDES ET OLIGOSACCHARIDES TOTAUX DANS L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 170°C BRUT (REFERENCE) ET TRAITE AVEC QUATRE CHARBONS ACTIFS DIFFERENTS DONT LE NOM COMMERCIAL CONSTITUE LA LEGENDE



FIGURE 65 QUANTITE EN LIGNINE SOLUBLE EN G/L DANS L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 170°C BRUT (REFERENCE) ET TRAITE AVEC QUATRE CHARBONS ACTIFS DIFFERENTS DONT LE NOM COMMERCIAL CONSTITUE LA LEGENDE

Les Figure 65 et Figure 66 présentent respectivement les quantités en lignine soluble et en hydrates de carbones dans l'échantillon de référence et dans ce même échantillon traité avec 20g/l de charbon actif (50 ml de soluté traité 2h par agitation sur plateau oscillant à température ambiante). On observe que le charbon actif Norit 12x20 est celui qui a plus la grande capacité d'adsorption de lignine soluble, à l'inverse le Desotec semble dénué d'intérêt pour le but recherché ici Tableau 25. Pour rappel le ratio entre lignine soluble et oligosaccharides dans l'hydrolysat brut vaut 26%, l'amélioration la plus marquée est donc apportée par le Norit 12x20. Il semble que la meilleure sélectivité entre lignine soluble et hémicelluloses solubles soit obtenue avec le Norit 10x20, car seulement 2% de la quantité totale de sucres en solution sont adsorbés. Toutefois, la même pureté est obtenue avec les deux charbons actifs Norit.

TABLEAU 25 PERTES EN LIGNINE SOLUBLE ET EN HYDRATES DE CARBONE INDUITS PAR LES TRAITEMENTS AVEC DIFFERENTS CHARBONS ACTIFS A UNE CHARGE DE 20G/L. *CAPACITE D'ADSORPTION EN G DE LIGNINE ADSORBEE POUR 100 G DE CHARBON ACTIF ET SELECTIVITE ENVERS LA LIGNINE ** PERTE EN LIGNINE PAR RAPPORT A LA SOMME DES PERTES EN LIGNINE ET EN OLIGOSACCHARIDES

	Norit 12x20	Norit 10x20	Chemviron F400	Desotec 10k1
Lignine retirée (%)	51	42	42	17
Ratio lignine/oligosaccharides (%)	14	15	16	23
Perte en oligomères due au charbon actif (%)	8	1	3	6
Perte totale en hydrates de carbone (monomères et oligomères en %)	8	2	4	6
Capacité d'adsorption en g/100g *	14	11	11	4
Sélectivité envers la lignine (%) **	87	96	90	74
Pureté en hémicelluloses (% massique)	89,6	88,7	83,9	88,3

Au vu de ces résultats préliminaires, le Norit 12x20 a été choisi pour la suite de l'étude car le principal but est d'éliminer la lignine, et la perte en oligosaccharides engendrée par ce traitement reste nettement inférieure en comparaison aux pertes engendrées par la filtration membranaire.

IV.A.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CHARBON ACTIF

IV.A.2.a. LIGNINE ET PRODUITS DE DEGRADATION

Dans cette partie des concentrations en charbon actif Norit 12x20 plus grandes ont été appliquées à différents hydrolysats en comparaison à l'étude préliminaire. Deux charges, à 30 et 50 g de charbon actif par litre d'hydrolysat, ont été choisies grâce à la revue de plusieurs études (Z. Wang et al. 2016; Montané et al. 2006; Sanglard 2013; Deloule 2017). La Figure 67 montre l'influence de la charge en charbon actif Norit 12x20, sur le spectre UV visible de l'hydrolysat traité. La Figure 68 montre l'influence de la charge en charbon actif sur la concentration en lignine dans l'hydrolysat traité.



FIGURE 67 SPECTRE UV-VISIBLE DES HYDROLYSATS TRAITES AVEC LE CHARBON ACTIF NORIT 12*20

Dans l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C, on retire plus de 98% de la lignine initialement présente dès 30g/l, alors que pour l'hydrolysat de résineux extrait à même température la diminution est inférieure (87%). De manière générale, ces valeurs sont cohérentes par rapport à la littérature (Z. Wang et al. 2016; Montané et al. 2006). On constate un gain mineur entre 30 et 50 g/l de charbon actif dans tous les hydrolysats. Celui-ci est particulièrement marqué dans l'hydrolysat de feuillus extrait à 170°C qui présente au départ une plus grande quantité de lignine soluble initiale. Son spectre UV-visible Figure 67 (*HW170 50*), montre effectivement un maximum d'absorbance autour de 280 nm (longueur d'onde autour de laquelle les produits de dégradation des sucres absorbent) et un maximum plus haut que tous les autres hydrolysats traités avec la même charge et même à une charge inférieure.

On remarque de manière générale que la capacité d'adsorption de lignine par le charbon actif est deux fois plus haute dans les hydrolysats de feuillus que de résineux. On sait qu'un pH acide favorise l'adsorption de la lignine (Gütsch et Sixta 2011a). Paradoxalement le pH des hydrolysats de résineux est légèrement plus acide que celui des feuillus, 3,5 contre 3,6 à même température d'extraction. Néanmoins, les oligosaccharides et la lignine des bois feuillus sont souvent plus acétylés que dans les bois résineux.



FIGURE 68 QUANTITE EN LIGNINE SOLUBLE ET POURCENTAGE DE LIGNINE RETIREE DANS TOUS LES HYDROLYSATS DE BOIS BRUTS ET TRAITES AVEC LE CHARBON ACTIF NORIT 12*20

Il doit être mentionné que dans les hydrolysats de feuillus se forment des particules de charbon actif durant le traitement par agitation magnétique. Ceci est simplement dû au frottement permanent des granulés de charbon actif pendant la durée du traitement. Afin d'éviter la formation de particules, certains traitements ont été réalisés à l'aide d'un plateau oscillant, néanmoins le phénomène persiste. Pour éliminer au mieux ces particules sans dénaturer l'hydrolysat, des centrifugations successives ont été réalisées ainsi que des filtrations successives sur des seuils allant de 8 à 0,2 µm de taille de pores. Cette difficulté n'a pas été rencontrée dans les hydrolysats de résineux, et nous n'avons pas d'explication à ce phénomène.

Les ratios lignine/oligosaccharides sont également drastiquement abaissés, voir Tableau 26, et se trouvent être beaucoup plus faibles dans les hydrolysats de résineux extrait à 170°C, pour lesquels la sélectivité du charbon actif envers la lignine soluble est supérieure aux autres hydrolysats. Il est à noter qu'à l'image de la quantité de lignine retirée, ces ratios sont similaires aux deux charges différentes de charbon actif appliquées. On remarque enfin que plus la charge en charbon actif est grande et plus la température d'extraction est faible, plus la sélectivité baisse, et que cette dernière est globalement plus faible dans les hydrolysats de feuillus. TABLEAU 26 RATIO MASSIQUE ENTRE LIGNINE SOLUBLE ET OLIGOSACCHARIDES ET SELECTIVITE ENVERS LA LIGNINE (* PERTE EN LIGNINE PAR RAPPORT A LA SOMME DES PERTES EN LIGNINE ET EN OLIGOSACCHARIDES) DANS TOUS LES HYDROLYSATS DE BOIS FEUILLUS ET RESINEUX BRUTS ET TRAITES AU CHARBON ACTIF.

	SW170	SW150	HW170	HW150
Ratio Brut	13,2 ± 0,5	20,5 ± 0,6	25,8 ± 1,5	62,8 ± 0,3
Ratio traité à 30 g/l	0,8 ± 0,01	3,2 ± 0,1	2,6 ± 0,04	$2,5 \pm 0,2$
Sélectivité envers la lignine (%)*	90%	85%	78%	61%
Ratio traité à 50 g/l	0,7 ± 0,02	-	$2,0 \pm 0,4$	2,4 ± 0,1
Sélectivité envers la lignine (%)*	86%	-	73%	60%

La détoxification des hydrolysats de bois passe aussi par l'élimination des composés toxiques, tel que le furfural, mais aussi d'autres produits de dégradation des sucres tels que l'hydroxyméthylfurfural, les acides organiques de faible masse moléculaire (acide acétique, acide formique, acide lévulinique...) qui sont des inhibiteurs biologiques. L'adsorption de ces composés par le charbon actif est présentée dans le Tableau 27. Il est intéressant de constater que ce charbon actif a une capacité d'adsorption suffisante pour éliminer la totalité du furfural initialement présent dans l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C et de feuillus à 150°C. Elle est en revanche insuffisante pour détoxifier à 100% l'hydrolysat de feuillus extrait à 170°C qui présente la plus forte teneur initiale en furfural (cf. Tableau 27). Dans tous les hydrolysats, 100% de l'hydroxyméthylfurfural est éliminé à 50g/l de charbon actif. Il semble que l'acide formique soit légèrement plus impacté que l'acide acétique par le traitement. En effet, dans les liqueurs obtenues à 170°C, la sélectivité du charbon actif est plus élevée envers l'acide formique que l'acide acétique, voir Tableau 27. Ces résultats sont globalement cohérents avec la littérature en ce qui concerne les hydrolysats de feuillus (Villarreal et al. 2006), et semblent élevés pour les hydrolysats de résineux (Deloule 2017).

TABLEAU 27 QUANTITES EN G/L EN HYDROXYMETHYLFURFURAL (HMF), FURFURAL (F), ACIDE FORMIQUE (AF) ET ACIDE ACETIQUE (AA) DANS TOUS LES HYDROLYSATS DE BOIS FEUILLUS ET RESINEUX BRUTS ET TRAITES AU CHARBON ACTIF. NOMMES PRODUITS DE DEGRADATION OU IMPURETES.

	HMF (g/l)	Réduction	F (g/l)	Réduction	AF (g/l)	Réduction	AA (g/l)	Réduction	Réduction totale
SW170	0,26 ± 0,06	-	0,34 ± 0,10	-	0,62 ± 0,10	-	1,25 ± 0,10	-	-
SW170 30	0,02 ± 0,001	02.2%	n.d.	1009/	0,51 ± 0,05	47.70/	1,05 ± 0,03	160/	220/
Selectivité	40,8%	92,3%	44,2%	10070	7,8%	17,770	7,1%	10%	JZ 70
SW170 50	n.d.	100%	n.d.	1009/	0,42 ± 0,06	22.20/	0,93 ± 0,14	25.69/	A A 9/
Selectivité	38,8%	100%	38,8	100%	12,5%	32,3%	9,9%	23,0%	44 %
HW170	0,10 ± 0,03	-	0,58 ± 0,06	-	0,54 ± 0,07	-	2,96 ± 0,30	-	-
HW170 30	n.d.	100%	0,03 ± 0,002	04 90/	0,38 ± 0,02	20.6%	2,82 ± 0,14	4 70/	259/
Selectivité	43,6%	100%	41,4%	94,0%	12,9%	29,0%	2,1%	4,7%	23%
HW170 50	n.d.	100%	0,01 ± 0,002	00.20/	0,31 ± 0,03	42.69/	2,21 ± 0,40	25.20/	240/
Selectivité	37,6%	100%	36,9%	98,3%	16,0%	42,0%	9,5%	25,3%	31%
HW150	0,02 ± 0,001	-	0,02 ± 0,001	-	0,29 ± 0,05	-	0,80 ± 0,10	-	-
HW150 30	n.d.	1000/	n.d.	1000/	0,17 ± 0,01	44.00/	0,44 ± 0,02	44.000	540/
Selectivité	34,9%	100%	34,9%	100%	14,5%	41,6%	15,7%	44,9%	51%
HW150 50	n.d.	1000/	n.d.	1000/	0,15 ± 0,04	40.00/	0,38 ± 0,06	50.5%	500/
Selectivité	33,2%	100%	33,2%	100%	16,1%	48,3%	17,5%	52,5%	58%

151

IV.A.2.b. PERTE ET PURETE EN SACCHARIDES

La Figure 69 présente la perte en oligosaccharides en fonction de la perte en lignine soluble dans les différents hydrolysats traités au charbon actif. Une étude (Montané et al. 2006) menée sur l'adsorption de lignine soluble au charbon actif Norit 12x40 (donc comparable à celui utilisé ici), a utilisé comme matière première un hydrolysat de coquilles d'amandes extrait à 179°C. Il se trouve que la distribution de masse ainsi que la composition osidique et chimique de ces hydrolysats, sont comparables à celles de l'hydrolysat de feuillus extrait à 170°C, avec des oligosaccharides de masse moléculaire moyenne principalement située entre 1 et 5kDa et un pourcentage de contaminants (lignine plus produits de dégradation des sucres) global d'environ 30% (dans le HW170 ce pourcentage vaut 28%). Cette dernière étude (Montané et al. 2006) trouve des pourcentages de retrait de lignine et des pertes en oligosaccharides correspondantes, comparables à ceux présentés Figure 69. La baisse de sélectivité entre 170°C et 150°C est bien traduite par une perte en oligosaccharides quasiment deux fois plus élevée dans les hydrolysats de feuillus (cf. Tableau 29 et Figure 69). On constate de manière générale que les pertes en sucres sont beaucoup moins élevées dans les hydrolysats de résineux.



FIGURE 69 PERTE EN OLIGOSACCHARIDES EN % REPRESENTE EN FONCTION DE LA PERTE EN LIGNINE SOLUBLE EN % PAR RAPPORT A L'HYDROLYSAT DE DEPART

L'impact du traitement au charbon actif est détaillé pour chacun des cinq oses principaux (arabinose, galactose, glucose, xylose et mannose sous forme oligomérique en g/l) dans tous les hydrolysats dans le Tableau 29. Cet impact est également présenté pour les acides hexuroniques ainsi que le rhamnose totaux en g/l, dans les hydrolysats extraits à 150°C Tableau 29.

On adsorbe globalement plus d'oligosaccharides que de monosaccharides, et ceci se traduit par une diminution de ratio OS/S_{totaux} présenté pour chaque échantillon Tableau 29. La gêne stérique fait partie des facteurs d'adsorption, tout comme la solubilité du soluté adsorbé. Ces résultats sont en accord avec des études récemment menées sur les hydrolysat de résineux et de feuillus (Deloule 2017; Z. Wang et al. 2016). Ce phénomène est moins marqué dans les hydrolysats de résineux.

Les arabinogalactanes, les glucanes et les xylanes sont adsorbés en majorité dans l'hydrolysat de feuillus produit à 150°C. En comparaison ce sont les arabinoxylanes et les galactanes qui sont les plus impactés dans l'hydrolysat de résineux extraits à 170°C. Dans les hydrolysats de feuillus extraits à 170°C ce sont les xylanes et les glucomannanes qui sont les oligosaccharides les plus impactés par le traitement au charbon actif. On remarque, toutes essences confondues, que les hydrolysats produits à 150°C présentent des pertes en oligosaccharides plus grandes comparativement à ceux extraits à 170°C. Ce phénomène pourrait être dû à l'acidité des oligosaccharides, plus élevée à faible température d'extraction.

Dans les hydrolysats de feuillus et de résineux extraits à 150°C, les pertes en rhamnose et acide galacturonique dues au traitement au charbon actif à 30g/l, peuvent être corrélées à l'adsorption de rhamnogalacturonanes (Tableau 28). En effet on retire respectivement 63% et 67% de rhamnose et d'acide galacturonique dans la liqueur de bois feuillus, contre 18% et 32% dans la liqueur de bois résineux. Les ratios molaires GalA :Rha semblent donc conservés dans l'hydrolysat de feuillus mais pas dans celui de résineux. De la même manière, la perte d'acide 4-OMéthylglucuronique confirme l'adsorption des methylglucuronoxylanes.

(g.l ⁻¹)	SW150	SW150 30	HW150	HW150 30
Acide galacturonique	0,38 ± 0,01	0,26 ± 0,08	0,30 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Acide glucuronique	0,07 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.
Acide 4- <i>O-</i> Méthylglucuronique	0,30 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Rhamnose	0,17 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Tableau 28 Concentrations totales en acides hexuroniques et en rhamnose dans les hydrolysats de feuillus et de resineux extraits a 150° C, bruts et traites au charbon actif a 30g/L

La perte totale des sucres chargés (Tableau 28, hydrolysats extraits à 150°C) due à l'ajout de 30g/l de charbon actif vaut 32% dans l'hydrolysat de résineux et 67% dans celui de feuillus. En comparaison, la perte totale de sucres neutres dans ces hydrolysats respectifs (Tableau 29) vaut 16% et 63% (résineux et feuillus produits à 150°C). On peut donc dire que globalement, les sucres chargés sont plus impactés par le traitement au charbon actif que les sucres neutres dans les hydrolysats extraits à 150°C. Ces observations ont déjà été faites et peuvent être liées à l'adsorption de complexes lignine hydrates de carbone de petite taille (Shen et al. 2013), car les oligosaccharides liés à la lignine de manière covalente dans les hydrolysats de bois sont majoritairement des oligomères de sucres chargés d'acide hexuroniques (Yongchao Zhang et al. 2019). Toutefois il est intéressant de noter que les proportions (pourcentages massiques) en sucres chargés sont identiques avant et après traitement au charbon actif à 30g/l dans l'hydrolysat de feuillus, alors qu'elles diminuent dans les hydrolysats de résineux.

La pureté en hémicelluloses (monosaccharides et oligosaccharides) est nettement meilleure dans les hydrolysats de résineux (en comparaison aux hydrolysats de feuillus) et globalement plus élevée à 170°C qu'à 150°C quel que soit l'essence étudiée (cf. Tableau 29). Il en va de même pour le pourcentage en oligosaccharides récupéré par rapport à l'hydrolysat de départ. Il est important de mentionner que la pureté en oligosaccharides est évidemment plus faible avec seulement un traitement au charbon actif en comparaison à un échantillon purifié avec du charbon actif et une filtration membranaire (cf. partie IV.B. Combinaison charbon actif et ultrafiltration), du fait des quantités importantes de monosaccharides en solution.

Pour conclure, les hydrolysats de feuillus présentent des concentrations en lignine soluble et en contaminants (impuretés) plus élevées à ceux des hydrolysats de résineux. Toutes températures d'extraction confondues, la quantité de lignine soluble extraite dans les liqueurs de feuillus est plus de deux fois supérieure à celle des liqueurs de résineux. Il en va de même pour les produits de dégradation tels que le furfural et l'acide acétique. Par conséquent, le résultats de différents traitements au charbon actif est moins satisfaisant que pour les liqueurs de résineux. Paradoxalement, le pourcentage de retrait des impuretés et la capacité d'adsorption des impuretés par les granulés de charbon actif sont supérieurs dans les hydrolysats de feuillus en comparaison aux hydrolysats de résineux. Cependant, dans ces derniers la sélectivité envers la lignine est plus élevée, et la sélectivité envers les produits de dégradation des sucres est similaire pour chaque composé dans les deux essences dans les mêmes conditions de sévérité d'autohydrolyse. Elle se traduit par une plus grande adsorption d'oligosaccharides et de monosaccharides par le charbon actif dans les hydrolysats de feuillus. Et par conséquent la pureté en hémicelluloses et notamment en oligosaccharides s'en voit réduite en comparaison aux hydrolysats de résineux.

(g.l ⁻¹)	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	Total OS neutres	Perte OS	Perte MS	Ratio OS/S _{Totaux}	Pureté en hémicelluloses neutres	Pourcentage récupéré
SW150	0,95 ± 0,03	0,85 ± 0,02	0,41 ± 0,01	1,53 ± 0,05	2,36 ± 0,05	6,10 ± 0,20	-	-	71,9 %	84,0 ± 1,1%	100
SW150 30	0,81 ± 0,03	0,72 ± 0,03	0,36 ± 0,03	1,18 ± 0,07	2,05± 0,13	5,12 ± 0,19	16,0 %	15,2 %	71,7 %	97,6 ± 1,3	84,1
SW170	0,69 ± 0,03	1,99 ± 0,04	1,88 ± 0,01	2,95 ± 0,30	9,33 ± 0,22	16,62 ± 0,61	-	-	69,8 %	83,5 ± 2,7	100
SW170 30	0,10 ± 0,03	1,58 ± 0,04	1,87 ± 0,50	1,73 ± 0,06	9,29 ± 0,12	14,57 ± 0,28	12,4 %	8,3 %	68,8 %	92,6 ±	89,1
SW170 50	0,12 ± 0,03	1,49 ± 0,02	1,81 ± 0,25	1,68 ± 0,21	8,92 ± 0,04	14,02 ± 0,89	15,7 %	13,1 %	69,1 %	93,3 ±	85,1
HW150	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,01	1,15 ± 0,03	1,81 ± 0,03	0,61 ± 0,14	4,42 ± 0,27	-	-	86,8 %	57,4 ± 0,4%	100
HW150 30	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,34 ± 0,03	1,46 ± 0,09	66,9 %	35,8 %	77,2 %	76,2 ±	37,1
HW150 50	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,25 ± 0,01	1,35 ± 0,05	69,6 %	39,0 %	76,6 %	77,3 ±	34,6
HW170	0,16 ± 0,07	0,82 ± 0,01	2,10 ± 0,05	14,77 ±1,27	2,65 ± 0,06	20,50 ± 1,47	-	-	83,7 %	72,0 ± 3,6%	100
HW170 30	0,15 ± 0,01	0,61 ± 0,03	1,61 ± 0,04	10,02 ± 0,11	1,85 ± 0,04	14,25 ± 0,23	30,5 %	2,6 %	78,5 %	83,4 ±	74,3
HW170 50	0,15 ± 0,06	0,51 ± 0,06	1,15 ± 0,05	9,36 ± 0,07	1,11 ± 0,05	12,28 ± 0,79	40,1 %	16,1 %	78,6 %	84,9 ±	63,9

TABLEAU 29 CONCENTRATION EN UNITES OLIGOMERIQUES EN G/L D'ARABINOSE, DE GALACTOSE, DE GLUCOSE, DE XYLOSE ET DE MANNOSE DANS TOUS LES HYDROLYSATS BRUTS ET TRAITES AU CHARBON ACTIF. TOTAL EN OLIGOMERES (OS), PERTE EN OLIGOMERES (OS), EN MONOMERES (MS) ET PART OLIGOMERIQUE DES ECHANTILLONS

IV.A.2.c. INFLUENCE SUR LA MASSE MOLAIRE MOYENNE DES OLIGOMERES

Après l'analyse de la sous partie précédente, il est intéressant d'essayer de comprendre quelle taille moyenne d'oligosaccharides est particulièrement favorisée pour l'adsorption au charbon actif. Pour ce faire, comme dans le Chapitre 1, la GPC-MALS nous a permis d'obtenir les masses molaires moyennes de chaque hydrolysat traité pour comparaison à l'hydrolysat brut. Ces résultats sont présentés Tableau 30 pour les hydrolysats extraits à 170°C et Tableau 31 pour ceux extraits à 150°C.

	SW170	SW170 30	SW170 50	HW170	HW170 30	HW170 50
Mw (kDa)	1,46 ± 3%	1,19 ± 4%	0,94 ± 4%	1,27 ± 2%	1,12 ± 3%	1,10 ± 1%
Mn (kDa)	0,74 ± 2%	0,50 ± 4%	0,41 ± 4%	0,54 ± 4%	0,43 ± 1%	0,49 ± 1%
D (Mw/Mn)	1,98 ± 1%	2,39 ± 4%	2,29 ± 3%	2,36 ± 5%	2,61 ± 3%	2,26 ± 1%

TABLEAU 30 MASSES MOLECULAIRES MOYENNES, EN NOMBRE ET EN POIDS, ET POLYDISPERSITE (D) DES HYDROLYSATS DE RESINEUX ET DE FEUILLUS EXTRAITS A $170^{\circ}C$ BRUTS ET TRAITES AU CHARBON ACTIF

Au vu du chromatogramme de l'hydrolysat de résineux extrait à 150°C brut (signal violet) et traité à 30g/l de charbon actif représenté par le signal jaune (Chromatogramme 19), il est clair que les plus gros oligosaccharides ne semblent pas adsorbés par le charbon actif car le calcul de la masse molaire moyenne de la tranche impactée (courbe jaune) allant de 38 min à 43 min vaut 1700 Da. La tranche de masses molaires la plus impactée par le traitement semble débuter autour de 1000 Daltons (environ 43 min), on observe effectivement que l'intensité (proportionnelle à la concentration en sucres) de la courbe jaune est inférieure à celle de la courbe violette entre 38 min et 43 min d'élution (Chromatogramme 19). Ceci est cohérent avec plusieurs études dont une précédemment menée au laboratoire (Deloule 2017), (Montané et al. 2006). Etant donné que l'encombrement stérique joue un rôle majeur dans la sélectivité d'adsorption, ces résultats sont à priori cohérents.

	SW150	SW150 30	HW150	HW150 50
Mw (kDa)	4,10 ± 4%	4,20 ± 5%	2,60 ± 4%	4,40 ± 4%
Mn (kDa)	1,44 ± 5%	1,50 ± 2%	1,20 ± 2%	1,31 ± 2%
D (Mw/Mn)	2,84 ± 2%	2,80 ± 2%	2,10 ± 2%	3,36 ± 2%

Tableau 31 Masses moleculaires moyennes, en nombre et en poids, et polydispersite (D) des hydrolysats de resineux et de feuillus extraits a 150° C bruts et traites au charbon actif



FIGURE 71 DISTRIBUTION DE MASSE MOLAIRE DE L'HYDROLYSAT DE RESINEUX EXTRAIT A 170°C, BRUT ET TRAITE AU CHARBON ACTIF A 50G/L



Figure 70 Distribution de masse molaire de l'hydrolysat de feuillus extrait a 170°C, brut et traite au charbon actif a 30g/L

Les Figure 70 et Figure 71 présentent les distributions de masse molaire des hydrolysats extraits à 170°C de feuillus et de résineux brut et traités. Ils illustrent bien une diminution de la masse molaire moyenne des échantillons avec le charbon actif, en accord avec les résultats du Tableau 30, phénomène plus marqué chez les résineux que les feuillus. Il apparaît qu'à l'inverse la masse molaire moyenne des échantillons traités au charbon actif, augmente à plus faible température d'extraction (voir Tableau 31). Ceci peut être expliqué par le fait que la masse molaire moyenne des oligosaccharides en mélange est, à contrario des hydrolysats extraits à 170°C, largement supérieure à la tranche des masses impactées par le traitement.



CHROMATOGRAMME 19 CHROMATOGRAMME D'EXCLUSION STERIQUE DE L'HYDROLYSAT DE RESINEUX EXTRAIT A 150°C, BRUT ET TRAITE AVEC 30G/L DE CHARBON ACTIF

IV.A.3. ESSAI PRELIMINAIRE SUR LIT FILTRANT GRANULAIRE DE CHARBON ACTIF

Industriellement l'utilisation de charbon actif est préférée sous forme de lit filtrant granulaire à l'agitation pour l'adsorption de composés indésirables et la détoxification de solutions. De plus, le recours à un lit fixe permet d'éviter la formation de particules fines de charbon actif dans l'hydrolysat, problème majoritairement rencontré dans les hydrolysats de feuillus et dans les hydrolysats traités avec une forte charge en charbon actif. Un essai a donc été réalisé avec une colonne en verre (L=30 cm, Ø=5,2 cm) remplie du charbon actif Norit 12x20 (300 g sec, h_{ca}=25 cm) ayant subi préalablement plusieurs lavages à l'eau déionisée afin de rincer les granulés et éliminer les particules de charbon actif formées lors de l'immersion des grains. Après rinçage le charbon actif a été séché à l'étuve à 105°C pendant 24h.

Le débit d'hydrolysat choisi est assez lent et vaut 33 ml/min soit 2 l/h, ce qui étant donné la section interne de la colonne correspond à une vitesse de 1 m/h. De manière générale les vitesses de travail sont plutôt comprises entre 5 et 20 m/h soit entre 6 et 140 volumes de colonnes par heure (en moyenne 7), à échelle laboratoire sur des colonnes de petites tailles (Cooney, Nagerl, et Hines 1983; Sainio, Turku, et Heinonen 2011; Montané et al. 2006; Lee et Park 2016). Ici le débit d'hydrolysat passé dans le lit filtrant de charbon actif est fixé à 3 volumes de colonne par heure. Trois volumes de colonne ont été passés en eau déionisée avant de passer les 500ml d'hydrolysat de résineux brut produit à 170°C en 15 min.

TABLEAU 32 QUANTITES EN G/L EN HYDROXYMETHYLFURFURAL (HIMF), FURFURAL (F), ACIDE FORMIQUE (AF) ET ACIDE ACETIQU
(AA) dans l'hydrolysat de resineux produit a $170^\circ C$ brut et traite au charbon actif par adsorption sur lit fix
Nommes produits de degradation ou impuretes.

	HMF (g/l)	F (g/l)	AF (g/l)	AA (g/l)
Hydrolysat brut	0,26 ± 0,06	0,34 ± 0,10	0,62 ± 0,10	1,25 ± 0,10
Hydrolysat traité	n.d.	n.d.	0,04 ± 0,002	0,27 ± 0,014
Réduction	100 %	100 %	93,6 %	78,4 %

158

La concentration en g/l des contaminants dans l'hydrolysat brut et traité nommés HMF, F, AF et AA est présenté dans le Tableau 32. Comme attendu le furfural et l'hydroxyméthylfurfural sont éliminés en totalité. Si l'on compare l'adsorption des acides acétique et formique avec un lit filtrant à une adsorption par agitation à 50 g/l, on observe que la quasi-totalité de ces deux composés est retirée avec un lit filtrant contre respectivement 26% et 32% avec une agitation.

Dans le Tableau 33 sont présentées les concentrations en monosaccharides et oligosaccharides avant et après traitement par lit filtrant de charbon actif. On constate que la perte totale en oligosaccharides, identique à celle des monosaccharides, est énorme et vaut 72%. Malgré cette perte, le ratio entre lignine soluble et oligosaccharides dans l'hydrolysat traité est de 0,6%. On remarque également que les oligomères adsorbés en plus grande quantité sont les arabinoxylanes, alors que le monomère adsorbé en majorité est le glucose. La même expérience a été réalisée avec l'hydrolysat de feuillus extrait à 170°C, on constate dans ce cas que 100% des monomères et oligomères d'hémicelluloses sont adsorbés, au même titre que tous les contaminants.

	Monosaccharides dans l'hydrolysat			Oligosaccharides dans l'hydrolysat		
g.l ⁻¹	Brut	Traité	Perte (%)	Brut	Traité	Perte (%)
Arabinose	2,01± 0,06	0,60 ± 0,01	70	0,69 ± 0,03	0,13 ± 0,02	81
Galactose	1,16± 0,12	0,36 ± 0,02	69	1,99 ± 0,04	0,56 ± 0,05	72
Glucose	0,34± 0,04	0,04 ± 0,00	89	1,88 ± 0,01	0,55 ± 0,02	71
Xylose	2,36± 0,41	0,61 ± 0,01	74	2,95 ± 0,30	0,67 ± 0,10	77
Mannose	1,34± 0,18	0,33 ± 0,00	75	9,10 ± 0,22	2,71 ± 0,30	70
Total	7,21± 0,77	1,94 ± 0,04	73	16,62 ± 0,58	4,61 ± 0,49	72

TABLEAU 33 CONCENTRATIONS EN MONOSACCHARIDES ET OLIGOSACCHARIDES DANS L'HYDROLYSAT DE RESINEUX PRODUIT A 170°C BRUT ET TRAITE AU CHARBON ACTIF PAR ADSORPTION SUR LIT FIXE, ET PERTE ENGENDREE

Etant donné que chaque soluté est en compétition permanente pour son adsorption sur un grain de charbon actif, il faut considérer que, en plus de la capacité d'adsorption réduite pour chaque adsorbat, la cinétique d'adsorption est différente entre un lit filtrant et une adsorption par agitation. A un débit lent la compétition peut être plus marquée notamment entre les grosses et les petites molécules.

D'une part, les petites molécules identifiables au F, HMF et aux acides organiques de faible masse molaire sont plus aptes à être adsorbés en premier étant donné que leur mobilité est plus grande que les oligosaccharides de haute masse molaire ou les complexes lignine hydrate de carbone. Les fragments de lignine de bas poids moléculaire (Chromatogramme 14) sont également susceptibles d'être adsorbés en priorité en comparaison aux oligosaccharides pour des raisons d'affinité. A la moitié soit à 7 min (250 ml de passés) l'absorbance montre une concentration en lignine déjà réduite de 97% (0,055 g.l⁻¹) ce qui signifie bien que la lignine est adsorbée en priorité par rapport aux oligosaccharides, au même titre que le F et le HMF. On observe Tableau 34 que qu'au bout des 15 min, 98,7% de la lignine soluble est adsorbée.

D'autre part, les oligosaccharides de haut poids moléculaire et également impliqués dans des complexes lignine hydrate de carbone ont une solubilité beaucoup plus faible dans l'hydrolysat de départ que les produits de dégradation et les monosaccharides. C'est pourquoi eux aussi ont grande chance d'être adsorbés. De plus, ils sont beaucoup plus difficiles à être désorbés que des petites molécules, s'ils obstruent certains pores du charbon actif alors un débit si faible ne les décrochera sans doute pas. On peut imaginer que la surface d'échange dix fois supérieure (cf. Tableau 34 : 25 g pour le traitement par agitation contre 300 g de charbon actif utilisé en lit fixe) explique les pertes en hémicelluloses plus élevées avec le lit filtrant. Les oligosaccharides sont adsorbés en plus grande quantité car, après adsorption des contaminants, le nombre de sites actifs disponibles sur les grains de charbon actif est beaucoup plus élevé que par agitation. Il ne s'agirait donc pas d'une réelle baisse de sélectivité (Tableau 34), pour obtenir une comparaison fidèle il faudrait passer 5L d'hydrolysat en 2h à travers le lit filtrant de charbon actif (soit à un débit de 42 ml/min).

Il s'agit de résultats préliminaires, c'est pourquoi aucune conclusion n'est donnée. Des essais supplémentaires ainsi qu'une étude cinétique sont nécessaires pour savoir si l'emploi d'une colonne de charbon actif est avantageux en comparaison à l'adsorption par agitation. En tout cas, l'industrialisation du procédé passe nécessairement par l'utilisation d'une colonne de charbon actif.

	Agitation	Lit fixe
Volume d'hydrolysat purifié (ml)	500	500
Masse de charbon actif (g)	25	300
Durée du traitement	2 h	15 min
Retrait produits de degradation (%)	45,3	87,4
Retrait lignine (%)	95,4	98,7
Perte en oligosaccharides (%)	15,7	72,2
Ratio lignine/OS (%)	0,7	0,6
Ratio OS/Saccharides (%)	69,1	70,4
Sélectivité envers la lignine* (%)	85,9	57,8
Pureté en oligosaccharides (%)	62,2	67,0
Pureté en hémicelluloses (%)	93,7	95,1

Tableau 34 Comparaison des resultats obtenus sur l'hydrolysat de resineux produit a 170° C avec une adsorption au charbon actif par agitation a 50g.l⁻¹ et sur lit fixe

CONCLUSION SUR LA PARTIE IV.A. Traitement au charbon actif

Dans l'ensemble, le traitement au charbon actif effectué dans les mêmes conditions, semble plus efficace dans les hydrolysats de feuillus que de résineux, en termes de quantité de la lignine soluble et de produits dégradation adsorbés par les grains. Par exemple à une température d'extraction de 170°C, dans un litre de liqueur de feuillus, 100 g de charbon actif adsorbent 16 g de lignine soluble contre 7 dans un litre d'hydrolysat de résineux. En revanche, la perte en oligosaccharides suit la perte en contaminants, et est notamment multipliée par 4 dans les hydrolysats de feuillus en comparaison aux hydrolysats de résineux. Ceci se traduit par de bien meilleures sélectivités et puretés dans les liqueurs de résineux.

IV.B. COMBINAISON CHARBON ACTIF ET ULTRAFILTRATION

Au vu des résultats obtenus dans la première partie de ce chapitre, il a été décidé de combiner le charbon actif avec la filtration membranaire afin d'obtenir de plus hautes puretés en oligosaccharides. En effet, les produits de dégradation et la lignine ne sont pas adsorbés en totalité et les monomères sont toujours présents en solution. Il n'est pas pertinent d'appliquer des charges en charbon actif plus hautes au vu des pertes en oligosaccharides dans les hydrolysats de feuillus, bien qu'il pourrait s'agir d'une option envisageable pour ceux de résineux. Dans cette partie, le principal seuil de coupure des membranes étudiées lors de l'ultrafiltration est 1kDa, afin de limiter les pertes en oligomères et être certain d'éliminer la totalité des produits de dégradation et des monomères, ainsi que la majeure partie de la lignine soluble dans les liqueurs.

IV.B.1. TRAITEMENT DES HYDROLYSATS DE RESINEUX PAR ULTRAFILTRATION ET CHARBON ACTIF

IV.B.1.a. LIGNINE RETIREE PAR COMBINAISON ENTRE ULTRAFILTRATION ET CHARBON ACTIF

Après un traitement à 30 g/l de charbon actif sur l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C (échantillon nommé *SW170 30*), une filtration membranaire avec un seuil de coupure de 1kDa a été réalisée (son rétentat est nommé *SW170 1kDa 30*). En parallèle, après avoir appliqué 50 g/l de charbon actif (*SW170 50*), une filtration sur 3kDa a été effectuée. Les perméats (nommés respectivement *P1kDa 30* et *P3kDa 50* Figure 72) et les rétentats (nommés respectivement *1kDa 30* et *3kDa 50*) ont été récupérés pour être analysés. Ces expériences ont été réalisées dans le but d'obtenir des mélanges de faible masse moléculaire moyenne (perméats correspondant mieux aux caractéristiques des prébiotiques) et dépourvu de contaminants grâce au charbon actif, le schéma expérimental est décrit sur le Schéma 2.



SCHEMA 2 ORGANIGRAMME EXPERIMENTAL DES RESULTATS DE LA DEUXIEME PARTIE DU CHAPITRE II

La Figure 72 montre le pourcentage de lignine soluble (masse de lignine sur la masse totale de l'échantillon) ainsi que les ratios entre lignine soluble et oligosaccharides dans les extraits de résineux à 170°C sur l'histogramme de gauche et 150°C sur celui de droite. Ils n'ont pas été représentés sur le même histogramme pour des raisons d'échelle. L'hydrolysat brut de résineux extrait à 150°C présente un pourcentage en lignine qui vaut 15% de sa masse totale sèche, dans l'hydrolysat extrait à 170°C ce taux de lignine vaut 6%.



FIGURE 72 POURCENTAGE DE LIGNINE SUR LA MASSE TOTALE (ROUGE) ET RATIO ENTRE LIGNINE ET OLIGOSACCHARIDES (BEIGE) DANS CERTAINS ECHANTILLONS DE RESINEUX ULTRAFILTRES ET TRAITES OU NON AU CHARBON ACTIF A DIFFERENTES CONCENTRATIONS. LORSQUE LA LETTRE P EST PLACEE EN AMONT DU SEUIL DE COUPURE UTILISE DANS LA DENOMINATION DES ECHANTILLONS IL S'AGIT DU PERMEAT SOUS LA MEMBRANE, SINON IL S'AGIT DU RETENTAT).

On observe que les résultats obtenus sont néanmoins meilleurs dans les rétentats que dans les perméats. Ce résultat est illustré par le spectre UV-visible du *SW170 P1kDa 30* qui montre une absorbance largement plus élevée que dans le rétentat au même seuil de coupure (cf. Figure 73). Etant donné que dans les hydrolysats extraits à 170°C, la lignine soluble se trouve en majorité en dessous de 1kDa, il semble logique que dans les perméats, la concentration en lignine soluble restante soit plus forte. De plus, en dessous de 1kDa une grande partie des oligosaccharides est éliminée (45%). Les monomères et les impuretés non adsorbés par le charbon actif sont toujours présents. Ces derniers ont en réalité une plus grande proportion que dans l'hydrolysat brut traité au charbon actif, c'est pourquoi le ratio lignine/OS est plus élevé (Figure 72) et la pureté plus faible (de l'ordre de 77% contre 93%) que dans le *SW170 30*.

On observe une réelle amélioration entre l'hydrolysat extrait à 170°C traité à 50g/l de charbon actif et son rétentat sur 3kDa (Figure 72 gauche), en effet le pourcentage massique de lignine sur l'échantillon est divisé par deux et le ratio lignine/OS par trois. Une diminution similaire est observée entre l'hydrolysat obtenu à 150°C traité à 30g/l et son rétentat sur 1kDa, en revanche ce n'est pas le cas à 170°C.

Il est intéressant de constater que le ratio lignine/OS est similaire voire légèrement inférieur dans le rétentat sur 1kDa (*SW150 1kDa 30*) que dans l'hydrolysat correspondant extrait à 150°C traité à 30g/I (*SW150 30*). Pour rappel les pertes en oligosaccharides sont de l'ordre de 5% dans ce rétentat et on élimine toutes les impuretés et les monomères de sucres. De plus, 86% de la lignine est retirée contre 88% avec le seul traitement au charbon actif à 30g/I. Ce résultat est assez bien illustré sur le spectre UV-visible Figure 73 de ces deux échantillons, qui sont très proches.



FIGURE 73 SPECTRES UV-VISIBLE DES ECHANTILLONS DE RESINEUX EXTRAITS A 150°C (GAUCHE) ET 170°C (DROITE) TRAITES AU CHARBON ACTIF ET ULTRAFILTRES

IV.B.1.b. PERTE ET PURETE EN OLIGOSACCHARIDES DANS LES RETENTATS PURIFIES

Le changement de composition osidique induit par l'adsorption de certains oligosaccharides par le charbon actif est présenté Figure 74. Une comparaison des pourcentages oligomériques est faite entre l'hydrolysat traité à 30 g/l de charbon actif (*SW170 30 et SW150 30*), le rétentat sur 1kDa (*SW170 1kDa* et *SW150 1kDa*) et enfin le rétentat sur 1kDa et traité avec la même charge de charbon actif (*SW170 1kDa 30*). On observe que les proportions en galactoglucomannanes augmentent progressivement au dépend des arabinoxylanes, des arabinanes et des sucres chargés qui semblent adsorbés en priorité.

Tableau $35C$ oncentration totale en oligosaccharides, pourcentage recupere en oligo	SACCHARIDES * PAR RAPPORT
A L'HYDROLYSAT DE DEPART ET PURETE EN OLIGOSACCHARIDES DANS LES ECHANTILLONS DE RESINEL	JX

	SW170	SW170	SW170	SW150	SW150	SW150
	1kDa	30	1kDa 30	1kDa	30	1kDa 30
C _{Totale} en OS (g/I)	7,72	14,57	5,47	6,48	5,61	4,56
	± 0,09	± 0,28	± 0,19	± 0,56	± 0,16	± 0,13
Pourcentage d'OS récupéré * (%)	46%	88%	33%	95%	82%	67%
Pureté en OS (% massique)	97,1%	63,7%	99,5%	97,2%	66,2%	98,7%

163



FIGURE 74 POURCENTAGE DES DIFFERENTS OLIGOSACCHARIDES DANS LES ECHANTILLONS DE RESINEUX EXTRAITS A 170°C ET 150°C TRAITES AU CHARBON ACTIF ET ULTRAFILTRES OU NON SUR 1KDA

Si l'on se réfère au Tableau 35, on voit que la pureté obtenue grâce à la combinaison entre charbon actif et ultrafiltration est supérieure dans les extraits à 170°C plutôt qu'à 150°C. Néanmoins, le pourcentage récupéré par rapport à la quantité initiale en oligosaccharides dans l'hydrolysat brut correspondant à chaque échantillon, est deux fois plus faible à la plus haute température d'autohydrolyse, du fait de leur taille plus courte.

L'élimination de la lignine soluble représentée en fonction de la perte en oligomères de sucres est donnée Figure 75 (a) et la pureté en oligosaccharides représentée en fonction de la perte en oligosaccharides est donnée Figure 75 (b). Figure 75 (b), on remarque que la perte en oligosaccharides par rapport à l'hydrolysat de départ est deux fois plus grande dans l'échantillon *SW170 1kDa 30* en comparaison au *SW150 1kDa 30*, pour une pureté similaire.

Etant donné que les concentrations initiales en saccharides dans les liqueurs sont de l'ordre de 24 g/l à 170°C et 8 g/l à 150°C, la perte est « compensée » en quelque sorte parce que la concentration totale en oligosaccharides reste plus élevée dans le rétentat sur 1kDa et traité au charbon actif de l'hydrolysat extrait à 170°C (*SW170 1kDa 30*) que dans celui extrait à 150°C (*SW150 1kDa 30*).



FIGURE 75

- (A) ELIMINATION DE LA LIGNINE SOLUBLE REPRESENTEE EN FONCTION DE LA PERTE EN OLIGOSACCHARIDES^{*} DANS LES HYDROLYSATS DE RESINEUX AYANT SUBI DIFFERENTS TRAITEMENTS
- (B) PURETE EN OLIGOSACCHARIDES REPRESENTEE EN FONCTION DE LA PERTE EN OLIGOSACCHARIDES^{*} DANS LES HYDROLYSATS DE RESINEUX AYANT SUBI DIFFERENTS TRAITEMENTS

* PAR RAPPORT A L'HYDROLYSAT DE DEPART

Si l'on souhaite surtout obtenir un meilleur rendement et une plus grande diversité moléculaire, il vaut mieux opter pour une simple filtration sur 1kDa d'un hydrolysat extrait à 150°C. À l'inverse, il faudra privilégier l'association ultrafiltration plus charbon actif à 30g/l dans un hydrolysat extrait à 170°C, si l'on souhaite obtenir un mélange pur à 99,5% en galactoglucomannanes acétylés.

IV.B.1.C. INFLUENCE DE LA COMBINAISON ULTRAFILTRATION ET CHARBON ACTIF SUR LA MASSE MOLAIRE MOYENNE DES OLIGOMERES

Comme dans les hydrolysats bruts, les hydrolysats ultrafiltrés voient leur masse moyenne changer avec le traitement au charbon actif, et il se trouve que leur évolution est semblable. Comme présenté sur la Figure 76, la distribution de masse du rétentat sur 3 kDa est décalée vers la gauche (vers les plus faibles Mw) avec l'ajout de charbon actif, dans l'échantillon de résineux obtenu à une température d'autohydrolyse de 170°C.



Figure 76 Distribution de masse molaire zoomee de 1000 a 4000 Da du retentat sur 3kDa de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C sans et avec charbon actif a 30 et 50g/l

Ceci se traduit par des masses molaires moyennes calculées plus faibles dans les rétentats obtenus à 170°C traités au charbon actif que sans, aux trois seuils de coupure testés (1,3 et 5kDa), voir Tableau 36. Ces résultats sont en accord avec une étude menée précédemment au laboratoire sur le même hydrolysat à un seuil de coupure de 500 Da et traité à 10 et 40g/l du même charbon actif Norit 12x20 (Deloule 2017). A l'inverse, il semble que la combinaison charbon actif - ultrafiltration fasse augmenter la masse molaire moyenne (Mw) des oligosaccharides dans l'extrait à 150°C. Etant donné que la Mw est plus élevée dans les hydrolysats bruts et ultrafiltrés obtenus à 150°C, ce phénomène est logique si on considère que la tranche de masses molaires adsorbées par les granulés de charbon actif est la même quel que soit l'échantillon.

TABLEAU 36 MASSES MOLAIRES MOYENNES EN NOMBRE ET EN POIDS, ET POLYDISPERSITE (D) DES ECHANTILLONS DE RESINEUX ULTRAFILTRES ET TRAITES AU CHARBON ACTIF

	Mw (kDa)	Mn (kDa)	D (Mw/Mn)
SW170 1kDa	3,1 ± 3%	2,2 ± 5%	1,4 ± 1%
SW170 1kDa 30	3,0 ± 2%	2,1 ± 3%	1,4 ± 1%
SW170 1kDa 50	2,9 ± 2%	1,7 ± 5%	1,7 ± 3%
SW170 3kDa	4,0 ± 4%	2,7 ± 8%	1,5 ± 1%
SW170 3kDa 30	3,8 ± 4 %	2,6 ± 6%	1,5 ± 3%
SW170 3kDa 50	3,5 ± 1%	1,7 ± 1%	2,1 ± 1%
SW170 5kDa	4,7 ± 7%	3,2 ± 7%	1,5 ± 1%
SW170 5kDa 50	4,6 ± 4%	2,0 ± 4%	2,3 ± 2%
SW150 1kDa	4,9 ± 5%	2,9 ± 4%	1,7 ± 2%
SW150 1kDa 30	5,3 ± 3%	2,9 ± 5%	1,8 ± 3%

IV.B.2. TRAITEMENT DES HYDROLYSATS DE FEUILLUS PAR ULTRAFILTRATION ET CHARBON ACTIF

IV.B.2.a. LIGNINE RETIREE PAR COMBINAISON ENTRE ULTRAFILTRATION ET CHARBON ACTIF

Dans les rétentats sur 1kDa des hydrolysats de feuillus extraits à 150°C et 170°C, les ratios lignine/OS valent respectivement 14,3% et 6,5%. On constate Figure 77 que ces ratios sont diminués respectivement à 1% et 0,7% grâce à une charge de 50g/l en charbon actif en plus de l'ultrafiltration.



FIGURE 77 POURCENTAGE DE LIGNINE SUR LA MASSE TOTALE (ROUGE) ET RATIO ENTRE LIGNINE ET OLIGOSACCHARIDES (BEIGE) DANS LES HYDROLYSATS DE FEUILLUS EXTRAITS A 150 ET 170°C ET TRAITES AVEC 30 ET 50G/L DE CHARBON ACTIF ET ULTRAFILTRES SUR 1KDA

L'élimination de la lignine soluble et des produits de dégradation non adsorbés par le charbon actif qui absorbent autour de 280nm grâce à l'ultrafiltration, est plus marquée (car ces produits y sont plus concentrés) dans les échantillons extraits à 170°C plutôt qu'à 150°C. Effectivement Figure 78, spectre de droite, le pic du spectre bleu à 280 nm (*HW170 50*) correspondant à l'hydrolysat extrait à 170°C traité à la plus haute charge de charbon actif est éliminé (spectre vert échantillon *HW170 1kDa 50*) lorsqu'on lui applique une ultrafiltration sur 1kDa.



FIGURE 78 SPECTRES UV-VISIBLE DES ECHANTILLONS DE FEUILLUS EXTRAITS A 150°C (GAUCHE) ET 170°C (DROITE) TRAITES AU CHARBON ACTIF ET ULTRAFILTRES SUR 1KDA

Il semble plus difficile, comme dans les extraits de bois résineux, d'extraire la lignine résiduelle des échantillons extraits à plus faible température même avec la combinaison de deux techniques de purification. Il ne s'agit à priori pas de la saturation des grains de charbon actif car les capacités sont supérieures à ce qui est réellement adsorbé. En revanche, le pH moins acide des liqueurs extraites à faible température (4 contre 3,6 à 170°C) joue certainement un rôle inhibiteur à l'adsorption. Ceci pourrait également être dû à la présence de complexes lignine hydrates de carbone en plus grande quantité dans ce type de liqueur. Un fragment de lignine lié de manière covalente à un oligosaccharide chargé a un volume hydrodynamique plus gros que ce même fragment non lié à un sucre d'hémicellulose. Ces complexes sont donc potentiellement plus difficiles à adsorber pour des raisons de gêne stérique ou plus simplement parce que leur conformation dans l'eau les empêche de se loger dans les pores du charbon actif. L'affinité chimique entre le charbon actif et la lignine se trouve peut-être aussi changée si elle est impliquée dans un complexe lignine hydrates de carbone.

IV.B.2.b. PERTE ET PURETE EN OLIGOSACCHARIDES DANS LES RETENTATS PURIFIES

La Figure 79 montre la composition osidique oligomérique en sucres neutres et chargés des rétentats sur 1kDa des hydrolysats extraits à 170°C et 150°C et traités par charbon actif. Les xylanes et les arabinanes sont les oligomères éliminés en plus grande partie, comme dans les échantillons de résineux. Ainsi les proportions en glucomannanes augmentent avec le traitement au charbon actif dans les rétentats. Au vu des écarts types concernant les rhamnogalacturonanes dans les échantillons obtenus à 170°C, il semble que leur proportion soit stable, en revanche à 150°C elle augmente une fois l'échantillon traité au charbon actif. Il en va de même pour les oligosaccharides contenants des acides 4-O-méthylglucuronique. Ceci laisse présager que seuls les xylanes acétylés et non les méthylglucuronoxylanes sont impactés par le traitement, car peut-être moins volumineux. Il est également possible que la nature neutre ou chargée de l'oligosaccharide implique d'autres types d'interactions avec le charbon actif qui sont moins favorables à son adsorption. Il faut dire qu'en moyenne les sucres chargés représentent 6% des oligosaccharides dans le HW170 1kDa et 8% dans le HW150 1kDa, ces proportions atteignent respectivement 9% et 16% dans ces mêmes rétentats traités avec 50g/l de charbon actif.



Figure 79 Pourcentage en acides hexuroniques et rhamnose oligomerique dans les echantillons de feuillus

EXTRAITS A 170°C ET 150°C TRAITES AU CHARBON ACTIF ET ULTRAFILTRES SUR 1KDA Ces résultats sont contraires à ceux obtenus pour les résineux, les oligomères

chargés d'acides hexuroniques sont moins adsorbés que les oligomères neutres. Encore une fois, ceci pourrait être dû au fait qu'ils sont liés à des complexes lignine hydrates de carbone et qu'ils sont donc difficilement adsorbables par les grains car de plus haute masse moléculaire que les xylanes non chargés par exemple.

On observe dans le Tableau 37 que les puretés obtenues sont meilleures à une température d'extraction de 170°C, et les concentrations dans les liqueurs y sont plus élevées. Contrairement aux hydrolysats de bois résineux, les pourcentages d'oligosaccharides récupérés par rapport à la quantité initiale dans l'hydrolysat of correspondant sont semblables aux deux températures d'extraction.

Il est intéressant de constater qu'à 150°C les pertes en oligosaccharides sont engendrées essentiellement par l'adsorption au charbon actif alors qu'à 170°C elles sont majoritairement engendrées par l'ultrafiltration, cf. Figure 80 (a) et (b). Ce phénomène est clairement représenté sur la Figure 81, où l'on observe l'écart de perte en oligosaccharides entre les hydrolysats bruts traités au charbon actif et d'autre part les hydrolysats bruts ultrafiltrés sur 1 kDa et 3 kDa extraits à faible température en comparaison à ceux obtenus à haute température d'autohydrolyse. Par ailleurs, au vue des écarts types, les hydrolysats extraits à 150°C à la fois ultrafiltrés et traités au charbon actif présentent des pertes en oligosaccharides proches des échantillons analogues extraits à 170°C. La meilleure pureté est obtenue grâce à la combinaison entre une filtration sur 1 kDa et l'ajout de charbon actif. Pour chacun de ces échantillons ayant subi une double purification, la pureté finale se situe autour de 99% et est identique au vue des barres d'erreur. En ce qui concerne l'élimination de la lignine, l'association entre ultrafiltration et charbon actif est plus significative dans les hydrolysats extraits à 150°C, Figure 80 (a). En effet on passe de 83% et 91% de retrait de lignine soluble à plus de 99% grâce à l'ajout de charbon actif.

	C _{Totale} en OS (g/l)	Pourcentage d'OS récupéré * (%)	Pureté en OS (% massique)	
HW170 1kDa	6,83 ± 0,08	31%	93,8%	
HW170 30	14,25 ± 0,23	70%	65,6%	
HW170 1kDa 30	4,89 ± 0,02	22%	99,1%	
HW170 50	12,28 ± 0,79	60%	66,7%	
HW170 1kDa 50	4,38 ± 0,03	19%	99,4%	
HW150 1kDa	3,64 ± 0,28	74%	87,5%	
HW150 30	1,61 ± 0,09	36%	58,8%	
HW150 1kDa 30	1,48 ± 0,05	30%	98,9%	
HW150 50	1,49 ± 0,05	34%	59,2%	
HW150 1kDa 50	1,24 ± 0,06	25%	99,0%	

TABLEAU 37 CONCENTRATION TOTALE EN OLIGOSACCHARIDES, POURCENTAGE RECUPERE * PAR RAPPORT A L'HYDROLYSAT DE DEPART ET PURETE EN OLIGOSACCHARIDES DANS LES ECHANTILLONS DE FEUILLUS



FIGURE 80

(a) Diagramme representant l'elimination de la lignine en fonction de la perte en oligosaccharides* dans les echantillons de feuillus extraits a $150^{\circ}C$ et purifies avec differents traitements

(B) DIAGRAMME REPRESENTANT L'ELIMINATION DE LA LIGNINE EN FONCTION DE LA PERTE EN OLIGOSACCHARIDES^{*} DANS LES ECHANTILLONS DE FEUILLUS EXTRAITS A $170^{\circ}C$ ET PURIFIES AVEC DIFFERENTS TRAITEMENTS



* PAR RAPPORT A L'HYDROLYSAT DE DEPART

FIGURE 81 DIAGRAMME REPRESENTANT LA PURETE EN OLIGOSACCHARIDES EN FONCTION DE LA PERTE EN OLIGOSACCHARIDES* (PAR RAPPORT A L'HYDROLYSAT DE DEPART) DANS LES ECHANTILLONS DE FEUILLUS EXTRAITS A 170°C ET PURIFIES AVEC DIFFERENTS TRAITEMENTS

IV.B.2.C. INFLUENCE DE LA COMBINAISON ULTRAFILTRATION ET CHARBON ACTIF SUR LA MASSE MOLAIRE MOYENNE DES OLIGOMERES

Dans cette sous-partie est présentée l'étude par chromatographie à filtration de gel du rétentat sur 1kDa des hydrolysats de feuillus extraits à 150 et 170°C, et traités au charbon actif, voir Chromatogramme 20. Il est important de mentionner que pour pallier aux problèmes d'agrégats expliqués dans le Chapitre Matériels et Méthodes, une configuration de colonnes différente de celle utilisée dans le Chapitre I a été employée. Les masses moyennes des rétentats sans charbon actif calculées dans le Chapitre I. Le calcul des Mw et Mn des échantillons de feuillus ultrafiltrés et traités au charbon actif est effectué par chromatographie d'exclusion sur deux colonnes OHPack SB 806 HQ en série, afin d'obtenir un meilleur comparatif. La référence est le rétentat de l'hydrolysat ultrafiltré sur 1kDa.



CHROMATOGRAMME 20 CHROMATOGRAMME D'EXCLUSION STERIQUE OBTENU PAR DETECTION A INDICE DE REFRACTION DU RETENTAT SUR 1KDA DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 150°C ET DE CELUI EXTRAIT A 170°C AVEC ET SANS CHARBON ACTIF

On observe que le signal UV de chaque échantillon de feuillus obtenu à 170°C (de l'hydrolysat brut au rétentat sur 1kDa traité à 50g/l) obtenu également par chromatographie présenté Chromatogramme 21, diminue drastiquement à mesure des traitements appliqués (il en va de même pour les hydrolysats obtenus grâce à des conditions plus douces).



Chromatogramme 21 Signal UV a 280nm en fonction du temps obtenu par chromatographie a permeation de gel de l'hydrolysat de feuillus extrait a 170° C et ayant subi differents traitements

On remarque également que les signaux UV des rétentats traités et non traités au charbon actif sont décalés vers la gauche du chromatogramme en comparaison à l'hydrolysat non ultrafiltré, au même titre que les signaux en RI sont décalés vers les plus hautes masses. Il se trouve que les signaux UV des rétentats sans charbon actif ont une intensité encore relativement élevée vers les faibles temps de rétention (entre 45 et 60 min), alors que le signal réfractométrique est redescendu à zéro (cf. Chromatogramme 25 et Chromatogramme 26 dans les Annexes). Par opposition, on constate que les rétentats traités au charbon actif présentent un signal en UV presque superposable au signal RI (voir Chromatogramme 24 et Chromatogramme 28 en Annexes). Ceci signifie que la lignine soluble de petite taille attachée ou non aux sucres présente dans le rétentat est éliminée avec l'ajout de charbon actif. Cependant, si le signal UV encore présent dans les rétentats traités suit au mieux le RI (voire est même décalé vers la gauche du RI à 170°C), la lignine résiduelle non éliminée malgré la combinaison ultrafiltration charbon actif, a une distribution de masse très proche de celles des oligosaccharides en solution. Elle peut être également identifiée à des complexes lignine hydrates de carbone trop volumineux pour être adsorbés (on peut même voir qu'un agrégat se forme en UV à 150°C en amont du signal RI, pour lequel il existe un signal en LS, Chromatogramme 24).



FIGURE 82 DISTRIBUTION DE MASSE DU RETENTAT SUR 1KDA DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 170°C AVEC (SIGNAL JAUNE ET VERT) ET SANS (SIGNAL BLEU) CHARBON ACTIF

On observe, Chromatogramme 20, que les signaux RI des chromatogrammes des rétentats traités au charbon actif sont décalés vers le gauche en comparaison aux rétentats non traités (courbe bleue et rouge bordeaux), et ce aux deux températures d'extraction. On voit bien qu'une grande partie des plus faibles masses de l'échantillon est éliminée.

La distribution de masses pondérées en poids des rétentats traités de l'hydrolysat de feuillus extrait à 170°C (courbe jaune et verte), présentée Figure 82, témoigne effectivement de l'aplatissement de la courbe en dessous de 1000 Da en comparaison à la courbe bleue (*HW170 1kDa*). Contrairement aux hydrolysats de résineux, il semble donc que l'ajout de charbon actif fasse augmenter les masses molaires moyennes dans les rétentats (cf. Tableau 38).

	Mw (kDa)	Mn (kDa)	D (Mw/Mn)
HW170 1kDa	2,1 ± 1%	1,0 ± 0%	2,1 ± 1%
HW170 1kDa 30	2,2 ± 1%	1,3 ± 2%	1,7 ± 1%
HW170 1kDa 50	2,3 ± 0%	1,3 ± 0%	1,8± 1%
HW150 1kDa	4,7 ± 2%	1,7 ± 2%	2,8 ± 2%
HW150 1kDa 30	5,2 ± 2%	1,9 ± 4%	2,8 ± 4%
HW150 1kDa 50	5,8 ± 4%	2,1 ± 4%	2,8 ± 4%

TABLEAU 38 MASSES MOLAIRES MOYENNES EN NOMBRE ET EN POIDS, ET POLYDISPERSITE (D) DES ECHANTILLONS DE FEUILLUS ULTRAFILTRES SUR 1kDa avec et sans charbon actif extraits a 170 et 150°C

CONCLUSION SUR LES PARTIES IV.A. Traitement au charbon actif ET IV.B. Combinaison charbon actif et ultrafiltration

La première partie est dédiée à la détoxification des hydrolysats bruts grâce à un traitement au charbon actif par agitation. Après des essais préliminaires sur les liqueurs de feuillus produites à 170°C en conditions critiques (20 g de charbon actif par litre d'hydrolysat), le charbon actif Norit 12x20 a été sélectionné pour poursuivre les expérimentations de ce chapitre. Les autohydrolysats de feuillus étant plus concentrés en lignine soluble et en produits de dégradation des sucres, ils ont logiquement été choisis pour tester quatre charbons actifs différents en termes d'origine, de surface spécifique et de taille des granulés. Le charbon actif Norit 12x20 est composé de granulés mesurant 0,7 à 1 mm de diamètre et provient de lignite. C'est le charbon actif qui présente la plus grande capacité d'adsorption de la lignine soluble d'entre tous, et pourtant avec la plus petite surface spécifique.

A une charge de 30 g de charbon actif par litre d'hydrolysat, plus de 90% de la lignine soluble est retirée dans toutes les liqueurs. Dans les liqueurs extraites à 170°C elle est retirée à hauteur de 95% (toutes essences confondues). Dans des conditions d'autohydrolyse plus douces, le traitement fonctionne beaucoup mieux dans la liqueur de feuillus (98% de retrait de la lignine) que dans celle de résineux avec 87% d'élimination de la lignine. Le traitement fonctionne mieux dans les hydrolysats de feuillus, car la capacité d'adsorption des granulés de charbon actif est plus que doublée. En revanche, la sélectivité envers la lignine est meilleure dans les hydrolysats de résineux. Ceci se traduit par l'adsorption d'oligosaccharides par le charbon actif en plus grande quantité dans les liqueurs de feuillus (30% à 170°C et 67% à 150°C) et donc des ratio lignine/oligosaccharides et des puretés plus faibles en comparaison aux hydrolysats de résineux.

L'application d'une charge plus haute (50 g/l) en charbon actif ne semble pas pertinente au vue des pertes engendrées en oligomères d'hémicelluloses et de la baisse de sélectivité envers la lignine en comparaison à une charge de 30g/l. De plus, le gain de pureté et l'élimination supplémentaire de lignine soluble sont trop faible vis-à-vis de la perte en oligosaccharides engendré par un tel traitement. Cependant, il est à noter que l'augmentation de la charge de 30 à 50 g/l de charbon actif permet d'éliminer 100% du HMF dans la liqueur de résineux extrait à 170°C (contre 92%) et 98% du F dans la liqueur de feuillus produite dans les mêmes conditions (contre 95%). Dans tous les autres hydrolysats, ces deux composés cibles car connus comme inhibiteurs biologiques sont éliminés en totalité à 30 g/l de charbon actif.

L'association entre ultrafiltration sur 1kDa et adsorption des impuretés au charbon actif à une charge de 30 g/l est nécessaire pour atteindre 99% de pureté en oligosaccharides dans tous les échantillons (contre 65% en moyenne avec du charbon actif seul, du fait de la présence des acides organiques, de la lignine soluble et des monomères toujours présents). La lignine récalcitrante, c'est-à-dire non éliminée, représente moins de 1% de la masse totale de l'échantillon dans tous les cas. A l'exception de l'hydrolysat de résineux produit par hydrolyse douce, les pertes en oligosaccharides par rapport à l'hydrolysat de départ engendrées par l'association ultrafiltration – charbon actif s'élèvent à 75 % en masse en moyenne dans tous les échantillons (seulement 33% dans le SW150 1kDa 30).

Les masses molaires moyennes diminuent avec l'ajout de charbon actif dans les hydrolysats bruts produits dans des conditions sévères, à l'inverse des hydrolysats produits dans des conditions douces (Mw augmente). Il semble que la masse molaire des oligosaccharides adsorbés par les granulés de charbon actif soit supérieure à 1000 Da. Dans les rétentats (1kDa) de feuillus traités avec du charbon actif et aussi de résineux (1kDa) produit à 150°C, la masse moléculaire moyenne augmente. Au contraire, l'ajout de charbon actif dans les rétentats (1, 3 et 5kDa) de résineux extraits dans des conditions sévères fait diminuer la masse moléculaire moyenne des échantillons. De manière générale, le mélange d'oligosaccharides retenu sur la membrane et non adsorbé par le charbon actif est dénaturé par rapport à celui contenu dans l'hydrolysat initial. Il est difficile de conclure quant à l'adsorption de complexes lignine hydrates de carbone du fait de leur grand volume hydrodynamique.

Les liqueurs obtenues par autohydrolyse douce présentent une diversité moléculaire intéressante pour l'application prébiotique, néanmoins leur masse molaire moyenne après purification est très élevée pour ce type d'application. Les rétentats traités au charbon actif des liqueurs obtenues à 170°C présentent des masse molaires moyennes encore élevées mais près de deux fois plus faibles en comparaison. Il est clair que la purification par étapes ne permet pas d'obtenir des puretés en oligosaccharides satisfaisantes si l'on conserve le perméat sous la membrane et non le rétentat (dans le but d'avoir un mélange de plus bas degré de polymérisation), en raison des impuretés difficilement retirées. Etant donné ces observations, une courte étude a été entreprise pour évaluer l'intérêt d'une hydrolyse enzymatique afin de diminuer la masse moléculaire moyenne des rétentats purifiés.

IV.C. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES HYDROLYSATS DE BOIS

Ce travail a été fait en collaboration avec, et grâce, à Jahan Golestani et Anabela Da Silva Santos au LGP2 à Grenoble. Jahan a étudié lors de sa thèse de doctorat l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses contenues dans la pâte à papier et Anabela a effectué un stage au laboratoire dans le thème du projet de thèse qui fait l'objet de ce mémoire.

IV.C.1. HYDROLYSAT DE FEUILLUS

EST LA REFERENCE

Des essais préliminaires ont été réalisés sur l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C car comme vu dans le Chapitre 1, il contient des oligosaccharides de plus haut degré de polymérisation et plus substitués de groupements acides que ceux extraits à des conditions d'autohydrolyse plus sévères. La diversité moléculaire peut-être un atout pour l'application prébiotique, en revanche les oligosaccharides de plus haut degré de polymérisation sont moins digestes pour les bactéries donc cet aspect constitue plutôt un facteur limitant. Quelques essais ont donc été entrepris pour comprendre dans quelle mesure une hydrolyse enzymatique permet de diminuer la masse molaire moyenne du mélange étudié.

IV.C.1.a. CHROMATOGRAPHIE A PERMEATION DE GEL ET DETECTION REFRACTOMETRIQUE

Dans cette partie, le rétentat sur 500 Da de l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C (noté HW150 500 Da, considéré comme référence) a été traité durant 10 min, 30 min, 1 h et 8 h avec deux solutions commerciales séparées, l'une composée d'endo-1,4-xylanase et l'autre d'endomannanase. Ce seuil de coupure a été choisi pour éliminer une majeure partie de la lignine (60%), la totalité des contaminants de types furfural, hydroxyméthylfurfural, petits acides organiques, qui jouent le rôle d'inhibiteurs biologiques, tout en conservant un maximum d'oligosaccharides en comparaison à l'hydrolysat de départ.



Chromatogramme 22 Signal du refractometre en fonction du temps obtenu par chromatographie a permeation de gel de l'echantillon traite avec de la mannanase pendant 10 min, 30 min et 1 h, la courbe bleue

Sur 500 Da on a également éliminé 90% des monomères en solution, le but ici est bien de faire baisser le DP moyen des oligomères mais pas de créer des monomères. D'ailleurs tous les échantillons traités enzymatiquement ont été analysés par chromatographie à échanges d'anions, et il a bien été vérifié qu'il n'y a pas création de monosaccharides dans l'échantillon même au bout de 8h de réaction.

On observe Chromatogramme 22 et Chromatogramme 23 que les signaux du réfractomètre correspondant à 10 min et 30 min de réaction sont quasiment confondus (signaux rose et vert) pour les deux enzymes. Il semble que ces temps de réaction très courts suffisent déjà à modifier le degré de polymérisation moyen de l'hydrolysat car on observe une baisse d'intensité du large pic autour de 30 min (courbe bleue qui est l'échantillon de référence : HW150 500 Da) et la création de plusieurs pics de plus faibles temps de rétention correspondant notamment aux DP 2 et 3 avec la xylanase, le pic du monomère se situant à 41,2 min.



CHROMATOGRAMME 23 SIGNAL DU REFRACTOMETRE EN FONCTION DU TEMPS OBTENU PAR CHROMATOGRAPHIE A PERMEATION DE GEL DE L'ECHANTILLON TRAITE AVEC DE LA XYLANASE, LA COURBE BLEUE EST LA REFERENCE

Il est intéressant de constater que l'hydrolyse des hauts DP par la mannanase engendre l'apparition de populations de tailles plutôt supérieures à un DP 3 contrairement à l'effet de la xylanase. On voit également qu'à partir de 1h de réaction avec la mannanase le mélange semble beaucoup plus impacté qu'au bout de 8h de réaction avec la xylanase. Ces observations sur les chromatogrammes obtenus par réfractométrie se traduisent par des masses molaires moyennes plus faibles grâce à l'action de la mannanase en comparaison à la xylanase (voir Tableau 39).

178

IV.C.1.b. DISTRIBUTION DE MASSES MOLAIRES

La masse molaire moyenne en poids et en nombre est diminuée avec les deux enzymes testées comme attendu et on remarque que l'hydrolyse semble plus efficace avec la mannanase qu'avec la xylanase au bout de 8h (cf Tableau 39). Ceci est illustré par un signal en LS beaucoup plus décalé vers de plus hauts temps de rétention (Chromatogramme 27 en Annexes). Il faut dire que les résultats de spectrométrie de masse obtenus par MALDI ToF MS donnés dans le Chapitre 1, montrent que les chaines de mannanes sont plus longues que celles de xylanes. En effet les pics du spectre de masse correspondant à cet échantillon (rétentat sur 500 Da de l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C) de plus grand m/z correspondent à des structures de type H_xAc_y, donc de mannanes acétylés.

TABLEAU 39 N	1assi	ES MOLEC	ULAIRES I	MOYENNES	DE l	L'HYD	ROL	YSAT	BRUT DI	E FEUILI	US	EXTRAIT A	150°C (I	IOTE	HW150),	DE
L'ECHANTILLON	DE	REFERENC	CE (NOTE	HW150 5	500	DA)	ΕT	DE	L'ECHAN	TILLON	DE	REFERENCE	TRAITE	PAR	HYDROL	YSE
ENZYMATIQUE (NOTE	E REFERENC	CE + ENZY	ME TEMPS	DE R	EACTI	ON)									

	Mw (kDa)	Mn (kDa)	D (Mw/Mn)
HW150	2,60 ± 4%	1,20 ± 2%	2,1 ± 2%
Référence : HW150 500 Da	3,22 ± 5%	2,20 ± 7%	1,5 ± 1%
Référence + Xylanase 10 min	2,73 ± 3%	2,32 ± 5%	1,18 ± 2%
Référence + Xylanase 30 min	2,56 ± 4%	2,13 ± 5%	1,20 ± 2%
Référence + Xylanase 1 h	2,50 ± 2%	2,07 ± 4%	1,23 ± 3%
Référence + Xylanase 8 h	2,38 ± 2%	2,04 ± 2%	1,17 ± 6%
Référence + Mannanase 10 min	2,83 ± 4%	1,99 ± 5%	1,42 ± 2%
Référence + Mannanase 30 min	2,41 ± 4%	1,69 ± 5%	1,43 ± 1%
Référence + Mannanase 1 h	2,26 ± 1%	1,59 ± 3%	1,42 ± 2%
Référence + Mannanase 8 h	2,06 ± 3%	1,51 ± 6%	1,38 ± 5%

Les distributions de masses molaires zoomées sont présentées Figure 83 et Figure 84. Elles montrent la répartition des Mw du rétentat du 500 Da de l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C (Ref en vert) respectivement traité avec la mannanase (10 min, 30 min, 1h et 8h) puis avec la xylanase (10 min, 1h et 8h). On observe, dans les échantillons traités avec la mannanase (Figure 84), le décalage progressif de deux populations dont le sommet des pics se trouvent autour de 2500 et 4400 Da à 10 min et 1600 et 3100 Da à 8h de réaction. On remarque que plus le temps de réaction est long, plus ces deux populations sont confondues. Figure 83, ces deux populations se situent autour de 2500 et 3800 Da dans l'échantillon traité à la xylanase pendant 10 min, pour se transformer en une seule population dont le sommet se trouve à 2600 Da à 8h de réaction.


FIGURE 84 DISTRIBUTION DE MASSE MOLAIRE ZOOMEE DE 1000 A 5000 G/MOL DE L'ECHANTILLON DE REFERENCE TRAITE AVEC DE LA MANNANASE



FIGURE 83 DISTRIBUTION DE MASSE MOLAIRE ZOOMEE DE 1000 A 7000 G/MOL DE L'ECHANTILLON DE REFERENCE ET TRAITE AVEC DE LA XYLANASE

En conclusion, ces essais montrent que l'emploi d'une hydrolyse enzymatique réalisée à l'aide d'une endo-xylanase utilisée séparément d'une endo-mannanse est pertinente et permet de diminuer significativement la masse molaire moyenne de l'échantillon étudié. En effet, un temps de réaction très court (30 min), en comparaison à une hydrolyse conventionnelle dont la durée optimale se situe plutôt entre 24 et 48h, permet de diminuer suffisamment la masse molaire moyenne du mélange (référence) d'oligosaccharides contenus dans le rétentat sur 500 Da de l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C pour la ramener à hauteur de l'hydrolysat brut (2,6 kDa). La xylananse diminue la Mw des oligosaccharides du HW150 500 Da de 26%, contre 36% pour la mannanase à 8h d'hydrolyse. On imagine qu'à des durées plus élevés mais également avec une synergie d'enzymes (emploi simultané) l'hydrolyse sera d'autant plus efficace. De plus, il s'agit d'un rétentat qui n'a pas été traité au charbon actif et qui contient encore de la lignine considérée comme inhibiteur. Dans les échantillons purs à 99% en oligosaccharides comme présentés dans les parties précédentes, il est clair que l'hydrolyse enzymatique est une option viable pour la diminution du degré de polymérisation moyen des oligosaccharides.

CONCLUSIONS CHAPITRE IV

La détoxification des hydrolysats de bois par adsorption au charbon actif, permet d'éliminer plus de 95% de la lignine soluble initialement présente à partir de 50 g par litre d'hydrolysat pour toutes les essences et toutes les températures d'extraction. Ce traitement permet de plus d'éliminer 100% du furfural et de l'hydroxyméthylfurfural dans les hydrolysats de feuillus extrait à 150°C (98% à 170°C) et de résineux extrait à 170°C. De manière générale, la capacité d'adsorption de la lignine soluble par le charbon actif est plus que doublée dans les hydrolysats de feuillus. Ceci engendre donc de très grosses pertes en oligosaccharides (beaucoup plus impactés que les monosaccharides de manière générale), rendant donc ce traitement moins sélectif en comparaison aux hydrolysats de résineux. Ceci pourrait également être dû à la présence en plus grande quantité, de complexes lignine hydrates de carbone dans les hydrolysats de feuillus. De manière générale, de plus hauts seuils de pureté sont donc obtenus dans les hydrolysats de résineux. L'association des deux techniques de purification principales utilisées dans ce projet : ultrafiltration (sur 1kDa ici) et charbon actif, constitue un moyen efficace pour éliminer plus de 99% de la lignine dans tous les types d'échantillons étudiés ainsi que 100% des produits de dégradation et des monomères, et donc obtenir des puretés en oligosaccharides autour de 99% (contre en moyenne 65% avec le charbon actif seul).

On a vu qu'à l'aide d'une hydrolyse enzymatique de 8h, l'ajout de xylanase et de mannanase (séparément) dans un échantillon contenant des oligosaccharides solubles issus de bois feuillus, permet respectivement de diminuer la masse moléculaire moyenne (Mw pondérée en poids) de 3,22 (initialement) à 2,38 kDa et 2,06 kDa. Comme présenté dans la deuxième partie de ce chapitre, l'ajout de charbon actif dans les rétentats de résineux diminue également la masse molaire moyenne des hydrolysats extraits à 170°C mais augmente celle de ceux extraits à 150°C, déjà bien plus élevée. En revanche, il serait intéressant de tester l'hydrolyse enzymatique afin de diminuer le DP moyen des rétentats de feuillus traités au charbon actif car ils voient leur masse molaire moyenne augmenter avec l'ajout de charbon actif quelle que soit la température d'extraction. La combinaison charbon actif, ultrafiltration et hydrolyse enzymatique, permettrait d'obtenir des mélanges d'oligosaccharides complètement dépourvus de lignine soluble (moins de 1%), de produits de dégradation et de monomères et dont la masse molaire moyenne se rapprocherait au mieux d'un mélange de fructo-oligosaccharides reconnu comme prébiotique.

ANNEXES CHAPITRE IV



Chromatogramme 25 Signal UV (pointilles) et RI (vert en tirets) du retentat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait a $150^{\circ}C$



Chromatogramme 24 Signal UV (pointilles) et RI (tirets) du retentat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait a 150° C et traite a 50g/l de charbon actif



Chromatogramme 28 Signal UV (pointilles) et RI (tirets) du retentat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait a $170^{\circ}C$ et traite a 50g/l de charbon actif



CHROMATOGRAMME 27 SIGNAL LS DU RETENTAT SUR 500 DA DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 150°C ET TRAITE AVEC DE LA MANNANASE PENDANT 8H (BLEU), DE LA XYLANASE PENDANT 10MIN (VERT), 1H (JAUNE) ET 8H (VIOLET)



Chromatogramme 26 Signal UV (pointilles) et RI (bleu en tirets) du retentat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait a $170^{\circ}C$

CHAPITRE V

PURIFICATION ET FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS PRETRAITES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE D'EXCLUSION STERIQUE

I a été montré dans les deux premiers chapitres comment purifier en partie les hydrolysats de bois produits à différentes conditions. Plusieurs étapes de purification (ultrafiltration et charbon actif) ont permis d'éliminer une grande partie de la lignine résiduelle, des produits de dégradation et parfois des monosaccharides. La lignine résiduelle (complexes lignine hydrates de carbone) non éliminée par les traitements au charbon actif et d'ultrafiltration, les sels, et les monomères présents dans les échantillons obtenus grâce aux deux précédents chapitres sont considérés comme des impuretés au même titre que les produits de dégradation des sucres. D'autre part, ces prétraitements ont permis d'obtenir des fractions d'hydrolysat homogénéisées en taille ou nature d'oligosaccharides, plus faciles à analyser que l'hydrolysat de départ. Ces échantillons d'oligosaccharides purifiés ainsi obtenus font donc l'objet d'une purification supplémentaire et caractérisation plus fine grâce à l'utilisation de la chromatographie liquide d'exclusion stérique et de la spectrométrie de masse.

La chromatographie d'exclusion stérique a été choisie pour sa capacité à fractionner des oligosaccharides contenus dans des mélanges en fonction de la masse molaire ou la taille des oligosaccharides et à les séparer des impuretés encore présentes. Cette technique est effectivement assez connue pour les hydrolysats de bois (Stefan Willför et al. 2008). Le principal défi de cette partie expérimentale réside dans la séparation de fractions de biomolécules d'intérêt (notamment pour l'application prébiotique) comprises entre un DP 2 et 10 et l'isolation de certains DP.

Nous souhaitons comprendre dans quelle mesure le prétraitement des hydrolysats (charbon actif et ultrafiltration) facilite leur fractionnement par chromatographie liquide. Les hydrolysats ultrafiltrés sont distingués en deux catégories, avec pour chacune un gel adapté. Il s'agit des hydrates de carbone dit de hautes masses moléculaires contenus dans les rétentats (notés R) et de faibles masses dans les perméats (notés P). Dans les perméats se trouvent la majorité des contaminants alors que les rétentats en sont dépourvus. Les deux premières partie de ce chapitre traitent de la purification des perméats et la troisième partie des rétentats. Les fractions collectées en sortie de colonne sont caractérisées essentiellement par spectrométrie de masse : MALDI-ToF MS pour les plus hautes masses.

D'autre part, nous souhaitons déterminer une ou des configurations privilégiées pour le fractionnement des oligosaccharides dans les liqueurs de bois en fonction de leur volume hydrodynamique et de leur nature. De manière générale, les principaux paramètres qui influencent la séparation par chromatographie à filtration de gel étudiés dans ce chapitre sont les suivants :

- → La force ionique de l'éluant et la température d'élution
- → La longueur et le nombre de colonnes
- → Le type de gel (structure et fonctionnalisation)
- → Le domaine de fractionnement des gels

Par la suite, la stratégie de séparation est organisée en trois parties, définies par trois gels (de noms commerciaux Bio-Gel, HW et Superdex) distincts par leur structure et leur domaine de fractionnement. Au sein de chaque partie, l'influence des paramètres cités ci-dessus est étudiée. Bien que l'application prébiotique cible préférentiellement des oligosaccharides de faible DP, aucune partie de l'hydrolysat n'est laissée de côté. Ainsi, les perméats sont séparés avec des gels de petits domaines de fractionnement (Bio-Gel et HW), et les rétentats avec des gels de hauts domaines de fractionnement (Superdex).

V.A. COLONNES BIO-GEL P2 ET P4 (BIORAD)

Les Bio-Gel P désignent des gels de polyacrylamide microporeux et dépourvus de charges résiduelles obtenus par copolymérisation. Ces gels hautement hydrophiles sont flexibles et ne peuvent donc supporter plus d'un bar de pression. Le choix d'utiliser les Bio-Gel P2 et P4 est justifié par leur emploi assez connu pour la séparation des oligosaccharides de faible degré de polymérisation (Capek et al. 2000). Ces deux domaines de fractionnement permettent de purifier respectivement des masses molaires dans les plages suivantes [100;1,800] et [800;4000] Daltons. Dans cette section, seuls les hydrolysats extraits à 170°C sont étudiés car ils contiennent des oligomères de chaines plus courtes que ceux extraits à 150°C, comme expliqué dans le Chapitre 1.

V.A.1. OLIGOSACCHARIDES EXTRAITS PAR AUTOHYDROLYSE DE BOIS RESINEUX

Le premier système étudié nommé « système a » est composé de deux colonnes semi-préparatives placées en série et remplies de Bio-Gel P-2, dans lequel les analytes sont élués en eau à 25°C à un débit de 0,5 ml.min⁻¹. Le Chromatogramme 29 représente le signal du réfractomètre en mV en fonction du temps. La ligne verticale rouge en pointillés est placée sur le pic correspondant au temps de rétention du monomère de glucose injecté (considéré comme standard). Ce gel ne fait pas la distinction entre un monomère en C5 et en C6, ou encore un acide hexuronique seul, étant donné que leur masse molaire respectives sont proches. On observe que le pic des monomères est plus intense chez les résineux (1) que chez les feuillus (2), ce qui est cohérent avec la quantification par HPAEC des monomères (présentée Chapitre 1) dont la masse représente respectivement 30% et 16% des hydrates de carbone dans les hydrolysats de résineux et de feuillus. On remarque par ailleurs sur le Chromatogramme 29, qu'une grande partie des oligosaccharides contenus dans l'échantillon de feuillus et de résineux est eluée au volume mort du système (correspondant au temps de rétention du dextran à 200 min), sous la forme d'un pic intense et mal résolu. Le standard dextran injecté à une masse molaire de 6000 Daltons, quant aux maltodextrines, il s'agit d'un mélange comprenant du DP 2 au DP 10. On observe aussi sur les Chromatogramme 29 (1) et (2) un deuxième pic correspondant également à des hautes masses molaires élué plus tard.

Au regard de ces premiers résultats, il a été décidé d'injecter le perméat (P1) issu de l'ultrafiltration sur une membrane de 1000 Da de l'hydrolysat de résineux traité avec 50 g.l⁻¹ de charbon actif (nommé P1-50, dont la composition osidique obtenue par GC FID est présentée Tableau 40), sur le *système a*. Le charbon actif retire totalement le furfural et le 5-hydroxymethylfurfural, et 95% de la lignine acide soluble initiale. Bien qu'il n'adsorbe pas en totalité les petits acides organiques, on constate donc une augmentation de 54 à 77% de pureté entre le perméat brut et traité (Tableau 40). C'est également dans le perméat que se trouvent les plus petits oligomères de l'hydrolysat (les plus hautes masses détectées se situent autour de 2000 Da).



Chromatogramme 29 Signal refractometrique obtenu apres Separation de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C (1) de celui de feuillus extrait a 170°C (2), de standards composes de dextran, maltodextrine et glucose (3) sur le systeme a

C'est pourquoi on observe sur le Chromatogramme 30 (1), que la proportion d'oligosaccharides de haute masse décroît alors que le pic des monomères est plus intense en comparaison à l'hydrolysat brut, Chromatogramme 29 (1). On observe également que l'épaulement de très faible intensité situé à droite du pic des monomères, correspondant aux produits de dégradation, est largement atténué. Cependant, les pics liés aux dimères et trimères sont plus larges et moins bien résolus. On constate donc que la séparation n'est pas améliorée.

TABLEAU 40 POURCENTAGE MASSIQUE DES DIFFERENTS MONOSACCHARIDES ET PURETE DE P1, P1-50 ET P3R1-50 (ENTRE 1 ET 3kDa et traite avec 50 g.l⁻¹ de charbon actif) de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C

	Ara	Gal	Glu	ХуІ	Man	Me GlcA	Pureté
Perméat 1 kDa	6,0	8,3	6,7	14,0	19,0	0,4	54,4
	± 5,2%	± 3,9%	± 4,8%	± 6,1%	± 6,2%	± 1,7%	± 1,5%
Perméat 1 kDa	8,3	11,3	9,5	19,4	28,1	0,0	76,7
50 g.l ^{.1}	± 1,7%	± 0,2%	± 1,1%	± 0,5%	± 5,4%		± 1,9%
Perméat 3 kDa Rétentat 1 kDa 50 g.l ⁻¹	0,0	7,3 ± 0,6%	16,1 ± 1,1%	0,7 ± 4,4%	59,5 ± 1,0%	0,0	83,7 ± 0,4%

On cherche à isoler les galactoglucomannanes et les arabinoxylanes contenus dans le perméat P1-50. L'objectif principal est donc de séparer les monomères et les impuretés de faible masse molaire, du reste du perméat traité au charbon actif. Il a été décidé de tester plusieurs configurations, différentes du *système a*.

Le système b est similaire au système a en termes de colonnes chromatographiques. Le principal changement est la température d'élution augmentée à 50°C. Selon le fabricant, l'augmentation de la température peut dans certains cas améliorer la résolution du chromatogramme. Sur le Chromatogramme 30 (2), on observe les DP 2, 3, 4 et 5 apparaître sous forme d'épaulements. La température impacte aussi le gonflement des billes de gel, et fait donc augmenter la pression dans la colonne. Par conséquent, il a été décidé de baisser le débit à 0,3 ml.min⁻¹ afin de maintenir la pression recommandée pour ce type de gel : Cette configuration correspond au système d, représenté sur le Chromatogramme 30 (4). On observe donc des temps d'élution plus longs en raison d'un débit plus faible (4) par rapport au (2).

La nature de la phase mobile impacte également la séparation. C'est pourquoi le *système c*, basé sur le *système a*, a été créé en remplaçant l'eau comme éluant, par du bicarbonate d'ammonium à 0,1M. Le chromatogramme correspondant (élution de P1-50 sur le *système c*) est présenté Chromatogramme 30 (3). L'épaulement de gauche correspondant aux plus hauts DP paraît plus étalé dans le temps. De plus on remarque en comparaison au (1), l'émergence d'un pic très intense à gauche des monomères (correspondant aux DP2 et DP3).



190

Chromatogramme 30 Signal refractometrique obenu apres Separation de P1-50 avec le systeme a (1), systeme b (2), systeme c (3), systeme d (4), systeme e (5)

La dernière configuration étudiée, présentée Chromatogramme 30 (5), est constituée de deux colonnes SEC placées en série. La première contient du Bio-Gel P-4 et la seconde du Bio-Gel P-2 (*système e*). L'élution se fait en eau à 50°C et à un débit de 0,3 ml.min⁻¹. Le principal objectif est d'obtenir une meilleure séparation des oligosaccharides de haute masse, avec le remplacement d'une colonne en BioGel P2 par une colonne en BioGel P4 en comparaison au *système d*. On constate bien une élution plus longue de l'analyte (400 min), mais pas de séparation permettant la purification de certains DP. On observe un retour à la ligne de base entre le pic des monomères et le reste des hydrates de carbone en solution. Ce résultat est très satisfaisant car il permet de purifier un mélange d'oligomères d'hémicelluloses de faibles masses molaires (jusqu'à un DP 15, avec un DP moyen de 6).

L'association de l'ultrafiltration, du charbon actif et de la purification par chromatographie liquide sur le *système e* permet donc d'isoler un mélange quasiment dépourvu de contaminants : 5% de lignine soluble, et sans produits de dégradation ni monomères si l'on fractionne entre 350 et 720 min. Ce mélange composé à 36% d'arabinoxylanes et 64% de galactoglucomannanes a des propriétés proches de celles d'un mélange Orafti® P95 de fructo-oligosaccharides par exemple et c'est ce qui le rend intéressant pour l'application visée.



Chromatogramme 31 Signal refractometrique obtenu apres Separation de P1-50 (1) et P3R1-50 (2) sur une colonne Bio-Gel P4 preparative de 5cm de diametre interne et 1m de long, elution en eau a 50° C et a un debit de 2 ml.min⁻¹

Afin d'étudier la séparation en fonction de la charge des molécules, en plus de la séparation par taille et ce sur des plus grosses quantités, (Reis et al. 2003) un système composé d'une colonne à plus large diamètre interne remplie de Bio-Gel P-4 a été utilisée. En effet, le diamètre étudié ici fait 5 cm, contre 1,5 cm pour les colonnes utilisées précédemment (Chromatogramme 29 et Chromatogramme 30), en revanche la longueur de colonne est identique et vaut 1 mètre. Il a donc été décidé d'injecter 800 mg de P1-50 sur cette colonne avec une élution en eau à 25°C, dont la séparation est représentée Chromatogramme 31 (1). On observe un large pic au volume mort (temps de rétention à 100 min), élué bien en amont et bien séparé d'un massif d'oligosaccharides (début à 490 min). Ce massif inclue le pic des monomères qui ne sont pas du tout séparés des oligomères ici.

Le Bio-Gel P-4 permet de séparer des oligosaccharides dont la masse molaire se situe préférentiellement au-dessus de 800 Da. Il a donc été décidé d'injecter le rétentat sur 1kDa, lui-même ensuite ultrafiltré sur 3kDa (on conserve le perméat de cette dernière filtration), de l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C et traité à 50 g.l⁻¹ noté P3R1-50, dont la composition est donnée Tableau 40. On constate sur le Chromatogramme 31 (2) qui correspond à l'élution de l'échantillon P3R1-50, que les plus faibles DP sont éliminés, avec un pic très faible au temps de rétention des monomères en comparaison au (1). On remarque égalementun pic d'oligomères de haute masse molaire au volume mort, plus intense et beaucoup moins large qu'en (1). Après collecte, on observe que la lignine soluble résiduelle de ces deux échantillons, se trouve sous le pic élué au volume mort.

Pour conclure cette partie, si l'on souhaite obtenir un mélange d'oligosaccharides d'hémicelluloses de bois résineux dépourvus d'impuretés et de faibles masses molaires, avec des propriétés semblables à un mélange de fructooligosaccharides reconnu comme prébiotique, plusieurs étapes sont nécessaires :

- Extraction par autohydrolyse à 170°C avec un ratio liqueur sur bois de 4 ;
- Traitement avec 50 g.l⁻¹ de charbon actif Norit 12x20 mesh ;
- Filtration sur 1kDa afin d'éliminer les produits de dégradation des sucres et les monomères non adsorbés par le charbon actif en conservant donc le rétentat ;
- Une deuxième filtration sur 3kDa en conservant cette fois-ci le perméat afin d'éliminer une partie des complexes lignine hydrates de carbone volumineux et les oligosaccharides de hautes masses molaires ou de hauts DP ;
- Injecter l'échantillon sur une colonne SEC (1 m de long, 5 cm de diamètre interne) remplie de Bio-Gel P-4 en eau à 25°C afin de retirer la fraction correspondant à la lignine résiduelle non adsorbée par le charbon actif (5% en masse). Cette lignine est certainement liée à des complexes qui lui confère un volume hydrodynamique plus gros que les oligosaccharides en mélange et permet donc sa séparation par chromatographie liquide.

Si l'on souhaite conserver les oligomères de plus petite taille, situés en dessous de 1kDa (P1-50), alors il faudra ajouter une étape qui consiste à éluer l'échantillon en eau à 50°C et à un débit de 0,3 ml.min⁻¹ sur deux colonnes SEC (1 m de long, 1,5 cm de diamètre interne) placées en série, la première remplie avec du Bio-Gel P-4 et la seconde avec du Bio-Gel P-2 (*système e*), afin de retirer les monomères et les produits de dégradation des sucres.

V.A.2. OLIGOSACCHARIDES EXTRAITS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE D'UNE PATE KRAFT DE FEUILLUS

Dans cette sous-partie, la matière première source d'oligosaccharides d'hémicellulose change. On étudie des oligomères solubles, extraits par hydrolyse enzymatique d'une pâte kraft blanchie de bois feuillus. Une suspension à 10% (g de pâte sèche par g d'eau), tamponnée à pH 6 et placée à 75°C (conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme étudiée : 1,4-endo-xylanase) a été traitée durant 8 heures. La partie liquide dans laquelle les oligomères d'hémicelluloses provenant de la pâte ont été solubilisés, est récupérée grâce à une simple filtration. Ici nous n'étudions donc pas directement la pâte à papier. Les traitements enzymatiques ont été réalisés par Jahan Golestani, doctorante avec laquelle ce travail a été réalisé en collaboration.

L'objectif ici est le même que précédemment, c'est-à-dire que l'on souhaite fractionner les oligomères de faible DP en fonction de leur taille et les séparer des impuretés et sels présents en solution. Des tests préliminaires ont permis de mettre en évidence que le système b est le plus adapté pour une bonne séparation de ce type d'échantillon. C'est pourquoi après microfiltration et lyophilisation, cet échantillon a été injecté sur le système b, présenté dans la section précédente et composé de deux colonnes SEC Bio-Gel P-2 en série (L=1m, Ø=1,5cm), éluées en eau à 0,3 ml.min⁻¹.



Chromatogramme 32 Signal refractometrique obtenu apres Separation de l'echantillon traite avec de la Xylanase durant 8 h sur deux colonnes SEC Bio-Gel P-2 placees en serie, elution en eau a 50° C et a un debit de 0,3 ml.min⁻¹

On observe sur le Chromatogramme 32, une belle séparation de l'échantillon injecté avec trois pics majeurs (notés F1, F2 et F3) et deux pics résiduels non référencés sur le chromatogramme. Le pic correspondant à la première fraction (éluée en premier à 250 min), est constitué de l'enzyme désactivée, de sa solution commerciale couleur orangée, et principalement d'oligomères de xylanes chargés d'acides 4-*O*-méthylglucuronique, comme présenté sur le Spectre 6, obtenu par MALDI-TOF MS en mode réflectron positif de la fraction F1. On observe que le pic le plus intense de cette fraction est un xylane de DP4 avec un groupe acide méthylglucuronique (noté X₄-4-O-MeGlcA) suivi de son homologue en DP5.

On observe un massif en amont du pic en m/z 627, dont on peut observer le détail zoomé sur le Spectre 8. On constate alors que cette fraction contient des oligosaccharides de natures très diverses, notamment des oligomères provenant probablement d'arabinogalactanes ou de xyloglucanes (notés X_nH_xOAc) ou encore de mannanes acétylés (notés H_xOAc). Certaines masses (m/z en 509, 525, 539, 555, 569 et 585) peuvent également correspondre à des trimères de rhamogalacturonanes et d'homogalacturonanes non acétylés (notés GalAmRhap).



SPECTRE 6 OBTENU PAR MALDI TOF MS EN MODE REFLECTRON POSITIF DE LA FRACTION F1

Un dernier zoom de la fraction F1 a été réalisé par MALDI-TOF MS en mode linéaire positif entre 1300 et 1700 m/z, présenté sur le Spectre 7. On observe alors que les plus hautes masses correspondent à des xylanes neutres et chargés d'acides hexuroniques. A moins donc d'avoir recours à une ultrafiltration sur un seuil de coupure assez haut (3000 Da) et d'en conserver le perméat, la séparation de ce type d'oligomères de l'enzyme désactivée et de la solution commerciale n'est pas rendue possible avec l'injection sur colonnes SEC Bio-Gel et élution en eau. Il serait intéressant de tester une élution en bicarbonate d'ammonium.



SPECTRE 7 OBTENU PAR MALDI TOF MS EN MODE LINEAIRE POSITIF DE LA FRACTION F1, ZOOME ENTRE 1300 ET 1700 M/Z



SPECTRE 8 ZOOM OBTENU PAR MALDI TOF MS EN MODE REFLECTRON POSITIF DE LA FRACTION F1

Les Spectre 9 et Spectre 10 obtenus par MALDI-TOF MS en mode linéaire positif présentent respectivement les spectres de masse des fractions F2 et F3. Le pic le plus intense du Chromatogramme 32 (F3), et qui représente donc la fraction massique majoritaire de l'échantillon, correspond à un oligomère de xylane composé de deux unités monomères (cf. Spectre 10, m/z = 303). On observe également des massifs de plus faible intensité qui correspondent tous, sauf le pic en m/z = 436,9 qui est un trimère de xylose, à des pics de matrice. La matrice a été analysée avec un échantillon à blanc et tous les pics répertoriés ont ainsi été soustraits aux pics de chaque échantillon.

La fraction F2 est composée essentiellement d'un trimère de xylose (pic le plus intense à 436 m/z). On observe également deux pics résiduels en m/z 569 et 701 correspondant respectivement aux DP 4 et 5 de xylane (cf. Spectre 9). Il est intéressant de constater que ce système chromatographique est donc particulièrement adapté au fractionnement des oligomères neutres de faible DP.



Spectre 10 Obtenu par Maldi ToF MS en mode lineaire positif de la fraction F3 $\,$

SPECTRE 9 OBTENU PAR MALDI TOF MS EN MODE LINEAIRE POSITIF DE LA FRACTION F2

CONCLUSION SUR LA PARTIE V.A. Colonnes Bio-Gel P2 et P4 (Biorad)

Dans l'ensemble, les systèmes SEC en Bio-Gel P-2 et P-4 utilisés dans cette partie, sont limités pour le fractionnement d'oligomères issus de mélanges très polydispersés et provenant d'autohydrolysats prétraités par ultrafiltration et charbon actif. En effet, ces systèmes permettent de séparer certains oligosaccharides d'intérêt de faible DP, or les perméats étudiés contiennent des oligosaccharides de DP supérieur à 10. Par ailleurs, il est possible d'isoler des impuretés telles que la lignine soluble résiduelle attachée à des oligosaccharides (éluée au volume mort et bien séparée avec une colonne préparative) et des produits de dégradation et monosaccharides (élués en dernier avec deux colonnes semi-préparatives). L'emploi de colonnes SEC Bio-Gel P-6 voire avec des domaines de fractionnement supérieurs est à explorer pour le fractionnement des perméats issu d'hydrolysats de feuillus comme de résineux. Il serait également pertinent d'utiliser des colonnes plus longues ou bien des systèmes composés de trois colonnes au lieu de deux.

D'autre part, les mélanges d'oligomères d'hémicelluloses provenant de pâte à papier extraits par hydrolyse enzymatique, et en particulier de bois feuillus, le système b composé de deux colonnes Bio-Gel P-2 semble cette fois-ci adéquat pour à la fois une purification de certains DP et l'élimination des contaminants. Il est à noter qu'une élution de ce même échantillon en carbonate d'ammonium 0.1 M, sur trois colonnes Hi Load Superdex S30 à température ambiante, permet également la purification des DP2, 3, 4, 5 et 6 (visible Chromatogramme 44).

V.B. COLONNES SEC HW-40s (TOYOPEARL)

Le choix du gel HW-40S produit par Toyopearl réside principalement dans ses propriétés hydrophobes et semi-rigides, qui contrairement à un Bio-Gel P, supporte mieux la pression. En effet il s'agit d'une résine polyméthacrylique hautement fonctionnalisée en groupes hydroxyle, ce qui lui confère un caractère permettant des interactions polaires. Son utilisation a été brevetée pour la purification d'arabinoxylooligosaccharides (Shiiba et Hara 1998) et donc semble particulièrement adapté à cette étude. Ce gel permet de séparer des molécules dont la masse molaire est préférentiellement comprise entre 100 et 7000 Da (10kDa pour les protéines), donc convient bien à l'étude des hydrolysats de bois feuillus comme résineux.

V.B.1. INFLUENCE DE L'ELUANT ET DU DIAMETRE DE COLONNE

Au vu du domaine de fractionnement de ce gel, il a été décidé de tester trois seuils de coupure différents sur l'hydrolysat extrait à 170°C : 1, 3 et 10kDa en conservant le perméat des filtrations. La composition osidique de ces échantillons, exprimée en pourcentage massique, est présentée Tableau 41. Tous ces perméats ont été traités à 50g/l de charbon actif.

Une première injection du perméat sous 1kDa a été réalisée sur une colonne SEC HW-40S (L=1m, Ø=1,5cm), avec une élution en eau à température ambiante (cf. Chromatogramme 33). On observe le pic des monomères très intense (le plus à droite) et une séparation non optimale des oligosaccharides. L'épaulement à gauche du chromatogramme est constitué de la lignine résiduelle de l'échantillon, avec un plus gros volume hydrodynamique que le reste des oligomères en solution.

	Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose	Mannose	Pureté
P10-50	6,6 ± 7,0%	10,5 ± 2,4%	10,8 ± 6,8%	15,2 ± 8,5%	37,1 ± 7,5%	80,1 ± 2,5%
P3-50	6,3 ± 1,6%	9,4 ± 1,5%	9,0 ± 3,0%	13,0 ± 10,7%	35,7 ± 2,1%	74,5 ± 1,5%
P1-50	8,3 ± 1,7%	11,3 ± 0,2%	9,5 ± 1,1%	19,4 ± 0,5%	28,1 ± 5,4%	76,7 ± 1,9%

TABLEAU 41 POURCENTAGE MASSIQUE DES DIFFERENTS SUCRES ET PURETE DE P1-50, P3-50 ET P10-50 (PERMEATS DE 1, 3 ET 10kDa et traite avec 50g.l-1 de charbon actif) de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C



Chromatogramme 33 Signal refractometrique obtenu apres Separation de P1-50 sur une colonne SEC HW40s (L=1m, \emptyset =1,5cm), elution en eau a 25°C

Il a été décidé d'utiliser une colonne de plus grand diamètre (5 cm) (cf. Chromatogramme 34), pour la séparation des échantillons P1-50 (2) et P3-50 (1), en utilisant deux éluants différents, l'eau et le carbonate d'ammonium 0.1M. On observe tout d'abord une meilleure séparation des hautes et des petites masses molaires lors de l'élution en carbonate d'ammonium (notamment concernant l'échantillon P3). On remarque que dans la séparation en eau de l'échantillon P3-50, les monomères et les impuretés coéluent pour former un pic large en fin de chromatogramme. Les molécules de hautes masses molaires forment également un amas bien moins séparé que lors de l'élution en carbonate d'ammonium. Le chromatogramme de l'échantillon P10-50, montre un plus gros épaulement au volume mort de la colonne du fait de sa plus forte concentration en oligosaccharides de plus haut DP. L'utilisation de cette colonne SEC HW-40 S de plus gros diamètre, a permis d'améliorer la séparation des oliaomères. particulier pour l'échantillon P1-50 en si l'on compare au Chromatogramme 33.

Enfin, un pic à 320 min avec un épaulement est élué au volume mort lors de la séparation de l'échantillon P1-50 en eau. Il apparaît sur le Chromatogramme 35 (2). De la même manière que sur le Chromatogramme 33, ce pic concentre la lignine soluble de l'échantillon. L'élimination de la lignine n'est donc rendue possible que pour des perméats sous 1 kDa, et en éluant en eau. En effet, ce pic n'est pas observé sur le Chromatogramme 34 (1) de gauche ni sur le Chromatogramme 35 (1), qui correspondent respectivement à la séparation des échantillons P3-50 en eau et P1-50 en carbonate d'ammonium à 0,1 M. C'est pourquoi la purification a été effectuée en eau, afin de retirer les impuretés type produits de dégradation avec les monomères et la lignine résiduelle.



CHROMATOGRAMME 34 COLONNE SEC HW40s (L=1m, Ø=5cm)

Signal refractometrique obtenu apres Separation de P3-50 (1), P1-50 (2) et des standards de glucose et trehalose (3) a gauche en eau a 25° C

Signal refractometrique obtenu apres Separation de P10-50 (1), P3-50 (2) et des standards de glucose, trehalose et D-raffinose (3) a droite en carbonate d'ammonium a 25° C

V.B.2. FRACTIONNEMENT DU PERMEAT DES RESINEUX

Le Chromatogramme 35 présente les signaux réfractométriques obtenus après séparation de l'échantillon P1-50 sur colonne SEC HW40 (L=1 m, Ø=5 cm), avec élution en carbonate d'ammonium 0,1M (1) et en eau (2). On constate une meilleure séparation des impuretés (supposées être éluées en F2) et des monosaccharides (pic à 600 min), lors de l'élution en carbonate d'ammonium (1) que lors de l'élution en eau (2). Or on souhaite retirer à la fois les monomères et les impuretés du reste de l'hydrolysat. On constate que le Chromatogramme 35 (2) montre une meilleure séparation entre le pic du glucose et le pic se situant à sa gauche (entre le monomère et le dimère). Les fractions F1 (vert) et F2 (jaune) ont donc été collectées après séparation sur colonne SEC HW40S et élution en eau, afin de purifier uniquement le mélange d'oligosaccharides à partir du dimère (F1).



Chromatogramme 35 Signal refractometrique obtenu apres Separation du P1-50 de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C en carbonate d'ammonium (1) et en eau (2) sur une colonne SEC HW40s (L=1m, \emptyset =5cm) a 25°C et 2 ml.min⁻¹

Les masses détectées au MALDI ToF MS en modes réflectron et linéaire positif dans l'échantillon, correspondant à la deuxième fraction (SW170 P1-50 Fraction 2), sont les suivantes : 173 m/z (monomère de pentose), 203 (monomère d'hexose), 304 m/z (dimère de pentose) et 365 m/z (dimère de pentose). Ces analyses sont présentées par le Spectre 12, obtenu par ESI, qui montre également des trimères composés à la fois d'unités pentoses et hexoses. On remarque que dans cette fraction, aucun sucre n'est acétylé.

Comme attendu, dans la fraction F1, dont le spectre de masses est représenté Spectre 11 (SW170 P1-50 F1), il n'y a pas de monosaccharides et le premier pic en m/z 365 correspond à un dimère à deux unités hexose. On trouve des xylanes non acétylés de petits DP (4,5,6 et 7), mais la majorité des oligosaccharides sont des mannanes acétylés du DP2 au DP 11. Si l'on zoome dans les plus hautes masses en mode linéaire positif on observe un pic résiduel qui fait presque partie du bruit en 2148 qui correspond à un mannane de DP 13. Les résultats de GPC MALS de la fraction F1 donnent une Mw de 740 Da et une Mn de 519 Da (D = 1,4).



SPECTRE 12 SPECTRE DE MASSE OBTENU PAR ESI MS DE LA FRACTION F2 (CF. CHROMATO 7)



SPECTRE 11 SPECTRE DE MASSE OBTENU PAR MALDI TOF MS EN MODE REFLECTRON POSITIF DE LA FRACTION F1 (CF. CHROMATO 7)

N

V.B.3. FRACTIONNEMENT DU PERMEAT DE FEUILLUS

Comme pour le perméat de l'hydrolysat de résineux, il a été décidé de fractionner le perméat de feuillus traité à 50 g.l⁻¹ de charbon actif, dans les mêmes conditions (colonne SEC HW40S L=1m, Ø=5cm, élution en eau à 25°C). Quatre fractions (notées F1, F2, F3 et F4 par ordre d'élution) ont été collectées et analysées par spectrométrie de masse, leurs délimitations temporelles en termes de temps de rétention sont représentées par des droites verticales en pointillés de différentes couleur sur le Chromatogramme 36.



Chromatogramme 36 Signal refractometrique obtenu apres Separation du P1-50 de l'hydrolysat de feuillus extrait a 170°C en eau sur une colonne SEC HW40s (L=1m, \emptyset =5cm) a 25°C et 2 ml.min⁻¹

On observe en comparaison à la séparation du SW170 P1-50, que sur le Chromatogramme 36, le pic élué au volume mort, correspondant à la fraction notée F1 (142 mg sec après lyophilisation), est comparable au pic en début du Chromatogramme 35 (2) (non collecté), car il contient la lignine soluble résiduelle de l'échantillon. On a vu dans les chapitres précédents que la concentration initiale en lignine soluble est deux fois supérieure dans l'hydrolysat de feuillus par rapport à celui de résineux extrait à la même température. On a également constaté que même si la capacité d'adsorption du charbon actif est plus grande dans les hydrolysats de feuillus, la quantité d'impuretés (lignine soluble et produits de dégradation) restante après traitement au charbon actif y est plus élevée que dans l'hydrolysat de résineux. Pour rappel, après traitement à 50 g.l⁻¹, il reste 0,1 g.l⁻¹ de lignine dans l'hydrolysat de résineux et 0,3 dans celui des feuillus.

Il semble donc logique que le pic de gauche (F1 en vert) sur le Chromatogramme 36 soit plus intense et représente un plus grand pourcentage de l'échantillon P1-50 de l'hydrolysat de feuillus que de résineux. De plus, cette lignine sort au volume mort et présente un plus gros volume hydrodynamique que le reste des oligomères en solution car elle est attachée à des xylanes chargés. Ces résultats sont visibles Spectre 17.



SPECTRE 13 SPECTRE DE MASSES OBTENU PAR ESI MS DE LA FRACTION F4

L'analyse par spectrométrie de masse (ESI MS) de la fraction F4 (161 mg sec après lyophilisation) est donnée sur le Spectre 13. Dans cette fraction, on doit essentiellement retrouver des monomères et des impuretés, et éventuellement quelques dimères comme la séparation est incomplète. On observe qu'à l'exception du pic en m/z 203 dont la masse est celle d'un monomère d'hexose, tous les pics qui apparaissent sur le Spectre 13 correspondent à des xylo-oligosaccharides acétylés une à deux fois, du monomère au trimère, le plus intense étant l'ion 347 correspondant à un dimère de pentoses acétylé une fois. La Fraction F4 semble donc impactée par la mauvaise séparation (cf. Chromatogramme 36) des petits oligomères. On voit également sur le Spectre 15 obtenu en réflectron positif de la fraction F4 qu'elle comporte un pic non identifié à un m/z de 410 et qui, à fortiori, ne correspond pas à un pic de matrice. Il est intéressant de constater que la fraction F3 (77 mg sec après lyophilisation) contient du DP2 au DP7 essentiellement de xylanes (les pics non assignés ou de très faible intensité sont des pics de matrice). Son spectre de masse est représenté Spectre 14. Il y a un très faible signal en m/z = 219 qui correspond au monomère d'hexose à cause d'une séparation chromatographique insuffisante (pas de retour à la ligne de base). Les six pics principaux sont des xylanes de structures suivantes :

- m/z = 695 : X₄ OAc₃ ; m/z = 653 : X₅ OAc₂
- m/z = 521 : X₃ OAc₂ ; m/z = 479 : X₃ OAc₁
- $m/z = 305 : X_2$; $m/z = 347 : X_2 OAc_1$

Les seuls mannanes détectés dans cette fraction F3 ont les structures suivantes (où H est noté pour unité anhydrohexose) : H_2 (m/z = 365) et H_2OAc_1 (m/z = 407).



SPECTRE 14 SPECTRE DE MASSE OBTENU PAR MALDI TOF MS EN MODE LINEAIRE POSITIF DE LA FRACTION F3



Spectre 15 Spectres de masse obtenu par MALDI TOF MS en mode reflectron positif du P1-50 de l'hydrolysat de feuillus extrait a 170°C, et des fractions F1, F2, F3 et F4 de ce meme echantillon obtenues par chromatographie liquide sur une colonne SEC HW-40S (Ø=5cm) a 25°C et 2 ml.min⁻¹



SPECTRE 17 SPECTRE DE MASSE OBTENU PAR ESI MS DE LA FRACTION F1





On observe, sur un même intervalle de masses (de 500 à 1100 m/z), qu'aucun pic similaire n'est retrouvé de manière commune dans les fractions F1 et F2. En effet, la fraction F1 est essentiellement constituée de xylanes acétylés comportant des groupements 4-O-méthylglucuroniques, tandis que la fraction F2 (209 mg sec après lyophilisation) contient des xylanes qui en sont dépourvus. Comme expliqué N plus haut, ce résultat semble cohérent avec la littérature qui indique que la lignine 🦰 impliquée dans des complexes lignine hydrates de carbone est liée en majorité à des 🛁

oligomères d'hémicellulose chargés en acide hexuroniques et des pectines (Yongchao Zhang et al. 2019; Giummarella et Lawoko 2017). Le perméat semble contenir des xylo-oligosaccharides de masses supérieures au seuil de coupure de 1000 Daltons. La séparation entre xylanes chargés et neutres est illustrée pour des ions allant jusqu'à 1800 en m/z (cf. Spectre 19 et Spectre 20 dans les Annexes).

Pour conclure sur cette partie V.B. Colonnes SEC HW-40s (Toyopearl), la purification du perméat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus traité au charbon actif à 50 gl⁻¹, par chromatographie liquide sur colonne SEC HW-40S (L=1m, Ø=5cm), nécessite une élution en eau. En effet, cela permet de séparer les xylooligosaccharides neutres et chargés d'acides hexuroniques, de ceux formant des complexes lignine hydrates de carbone, qui sont exclus de la colonne. La séparation de la lignine résiduelle impliquée dans des LCC est également réalisée dans les mêmes conditions opératoires (élution en eau à 25°C sur une colonne SEC HW-40s L=1m, Ø=5cm à un débit de 2 ml.min⁻¹), pour l'échantillon de perméat sous 1kDa de l'hydrolysat de résineux traité au charbon actif à 50 gl-1. Les deux signaux du réfractomètre sont assez semblables entre le perméat des feuillus et des résineux (Chromatogramme 35 (2) et Chromatogramme 36 respectivement). On observe un pic correspondant à la lignine soluble résiduelle et/ou les oligomères d'hémicellulose chargés en tête de chromatogramme, puis un massif correspondant respectivement à des xylanes et galactoglucomannanes acétylés entre DP2 et DP 11, et enfin un large pic composé des monosaccharides et des impuretés de petites masses molaires (beaucoup mieux séparé dans l'hydrolysat de résineux). Toutefois, on n'observe pas un retour total à la ligne de base entre ce pic et le massif des oligosaccharides de taille supérieure à un DP2.

Il serait intéressant de tester une colonne SEC HW-50 (limite d'exclusion à 20 kDa), pour séparer la lignine résiduelle du perméat sous 3kDa, car ceci n'est pas rendu possible avec un gel HW-40. Comme attendu, la séparation de la lignine résiduelle non adsorbée par le charbon actif n'est pas réalisable avec une élution en carbonate d'ammonium à 0,1M. On peut supposer que les charges des complexes lignine hydrates de carbone sont écrantées par le contre ion de l'éluant chargé en ammonium ou bien que les complexes se conforment différemment lorsqu'ils sont dans l'eau. Le pH basique (10,3) et la force ionique suffisante (1 mol/l ici) imposé par une élution en carbonate d'ammonium 0,1M permet en revanche une meilleure séparation entre les dimères, les monomères et les impuretés de plus faible masse molaire.

V.C. COLONNES HI LOAD SUPERDEX (GE HEALTHCARE)

V.C.1. CONFIGURATION A TROIS COLONNES SEC HI LOAD SUPERDEX 30

Dans cette partie, l'objectif principal est de retirer les monomères et les impuretés de faible masse molaire, du reste des oligomères dans l'hydrolysat. Ceci a déjà été réalisé en chromatographie liquide d'exclusion stérique en utilisant une colonne SECSuperdex 30 pg (grade préparatif de 10 cm de diamètre et 29 cm de hauteur, pour des hémicelluloses solubles d'épicéa (M Palm 2004). Le système étudié ici est composé de trois colonnes SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 30 pg (limite d'exclusion à 10kDa, taille des particules 34 µm) en série, avec une détection par réfractométrie. L'élution est réalisée en eau ou en carbonate d'ammonium 0.1M à un débit de 1,2ml/min. Les hydrolysats bruts de feuillus et résineux élués en eau, montrent un pic intense correspondant aux monosaccharides et aux impuretés de faible masse molaire qui sont excluent au même temps de rétention en fin de chromatogramme, voir Chromatogramme 37 (1). La séparation des petits oligosaccharides (jusqu'à DP 3) est meilleure dans les échantillons de résineux que de feuillus.



CHROMATOGRAMME 37

SIGNAL REFRACTOMETRIQUE OBTENU APRES SEPARATION DE L'HYDROLYSAT DE RESINEUX EXTRAIT A 170°C EN EAU (1), EN CARBONATE D'AMMONIUM (2) ET TRAITE A 30G.L⁻¹ DE CHARBON ACTIF (3) A GAUCHE

SIGNAL REFRACTOMETRIQUE OBTENU APRES SEPARATION DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 170°C EN EAU BRUT (1), EN CARBONATE D'AMMONIUM BRUT (2) ET TRAITE A 30G.L-1 DE CHARBON ACTIF (3) A DROITE

Le pic correspondant aux oligomères DP2 est mieux résolu lors de l'élution en carbonate d'ammonium à 0,1M qu'en eau, que ce soit pour l'hydrolysat de feuillus ou de résineux, cf. Chromatogramme 37 (2). Les Chromatogramme 37 (3) présentent la séparation des hydrolysats traités (résineux à gauche et feuillus à droite), élués en carbonate d'ammonium à 0,1M sur le système étudié. On observe que le traitement au charbon actif de l'échantillon d'hydrolysat de résineux, allié à une élution en carbonate d'ammonium à 0,1M, semble permettre une bonne séparation du pic des monosaccharides En revanche cette combinaison n'améliore pas la séparation de l'hydrolysat de feuillus, il semble même que les DP1, 2 et 3 coéluent. Globalement, cette configuration ne permet pas la purification des oligosaccharides de petite taille du fait que de grandes masses molaires soient présentes dans les hydrolysats bruts (jusqu'à 4500 Da).



Chromatogramme 38 Signal refractometrique obtenu apres Separation en eau de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C note SW170 (gris) et de ce meme hydrolysat traite avec de la mannanase durant 15 min (haut) et 1h (bas)



Chromatogramme 39 Signal refractometrique obtenu apres Separation du P3-50 (1) et P1-50 (2) en eau, et du P1-50 en carbonate d'ammonium a 0,1M (3) de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C, sur 3 colonnes SEC Hi Load superdex 30

Deux techniques ont donc été employées afin de diminuer la masse molaire moyenne des oligosaccharides en mélange dans l'hydrolysat brut de résineux extrait à 170°C. D'une part une hydrolyse enzymatique avec de l'endo-mannanase pendant 15 min et 1 h (Chromatogramme 38) et d'autre part une filtration sur 3kDa et 1kDa alliée à une détoxification avec l'ajout de 50g.l⁻¹ de charbon actif (on conserve alors les perméats des filtrations, notés P3-50 et P1-50, Chromatogramme 39). Le traitement enzymatique diminue significativement la présence de molécules de hautes masses molaires, comme le montre la diminution de l'épaulement entre 300 et 450min d'élution. On observe également une meilleure définition des pics correspondant aux DP 2, 3, 4 et 5. Après vérification par quantification des monosaccharides par HPAEC-PAD, il n'y a pas de formation ou production de monomères avec ce traitement. Le pic saturé à 630 min correspond aux sels de la solution commerciale contenant l'enzyme. Ce que l'on observe c'est l'isolation de ce pic du reste de l'hydrolysat traité durant 15 min.

On constate en revanche, Chromatogramme 39, une élimination des hautes masses molaires du mélange, illustré par l'aplatissement presque totale de l'épaulement qui s'étend de 300 à 600 min de temps de rétention (plus marquée dans le P1-50). Cependant, la filtration membranaire n'améliore pas pour autant la séparation des faibles DP, que ce soit pour une élution en eau ou en carbonate d'ammonium à 0,1M, si l'on compare le Chromatogramme 37 et le Chromatogramme 39.

V.C.2. CONFIGURATION A TROIS COLONNES SEC HI LOAD SUPERDEX S200-S75-S75

Le gel Superdex composé de dextran et d'agarose hautement réticulé, est connu pour la séparation entre xylo-oligosaccharides solubles neutres et chargés de peuplier (Teleman et al. 2000) et la séparation de galactoglucomannanes d'épicéa (Lundqvist et al. 2003). Le même montage FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) est utilisé pour ces deux études, il est constitué d'une pré-colonne montée en série avec une colonne SEC Hi Load Superdex® 75 et une colonne SEC Hi Load Superdex® 200, avec une élution en eau. Ces deux colonnes ont une limite d'exclusion de 70 kDa et 600 kDa respectivement. Dans cette partie nous étudions ce même type de colonnes, également à température ambiante avec une élution en eau, mais avec un diamètre de colonne plus important.

V.C.2.a. INFLUENCE DU SEUIL DE COUPURE DES MEMBRANES D'ULTRAFILTRATION

Un premier essai a été réalisé sur l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C, sur un système constitué d'une colonne SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 200 pg placée en série avec une colonne SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 30 pg. Cet essai n'a pas été concluant et a donc amené à la création du système a composé de deux colonnes SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 75 pg. On peut observer une séparation sur le Chromatogramme 43 en Annexes, du rétentat sur 1kDa de l'hydrolysat de résineux. Ce montage, en revanche, ne fonctionne pas sur le rétentat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C, voir Chromatogramme 40 (1), car il n'y a aucune séparation de pics. Ce même échantillon a donc été injecté sur le système b, composé d'une colonne SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 200 pg placée en série avec deux colonnes SEC Hi Load Superdex® 75 pg, cf Chromatogramme 40 (3). Cette configuration a été créée spécialement pour les oligomères d'hémicellulose de feuillus extrait à faible température. En effet, leur séparation nécessite l'ajout d'une colonne de plus grand domaine d'exclusion. Les chaines de xylanes longues et chargées d'acides 4-O-méthylglucuronique, ont des masses molaires plus élevées et sont souvent liées à des morceaux de lignine soluble, comme vu dans les chapitres précédents. Sur le Chromatogramme 40 (3), on constate ainsi une élution en deux temps avec un retour à la ligne de base à 420 min. La séparation n'est pas améliorée pour ces mêmes échantillons ultrafiltrés avec un plus haut seuil de coupure membranaire (3kDa), voir Chromatogramme 46 en Annexes du Chapitre V.



Chromatogramme 40 Separation du HW150 R1 (retentat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait a 150°C) sur le systeme a (1) et sur le systeme b (3), du HW150 R500 (retentat sur 500 Da) sur le systeme b (2), de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) de l'hydrolysat brut de feuillus extrait a 170°C HW170 (4), du HW170 R500 (5) et du HW170 R1 (6) sur le systeme b (2) du HW170 R500 (5) et du HW170 R500 (5) et

La même stratégie a été reproduite pour les hydrolysats extraits à 170°C, et montre cette fois un retour à la ligne de base entre deux larges pics, voir Chromatogramme 40 (5) et (6), visible à la fois pour les échantillons ultrafiltrés sur une membrane dont le seuil de coupure est de 500 Da et de 1 kDa. On constate également sur le Chromatogramme 40 (3) correspondant à l'élution du rétentat sur 1kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait à 150°C, que le large pic qui est élué en premier (250 – 450 min), débute au volume mort de la colonne et représente plus de 70% du mélange. En revanche son homologue dans l'extrait à 170°C, Chromatogramme 40 (6), représente seulement 46% de l'échantillon. On remarque de manière générale sur les Chromatogramme 40 (2) et (3), contrairement au Chromatogramme 40 (5) et (6), que la majorité des oligosaccharides de l'échantillon sont élués sous forme de nombreux pics mal résolus dans l'intervalle de temps de rétention [250; 500 min]. On peut donc penser, considérant les résultats obtenus dans les chapitres précédents, que ce pic correspond aux molécules chargées (oligosaccharides de type méthylglucuronoxylane et pectine).

On remarque également que plus le seuil de coupure des membranes est haut, plus la part de molécules chargées est grande dans le rétentat, cette part représente respectivement 36% et 46% de l'échantillon de feuillus (170°C) filtré sur 500 Da et 1 kDa. En effet, si l'on observe les Chromatogramme 40 (5) et (6) correspondant aux rétentats ultrafiltrés sur les seuils 500 Da et 1kDa, on constate que le pic de droite élué en dernier (censé correspondre aux oligosaccharides neutres) est moins intense et moins large dans l'échantillon ultrafiltré sur 1 kDa (en comparaison à celui filtré sur 500 Da).



Chromatogramme 41 Signal refractometrique obtenu apres Separation de l'hydrolysat brut de resineux extrait a $170^{\circ}C(1)$, de son retentat sur 1kDa (2), sur 3kDa (3) et sur 5kDa (4) sur le systeme b

Cette observation est valable pour les échantillons de résineux, également extrait à 170°C. Les Chromatogramme 41 (2), (3) et (4) correspondent à la séparation de l'hydrolysat de résineux produit à 170°C ultrafiltré sur des seuils de coupure de 1, 3 et 5 kDa. Ils montrent que la part de molécules chargées et/ou liées de manière covalente à de la lignine soluble augmente de 10% à 34% (rétentat sur 1 et 5 kDa). Il se trouve que les oligosaccharides qui sont élués sous ce pic ne sont pas impactés par un traitement au charbon actif (50 g.l⁻¹) dans le rétentat sur 5kDa de l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C (cf. Chromatogramme 45 en Annexes). En effet, on remarque un décalage du pic supposé des oligomères neutres vers la droite du chromatogramme, donc vers un plus grand temps de rétention. Ceci est cohérent avec le calcul de la masse molaire moyenne obtenu par GPC MALS dans le Chapitre 2 qui montre bien une diminution de celle-ci entre les rétentats des échantillons de résineux extraits à 170°C et ces mêmes rétentats traités au charbon actif. Il semble que les molécules adsorbées par le charbon actif, dans les rétentats, soient des oligomères neutres de faible masse molaire. C'est en accord avec le fait que des complexes lignine hydrate de carbone, présents dans le pic de gauche, sont sans doute trop volumineux pour être adsorbés.

Il est important de noter que, toute essence confondue, à une température d'extraction de 170°C, une ultrafiltration sur 1kDa est nécessaire pour observer une séparation entre les oligomères supposés neutres et chargés, à la fois sur le système a et b. En effet les Chromatogramme 40 (4) et Chromatogramme 41 (1) montrent deux pics très intenses confondus en un seul large pic.

V.C.2.b. ANALYSES DES FRACTIONS OBTENUES PAR MALDI-TOF MS

Dans cette partie il a été choisi de collecter les fractions F1 et F2 des échantillons extraits à 170°C, comme détaillé sur le Chromatogramme 42, dont les bornes de temps de rétention varient en fonction de l'échantillon. La collecte a donc été réalisée sur le rétentat R1 de l'échantillon de résineux et de feuillus, et R500 de l'échantillon de feuillus. Des collectes ont également été réalisées sur l'échantillon R1 de feuillus traité à 30 g.l⁻¹ de charbon actif.

Les fractions obtenues pour l'échantillon de résineux ont été analysées par GC FID dont les Chromatogramme 47 et Chromatogramme 48 obtenus respectivement pour les fraction F1 et F2, sont présentés en Annexes. Les résultats de cette quantification sont présentés sous forme de pourcentages massiques de sucre dans chaque fraction dans le Tableau 42. On remarque immédiatement que la fraction F2 éluée en dernier est composée essentiellement de galactoglucomannanes.La fraction F1 éluée en premier, est quant à elle composée d'un mélange plus complexe constitué de méthylglucuronoxylanes et de rhamnogalacturonanes.

 TABLEAU 42
 COMPOSITION OSIDIQUE DES FRACTIONS F1 ET F2 DE L'HYDROLYSAT DE RESINEUX EXTRAIT A 170°C, OBTENUS

 APRES SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE SUR LE SYSTEME B, EXPRIMEE EN POURCENTAGE MASSIQUE

	Gal	Glu	Xyl	Man	Rha	GalA	MeGlcA
SW170 R1 F1	10,6 ±0,6%	7,5 ±0,1%	6,6 ±0,6%	18,7 ±0,6%	4,4 ±0,8%	6,5 ±2%	1,4 ±1,7%
SW170 R1 F2	6,9 ±1,9%	17,4 ±2%	0,4 ±8,3%	52,5 ±1,5%	0,0	0,0	0,0
Le ratio molaire Man:Glu:Gal vaut respectivement 2,5 :1 :1,4 et 3 :1 :0,4 dans les fractions F1 et F2. Ces ratios montrent soit la présence de galactanes, soit des structures de galactoglucomannanes différentes de celles trouvées dans la fraction F2. Les ratios molaire 4-O-Me GlcA: Xyl et GalA: Rha dans la fraction F1 valent 1,5 et 1,2. Ils sont cohérents avec les résultats obtenus précédemment.

Il est à noter qu'on ne détecte ni rhamnose ni acide galacturonique dans le rétentat R1 de l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C, bien qu'on en trouve dans l'hydrolysat brut. Le fait que des pourcentages relativement élevés soient détectés dans la fraction F1 laisse penser que leur quantité est présente en dessous du seuil de détection de l'appareil GC-FID, dans le R1. Comme les fractions HW170 R500 F1 et HW170 R1 F1, la fraction F1 de l'échantillon de résineux contient la lignine résiduelle de tout l'échantillon.



CHROMATOGRAMME 42 SIGNAL REFRACTOMETRIQUE OBTENU APRES SEPARATION SUR LE SYSTEME B DES ECHANTILLONS DONT LA COLLECTE A ETE EFFECTUEE AVEC DEUX FRACTIONS NOTEES POUR CHACUN F1 ET F2.

- (1) RETENTAT SUR 1KDA DE L'HYDROLYSAT DE RESINEUX EXTRAIT A 170°C
- (2) RETENTAT SUR 500DA DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A $170^{\circ}C$

216

Il semble donc que l'assomption faite à priori soit vérifiée pour les hydrolysats résineux : fraction F1 contient des méthylglucuronoxylanes, de la des rhamnogalacturonanes ainsi que des galactanes et des mannanes liés à de la lignine soluble, autrement des oligomères chargés, des pectines et des complexes lignine hydrates de carbone. La fraction F2 quant à elle est bien constituée de galactoglucomannanes acétylés. En ce qui concerne les rétentats de feuillus, le Tableau 43 montre clairement la séparation entres xylanes neutres (acétylés) et xylanes chargés (acétylés et comportant des groupes 4-O-MeGlcA) pour tous les échantillons purifiés. Les pics présentés dans le Tableau 43, sont les pics principaux en intensité des Spectre 18 et Spectre 21 en Annexes.

Dans les fractions F2, les pics à 785, 917, 1050, 1182, 1314, 1356, 1446, 1488 m/z peuvent correspondre à plusieurs structures, et montrent des degrés d'acétylation assez faibles, respectivement 0,3, 0,29, 0,25, 0,22, 0,33, 0,2, 0,3 en comparaison à ce que l'on trouve dans la littérature et aux résultats obtenus précédemment (Chapitre 1). Ils peuvent correspondre à une série d'ions, autre que des simples xylanes faiblement acétylés, dont la structure est la suivante : H₃ P_x Ac_n, $1 \le x \le 7$ et $3 \le n \le 4$.

Dans les fractions F1, les séries d'ions suivantes sont trouvées, cf. Tableau 43 :

-	537, 669, 801, 933, 1065, 1197 ,1329	n=1, 1≤x≤7
-	711, 843, 975, 1107, 1239, 1371, 1503, 1635	n=2, 2≤x≤9
-	885, 1017, 1149, 1281, 1413, 1546, 1677	n=3, 3≤x≤9
-	1059, 1191, 1323, 1455, 1587, 1719	n=4, 4≤x≤9
-	1365, 1497, 1629, 1761	n=5,
	0.1 . 10	

6≤x≤9

Ils peuvent également correspondre à une structure de type Rha GalA P_x Ac_n, avec $1 \le x \le 19$ et $1 \le n \le 10$. De plus, les pics 975 et 933 correspondent aussi aux deux structures de rhamnogalacturonanes acétylés suivantes : GalA₄RhaAc₁ et GalA₄RhaAc₂.

CONCLUSION SUR LA PARTIE V.C. Colonnes Hi Load Superdex (GE Healthcare)

Concernant la purification des oligomères de petite taille, le système composé de trois colonnes SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 30 pg en eau est pertinent pour la séparation des monomères regroupés au sein d'un même pic avec les impuretés de faible masse molaire et les sels en fin d'élution, pour les hydrolysats bruts de résineux comme de feuillus extraits à 170°C. L'injection du perméat sous 1 kDa traité à 50g/l de charbon actif et de l'hydrolysat brut de résineux produit à haute température traité par hydrolyse enzymatique montre une séparation améliorée et une purification possible des DP 2 et 3. Pour les DP supérieurs en revanche ce système n'est pas adapté malgré l'association de trois colonnes semi-préparatives avec un domaine de fractionnement allant jusqu'à 10 kDa (grand nombre de plateaux théoriques).

Le système composé d'une colonne SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 200 pg placée en série avec deux colonnes SEC Hi Load Superdex® 75 pg permet la séparation nette (deux larges pics) entre oligosaccharides de plus haute masse molaire neutres et chargés contenus dans les rétentats sur 1 kDa et plus, de tous les types de liqueurs. Les complexes lignine hydrates de carbone sont logiquement contenus sous le pic correspondant aux oligomères chargés élué en premier.

TABLEAU 43 PICS PRINCIPAUX EN M/Z ET STRUCTURE CORRESPONDANTE OBTENU PAR MALDITOF MS EN MODE LINEAIRE POSITIF DES FRACTIONS F1 ET F2 OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR LE SYSTEME B DES RETENTATS SUR 1kDa (R1) ET 500DA (R500) DE L'HYDROLYSAT DE FEUILLUS EXTRAIT A 170°C BRUT ET TRAITE AU CHARBON ACTIF A 30G.L⁻¹

PICS CLASSES PAR ORDRE DECROISSANT D'INTENSITE					
	HW170 R1 F1	HW170 R1 F2			
1456 1630 1323 1281 1149 1762 1804 1498 1588 1936	$\begin{array}{l} P_8 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_4 \\ P_9 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_5 \\ P_7 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_4 \\ P_7 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_3 \\ P_6 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_3 \\ P_{10} \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_5 \\ P_{10} \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_6 \\ P_8 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_5 \\ P_9 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_5 \\ P_9 \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_4 \\ P_{11} \text{ 4-O-MeGlcA } OAc_6 \end{array}$	1746 1788 1704 1398 1223 1266 1662 1572 1530 1091	$\begin{array}{c} P_{11} \ OAC_6 \\ P_{11} \ OAC_7 \\ P_{11} \ OAC_5 \\ P_9 \ OAC_4 \\ P_8 \ OAC_3 \\ P_8 \ OAC_4 \\ P_{11} \ OAC_4 \\ P_{10} \ OAC_5 \\ P_{10} \ OAC_4 \\ P_7 \ OAC_3 \end{array}$		
Cł	HW170 R1 F1 harbon actif 30g.l ⁻¹	HW170 R1 F2 Charbon actif 30g.l ⁻¹			
1414 1282 1588 1720 1456 1546 1149 1108 1239 1678	$\begin{array}{l} P_8 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_7 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_9 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_4\\ P_{11} \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_8 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_4\\ P_9 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_6 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_6 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_2\\ P_7 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_2\\ P_{10} \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ \end{array}$	1488 1182 1356 1662 1314 1446 1224 1530 1620 1704	$\begin{array}{c} P_{10} \ OAc_3 \\ P_8 \ OAc_2 \\ P_9 \ OAc_3 \\ P_{11} \ OAc_4 \\ P_9 \ OAc_2 \\ P_{10} \ OAc_2 \\ P_{10} \ OAc_2 \\ P_8 \ OAc_3 \\ P_{10} \ OAc_4 \\ P_{11} \ OAc_3 \\ P_{11} \ OAc_5 \end{array}$		
HW170 R500 F1		HW170 R500 F2			
1150 1456 1282 1324 975 843 1017 1630 1588 1498 1414 1762 1108	$\begin{array}{l} P_6 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_8 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_4\\ P_7 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_7 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_2\\ P_5 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_2\\ P_4 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_2\\ P_5 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_3\\ P_9 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_5\\ P_9 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_5\\ P_8 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_5\\ P_8 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_5\\ P_8 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_5\\ P_8 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_5\\ P_6 \text{ 4-O-MeGICA OAc}_2\\ \end{array}$	917 1223 1092 959 785 1266 611 1176 1050 1398 1662 653 1746	$\begin{array}{c} {\sf P}_7 \; O{\sf Ac}_2 \\ {\sf P}_8 \; O{\sf Ac}_3 \\ {\sf P}_7 \; O{\sf Ac}_3 \\ {\sf P}_6 \; O{\sf Ac}_3 \\ {\sf P}_6 \; O{\sf Ac}_2 \\ {\sf P}_8 \; O{\sf Ac}_4 \\ {\sf P}_4 \; O{\sf Ac}_1 \\ {\sf P}_7 \; O{\sf Ac}_5 \\ {\sf P}_7 \; O{\sf Ac}_2 \\ {\sf P}_9 \; O{\sf Ac}_4 \\ {\sf P}_{11} \; O{\sf Ac}_4 \\ {\sf P}_5 \; O{\sf Ac}_2 \\ {\sf P}_{11} \; O{\sf Ac}_6 \end{array}$		

218



Spectre 18 Spectre de masses des fractions F1 et F2 du retentat sur 500Da de l'hydrolysat de feuillus extrait a 170°C, separe par chromatographie liquide d'exclusion sterique sur le systeme b

CONCLUSION CHAPITRE V

Les deux premières parties de ce chapitre traitent de la séparation et de la purification des oligosaccharides de petits DP contenus dans les perméats des hydrolysats de feuillus et de résineux extraits à haute température. Ces perméats ont été traités au charbon actif à 50 g.l-1 pour éliminer la majorité de la lignine et des produits de dégradation. Il a été montré que pour séparer les sels, les produits de dégradation résiduels et les monomères de mélange d'oligosaccharides contenus dans le perméat sous 1kDa, une injection en eau sur un système composé de deux colonnes SEC Bio-Gel en série (P4 et P2) à 50°C est une solution convenable bien que nécessitant un temps d'élution assez long. Dans ce cas de figure on obtient un mélange qui va du DP 2/3 jusqu'au DP 15 contenant des complexes lignine hydrates de carbone résiduels. Si l'on souhaite être complètement débarrassé des complexes, alors il faudra effectuer deux filtrations et récupérer la part de l'hydrolysat comprise entre une membrane de 1 et 3kDa (il est aussi possible de fractionner entre 500 Da et 1kDa dans cette optique) et l'injecter sur une colonne préparative SEC Bio-Gel P4 en eau à 50°C (L=1m, Ø=5cm), afin d'isoler un pic intense correspondant aux molécules chargées d'acides hexuroniques bien en amont du massif des oligosaccharides (commençant à un DP2 avec quelques monomères résiduels).

De manière générale l'utilisation de domaines de fractionnement plus hauts est nécessaire quant à l'utilisation des gels Bio-Gel et HW pour la séparation des perméats du fait de la présence de complexes et d'une grande polydispersité dans ces échantillons. De plus, la séparation des oligosaccharides contenus dans le perméat sous 1 kDa de l'hydrolysat de résineux extrait à 170°C et traité au charbon actif à 50 g.l⁻¹ est nettement meilleure avec une élution sur colonne SEC HW-40s préparative en comparaison à une colonne SEC Bio-Gel P4 préparative. Notamment si l'on souhaite purifier un DP en particulier (bonne résolution des pics). Si l'on compare les essences, la séparation sur colonne SEC HW-40s préparative en eau est bien moins bonne concernant le perméat sous 1kDa de l'hydrolysat de feuillus que de résineux. Il faudrait donc pour les feuillus monter un système avec trois colonnes Bio-Gel ou bien deux colonnes HW40. Une autre solution serait d'injecter le perméat sous 500 Da ou l'échantillon compris entre 500 et 1000 Da, toujours traité au charbon actif.

Concernant le diamètre de colonne, contrairement à la longueur, il n'est pas censé améliorer directement la résolution d'une séparation mais jouer sur la largeur des pics. En effet, un diamètre plus gros peut permettre de diminuer la largeur des pics du chromatogramme. Ce que l'on constate c'est l'augmentation du diamètre de colonne améliore nettement la séparation des perméats lorsqu'on utilise du gel HW-40s. Il faut noter que toutes les colonnes SEC Bio-Gel ou HW ont été préparées manuellement, à contrario des colonnes SEC Superdex préparées indsutriellement et achetées prêtes à l'emploi. Ce phénomène peut donc simplement être dû à l'augmentation de la surface d'échange du fait d'un plus gros diamètre. Dans la troisième partie de ce chapitre, il a été montré que l'augmentation du nombre de colonne (donc de la longueur et du nombre de plateaux théoriques) permet une grande amélioration de la séparation des hydrolysats de feuillus et de résineux ultrafiltrés sur 1kDa (rétentat) pour la séparation des molécules neutres et chargées.

Il doit être retenu qu'un éluant avec une force ionique suffisamment grande (1 mol/l) empêche la séparation entre oligosaccharides neutres et chargés (liés à des complexes lignine hydrates de carbone), quel que soit le gel et le domaine de fractionnement utilisés. A l'inverse, une injection en eau permet d'isoler un pic intense correspondant à ces complexes dans les faibles masses molaires, et dans les rétentats un large pic élué en premier. Il est pour l'instant difficile de comprendre ce phénomène étant donné que si l'éluant (carbonate d'ammonium 0,1M) écrante les charges des complexes lignine hydrates de carbone alors ces derniers prendraient un volume hydrodynamique plus gros et seraient alors au contraire bien séparés du reste de l'hydrolysat au volume mort sur le chromatogramme. Les observations vont dans le sens inverse, on peut donc penser que des charges résiduelles dans le gel engendrent des interactions électrostatiques ou de type échange d'ions inattendues et permettent de séparer les molécules chargées d'acides avec une élution en eau.

ANNEXES CHAPITRE V



CHROMATOGRAMME 44 SIGNAL REFRACTOMETRIQUE OBTENU APRES SEPARATION EN CARBONATE D'AMMONIUM 0,1 M D'OLIGOMERES D'HEMICELLULOSE, OBTENUS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE PAR 1,4-ENDO-XYLANASE DURANT 8 H, D'UNE PATE DE FEUILLUS KRAFT BLANCHIE (1) ET DE STANDARDS GLUCOSE, TREHALOSE ET MELITRIOSE (2) SUR UN SYSTEME COMPOSE DE TROIS COLONNES SEC HILOAD® 26/600 SUPERDEX® 30 PG EN SERIE



Temps de rétention (min)

Chromatogramme 43 Signal refractometrique obtenu apres Separation en eau sur le systeme compose de deux colonnes SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 75 pg du retentat sur 1kDa de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C



Spectre 19 Spectres de masse zoome entre m/z 1100 et 1500 obtenu par MALDI TOF MS en mode reflectron positif du P1-50 de l'hydrolysat de feuillus extrait a 170°C, et des fractions F1, F2, F3 et F4 de ce meme echantillon obtenues par chromatographie liquide sur une colonne SEC HW-40S (Ø=5cm) a 25°C et 2 ml.min⁻¹

22

こ





Temps de rétention (min)

Chromatogramme 46 Signal refractometrique obtenu apres Separation des retentats sur 1 et 3kDa de l'hydrolysat de feuillus extrait a $150^{\circ}C$ (HW150) sur le systeme b



Temps de rétention (min)

Chromatogramme 45 Signal refractometrique obtenu apres Separation du retentat sur 5kDa de l'hydrolysat de resineux extrait a 170°C (SW170) brut et traite a 50g.l⁻¹ de charbon actif sur le systeme b



 $Chromatogramme \ 48 \ Obtenu \ par \ chromatographie \ en \ phase \ gaze use \ avec \ detection \ par \ ionisation \ de \ flamme \ de \ lambda fraction \ SW170 \ R1 \ F2$



CHROMATOGRAMME 47 OBTENU PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE AVEC DETECTION PAR IONISATION DE FLAMME DE LA FRACTION SW170 R1 F1



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

a direction prise par ces travaux suit plusieurs trajectoires de séparation, purification et fractionnement des autohydrolysats de bois afin d'en isoler et caractériser les oligosaccharides d'intérêt (notamment valorisables comme prébiotiques). La compréhension globale des résultats apportés par cette étude mène à la conception de schémas de méthodes différenciés par l'essence de bois et la sévérité de l'hydrolyse sélectionnées.

Ultrafiltration membranaire

Une autohydrolyse effectuée à 170°C à un ratio liqueur sur bois de 4 permet de solubiliser en movenne 10% en masse sèche du bois soit environ 40% des hémicelluloses natives. Les liqueurs sont donc très concentrées en sucres mais aussi en contaminants : lignine et produits de dégradation représentent de 3 à 6 g/l dans l'hydrolysat brut de résineux et de feuillus respectivement. Les oligosaccharides, tout comme la lignine soluble éliminée à 90% sur une membrane de 1 kDa, sont majoritairement de petite taille. Une telle filtration engendre donc 55% de perte en oligosaccharides dans le rétentat de résineux et 69% dans celui des feuillus par rapport à l'hydrolysat brut. En effet les chaines sont assez courtes avec une masse molaire moyenne en poids (Mw) de 1,3 et 1,5 kDa (liqueur brut de feuillus et résineux). De plus, 90% en masse des oligomères extraits, toutes essences confondues, passent à travers une membrane de 5 kDa. Les hémicelluloses restantes alors dans ce type de rétentat ont une Mw de 4,2 et 4,7 kDa respectivement. En comparaison, seuls 2% (feuillus) et 3,4% (résineux) en masse sèche du bois sont solubilisés sous forme d'hémicellulose dans des conditions d'hydrolyse douce (150°C), ceci se traduit par des ratios lignine/oligosaccharides plus élevés, jusqu'à 70% dans l'hydrolysat de feuillus. La lignine extraite a une répartition de masse molaire très large, pour en éliminer 90% il faut ultrafiltrer sur une membrane de 3 kDa pour les feuillus et 5 kDa pour les résineux. Quelle que soit l'essence de bois, les oligosaccharides solubilisés ont une masse molaire movenne plus élevée qu'à haute température. Dans l'hydrolysat de feuillus brut et ultrafiltré sur 5 kDa cette dernière vaut 2,6 et 5,4 kDa, contre respectivement 4,1 et 5,7 kDa pour les résineux. Les distributions de masses molaires s'étendent jusqu'à 10⁵ Da.

Le mélange initial en oligosaccharides dans les hydrolysats bruts (170°C) est logiquement majoritairement composés de galactoglucomannanes acétylés (72% des résineux) et de méthylglucuronoxylanes acétylés (78% des feuillus). Grâce à la prédominance et à la taille des chaînes de galactoglucomannanes, leur séparation est rendue possible avec une simple filtration sur une membrane de 1 kDa (1% de xylanes restants dans le rétentat) de la liqueur de résineux. Pour isoler les xylanes, qui ont une masse molaire plus élevée dans les liqueurs de feuillus que de résineux, il faut filtrer sur une membrane possédant un seuil de coupure plus élevé à 5 kDa mais au dépend de la perte de la quasi-totalité de la quantité extraite au départ. Les hémicelluloses extraites à 150°C présentent de hauts degrés d'acétylation : 0,75 pour les xylanes de feuillus (contre 0,6 à haute température) et 0,3 pour les galactoglucomannanes de résineux. De plus, les oligosaccharides pectiques de type rhamnogalacturonanes représentent galactanes, arabinanes, 30% des oligosaccharides extraits dans l'hydrolysat brut de résineux alors qu'ils sont dégradés à plus haute température. Dans les hydrolysats de feuillus, il faut noter la présence de glucanes potentiellement acétylés qui ajoutés aux pectines solubilisées représentent 43% des oligosaccharides de l'hydrolysat brut. Ces hydrates de carbone sont préférentiellement liés à la lignine et aussi liés entre eux de manière covalente. Ainsi, ils forment un enchevêtrement de molécules qui restent sur les membranes. De manière générale les pertes engendrées par la filtration membranaire sont beaucoup plus faibles dans ce type d'hydrolysat : 4% pour les résineux et 26% pour les feuillus sur une membrane de 1 kDa.

Adsorption au charbon actif

Le charbon actif granulaire utilisé sous agitation permet de retirer sélectivement la lignine soluble à hauteur de 95, 87, 93 et 98% (résineux et feuillus respectivement à 150 et 170°C) à partir de 30 g par litre d'hydrolysat brut. Les pertes en oligomères dues à leur adsorption sur les grains de charbon actif (majoritairement les xylanes chargés et les pectines) sont plus que doublées entre les liqueurs de feuillus extraites à haute température et à basse température (30% contre 67%). La sélectivité du charbon actif est meilleure dans les liqueurs de résineux et donne donc accès à de plus hautes puretés et des pertes beaucoup plus faibles en oligomères, de l'ordre de 15%. Les composés furaniques sont éliminés en totalité dans toutes les liqueurs à 50 g/l de charbon actif (sauf dans l'hydrolysat de feuillus produit à 170°C où 98% du furfural est adsorbé). Dans les hydrolysats bruts produits à 170°C l'ajout de charbon actif fait diminuer la masse molaire moyenne des oligomères, tandis qu'à basse température cette dernière augmente. Il semble que les plus gros oligomères ainsi que les complexes lignine hydrates de carbone ne soient pas adsorbés par les grains de charbon actif du fait de leur volume hydrodynamique trop important.

Le principal avantage de l'ultrafiltration est d'éliminer la totalité des produits de dégradation et des monomères tandis que le charbon actif adsorbe la lignine de manière sélective. L'association des deux techniques est nécessaire pour atteindre une pureté en oligomères de 99% dans tous les échantillons étudiés contre 65% en movenne avec le charbon actif seul. Si on souhaite conserver un maximum d'oligosaccharides (pureté de 97%) alors une simple filtration sur 1kDa suffit pour les liqueurs de résineux produites à la fois dans des conditions d'hydrolyse douces et sévères. En réalité, l'ajout de charbon actif à 30 g/l dans ces rétentats permet de gagner 1 à 2 points de pureté au dépend de 13 et 28% de pertes supplémentaires en oligomères adsorbés. En revanche, les rétentats homologues de feuillus passent de 94% (170°C) et 88% (150°C) de pureté à 99% avec l'ajout de charbon actif à charge identique. Les pertes supplémentaires en oligosaccharides sont alors de 9 et 44% respectivement. Il est à noter qu'à contrario des échantillons de résineux, les rétentats sur 1 kDa des hydrolysats de feuillus traités au charbon actif à 50 g/l en comparaison aux rétentats non traités, voient leur masse molaire moyenne augmenter de 2,1 à 2,3 kDa (170°C) et de 4,7 à 5,8 kDa (150°C).

Fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique

L'isolation d'oligosaccharides d'intérêt grâce à leur séparation par chromatographie d'exclusion stérique constitue la dernière étape de ce projet pour la caractérisation des hydrolysats purifiés. L'élution d'un pic bien défini réunissant les monomères et les impuretés de faible masse molaire plus les sels est rendue possible pour les hydrolysats bruts de feuillus et de résineux (170°C uniquement) sur un système semi-préparatif composé de trois colonnes SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 30 pg. D'autre part, les colonnes préparatives étudiées en Bio-Gel P-4 et HW-40s, (L=1m, Ø=5cm) montrent le principal avantage, en comparaison au système semi-préparatif composé de trois colonnes SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 30 pg, de permettre l'isolation au volume mort (élué en premier) d'un pic regroupant les oligosaccharides chargés et la lignine résiduelle non adsorbée correspondant potentiellement à des complexes lignine hydrates de carbone dans les perméats sous 1 kDa des hydrolysats produits en conditions douces et traités à 50 g/l de charbon actif. L'influence d'un diamètre plus large, au dépend pourtant d'un plus petit nombre de plateaux théoriques, donne accès à une plus grande surface d'échange entre l'analyte et le gel. Ainsi, le fractionnement d'oligosaccharides neutres contenus dans le perméat de résineux compris entre DP 2 et 7 (voire plus) est réalisable.

Enfin, l'injection des rétentats (à partir de 500 Da) sur un système composé d'une colonne SEC HiLoad® 26/600 Superdex® 200 pg placée en série avec deux colonnes SEC Hi Load Superdex® 75 pg montre une séparation entre oligomères chargés (cette première fraction concentre la lignine) et neutres élués en dernier car avec un plus petit volume hydrodynamique. Dans l'optique d'une application nutraceutique, les liqueurs de résineux sont plus faciles à valoriser car la fraction neutre représente 90% du rétentat et correspond à des galactoglucomannanes acétylés. Que ce soit dans les perméats ou les rétentats des hydrolysats de feuillus, il est plus difficile d'isoler des fractions contenants uniquement des xylanes acétylés.

Perspectives

Concernant la méthode pour le calcul des masses molaires en GPC MALS, les différentes méthodes utilisées pour pallier aux problèmes d'agrégats ont chacune des inconvénients. Une filtration plus longue dénature l'échantillon et engendre des pertes en oligomères même si elle améliore la séparation. Il s'agit d'un exemple typique montrant la limitation de l'analyse des sucres à cause de la présence de lignine. Ce phénomène est aussi probablement dû au fait qu'une part des oligomères extraits est insoluble. Dans ce cas, le « FFF » dit Fiel Flow Fractionation ou Fractionnement par couplage Flux-Force est un outil à envisager tant pour sa qualité d'analyse adaptable au type de macromolécules que l'on souhaite caractériser, que pour sa capacité à les séparer à la manière d'une filtration tangentielle. On peut donc penser à remplacer la colonne par un système d'élution sans phase stationnaire étant donné que la nature de l'échantillon ne convient pas à l'analyse.

Les efforts doivent être portés sur la purification et le fractionnement des hydrolysats de feuillus. Les xylo-oligosaccharides étant reconnus comme potentiels prébiotiques, au vu de la proportion des xylanes neutres et chargés, il serait intéressant de trouver un moyen de casser les complexes lignine hydrates de carbone et de tester biologiquement le potentiel des méthylglucuronoxylanes acétylés dépourvus de lignine. Au même titre que les oligosaccharides pectiques de type rhamnogalacturonanes. Dans cette optique il est nécessaire de pouvoir mieux isoler et quantifier ces complexes. En effet, au vu des signaux UV et RI obtenus par chromatographie d'exclusion stérique des rétentats sur 1 kDa et traités au charbon actif, il est clair que ces complexes semblent avoir un large spectre de masses

molaires et quasi identique à celui des sucres. L'optimisation de l'utilisation d'une colonne de charbon actif alliée à la filtration membranaire peut-être utile. On peut aussi effectuer des adsorptions après ultrafiltration et non avant, en utilisant un charbon actif avec des pores plus gros. Enfin, l'utilisation de résines amberlite de type XAD doit être envisagée pour l'élimination de la lignine récalcitrante.

Le plus important si l'on souhaite valoriser les hydrolysats de bois dans le domaine de la santé humaine est de pouvoir fractionner certains DP notamment entre 2 et 10. Un aspect essentiel à poursuivre consiste en l'hydrolyse enzymatique des pâtes de bois et des hydrolysats, afin de mieux isoler et caractériser les oligosaccharides solubles. Ce type d'échantillons montre une aptitude beaucoup plus grande à être fractionné par chromatographie d'exclusion stérique que les hydrolysats non traités à l'aide d'une ou plusieurs enzymes. Les plus hautes masses molaires étant globalement plus difficiles à séparer que les petites, cette biotechnologie doit être utilisée en synergie avec l'adsorption au charbon actif et l'ultrafiltration pour être optimisée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelaziz, Omar Y., Daniel P. Brink, Jens Prothmann, Krithika Ravi, Mingzhe Sun, Javier García-Hidalgo, Margareta Sandahl, et al. 2016. « Biological Valorization of Low Molecular Weight Lignin ». *Biotechnology Advances* 34 (8): 1318-46. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.001.
- Abdel-Rahman, Mohamed Ali, Yukihiro Tashiro, et Kenji Sonomoto. 2013. « Recent Advances in Lactic Acid Production by Microbial Fermentation Processes ». *Biotechnology Advances*, « Bioenergy and Biorefinery from Biomass » through innovative technology development, 31 (6): 877-902. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.
- Agrawal, Pawan K. 1992. « NMR Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides ». *Phytochemistry*, The International Journal of Plant Biochemistry, 31 (10): 3307-30. https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83678-R.
- Ahlroth, M., et G. Svedberg. 1998. « Case Study on Simultaneous Gasification of Black Liquor and Biomass in a Pulp Mill ». In . https://doi.org/10.1115/98-GT-350.
- Al Manasrah, M., M. Kallioinen, H. Ilvesniemi, et M. Mänttäri. 2012. « Recovery of Galactoglucomannan from Wood Hydrolysate Using Regenerated Cellulose Ultrafiltration Membranes ». *Bioresource Technology* 114 (juin): 375-81. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.014.
- Al-Dajani, Waleed Wafa, et Ulrike W. Tschirner. 2008. « Pre-Extraction of Hemicelluloses and Subsequent Kraft Pulping Part I: Alkaline Extraction », août. https://experts.umn.edu/en/publications/pre-extraction-of-hemicellulosesand-subsequent-kraft-pulping-par-2.
- Almeida, João R. M., Magnus Bertilsson, Marie F. Gorwa-Grauslund, Steven Gorsich, et Gunnar Lidén. 2009. « Metabolic Effects of Furaldehydes and Impacts on Biotechnological Processes ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 82 (4): 625-38. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1875-1.
- Andersson, Sven-Ingvar, Olof Samuelson, Mitsuro Ishihara, et Kazumasa Shimizu. 1983. « Structure of the Reducing End-Groups in Spruce Xylan ». *Carbohydrate Research* 111 (2): 283-88. https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88312-8.
- Arora, Anju, Elizabeth M. Martin, Matthew H. Pelkki, et Danielle Julie Carrier. 2013.
 « Effect of Formic Acid and Furfural on the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Powder and Dilute Acid-Pretreated Poplar Hydrolysates ». ACS Sustainable Chemistry & Engineering 1 (1): 23-28. https://doi.org/10.1021/sc3000702.
- Artuğ, Gamze, Indriana Roosmasari, Klaus Richau, et Jobst Hapke. 2007. « A Comprehensive Characterization of Commercial Nanofiltration Membranes ». Separation Science and Technology 42 (13): 2947-86. https://doi.org/10.1080/01496390701560082.
- Asada, Chikako, Chizuru Sasaki, Takeshi Hirano, et Yoshitoshi Nakamura. 2015. « Chemical Characteristics and Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Treated Using High-Temperature Saturated Steam: Comparison of Softwood and Hardwood ». *Bioresource Technology* 182 (avril): 245-50. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.005.

- Babbar, Neha, Winnie Dejonghe, Monica Gatti, Stefano Sforza, et Kathy Elst. 2016.
 « Pectic Oligosaccharides from Agricultural By-Products: Production, Characterization and Health Benefits ». *Critical Reviews in Biotechnology* 36 (4): 594-606. https://doi.org/10.3109/07388551.2014.996732.
- Bajpai, Pratima. 2018. « Chapter 12 Pulping Fundamentals ». In *Biermann's Handbook of Pulp and Paper (Third Edition)*, édité par Pratima Bajpai, 295-351. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814240-0.00012-4.
- Baktash, Mir Mojtaba, Laboni Ahsan, et Yonghao Ni. 2015. « Production of Furfural from an Industrial Pre-Hydrolysis Liquor ». *Separation and Purification Technology* 149 (juillet): 407-12. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.06.003.
- Baldwin, Robert M. 2019. « Upgrading Bio-Oil: Catalysis and Refinery ». In Biorefinery: Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers, édité par Juan-Rodrigo Bastidas-Oyanedel et Jens Ejbye Schmidt, 111-51. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_5.
- Baquero, Oscar Flores. 2007. « Design of an activated carbon columns plant for studying micro-pollutants removal ». Etude. KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN. APPLIED PHYSICAL CHEMISTRY AND ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY SECTION.
- Bastidas-Oyanedel, Juan-Rodrigo, et Jens Ejbye Schmidt. 2019. *Biorefinery: Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5.
- Bauer, Wolfgang D., Kenneth W. Talmadge, Kenneth Keegstra, et Peter Albersheim. 1973. « The Structure of Plant Cell Walls: II. The Hemicellulose of the Walls of Suspension-cultured Sycamore Cells 1 ». *Plant Physiology* 51 (1): 174-87. https://doi.org/10.1104/pp.51.1.174.
- Beaufils, Nicolas. 2019. « Etude du bioraffinage de bois de feuillus en amont du procédé papetier kraft: influence des conditions d'extraction et de purification sur la production de molécules cibles ». Université de Toulouse.
- Belgacem, Mohamed Naceur, et Alessandro Gandini. 2011. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier.
- Bellasio, Chandra, Alessio Fini, et Francesco Ferrini. 2014. « Evaluation of a High Throughput Starch Analysis Optimised for Wood ». *PLOS ONE* 9 (2): e86645. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086645.
- Berlin, Alex, Mikhail Balakshin, Neil Gilkes, John Kadla, Vera Maximenko, Satoshi Kubo, et Jack Saddler. 2006. « Inhibition of Cellulase, Xylanase and β-Glucosidase Activities by Softwood Lignin Preparations ». *Journal of Biotechnology* 125 (2): 198-209. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.021.
- Bezergianni, Stella, Athanassios Dimitriadis, Oleg Kikhtyanin, et David Kubička. 2018. « Refinery Co-Processing of Renewable Feeds ». *Progress in Energy and Combustion Science* 68 (septembre): 29-64. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2018.04.002.
- Blumenkrantz, Nelly, et Gustav Asboe-Hansen. 1973. « New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids ». *Analytical Biochemistry* 54 (2): 484-89. https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1.
- Boiron, Lucie. 2012. « Etude de l'impact de l'extraction des hémicelluloses du bois sur les procédés d'obtention de cellulose et d'éthanol dans le cadre d'une bioraffinerie lignocellulosique ». These de doctorat, Grenoble. http://www.theses.fr/2012GRENI107.

- Boucher, Jérémy, Christine Chirat, et Dominique Lachenal. 2014. « Extraction of Hemicelluloses from Wood in a Pulp Biorefinery, and Subsequent Fermentation into Ethanol ». *Energy Conversion and Management* 88 (décembre): 1120-26. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.05.104.
- Boukari, Imen, Michael O'Donohue, Caroline Rémond, et Brigitte Chabbert. 2011.
 « Probing a Family GH11 Endo-β-1,4-Xylanase Inhibition Mechanism by Phenolic Compounds: Role of Functional Phenolic Groups ». *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72 (3): 130-38. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.010.
- Bouveng, H.O., et Hans Meier. 1959 13: 1884.
- Brink, D.L., et A.A. Pohlmann. 1972. « Wood and pulp analysis by fractionation into component polysaccharides ». *Tappi* 55: 380-88.
- Browning, B. L. 1967. *Methods of Wood Chemistry*. Vol. 2. New York: John Wiley & Sons. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pol.1968.160061112.
- Bruins, Paul. 1930. « The application of furfural and its derivatives to the manufacture of plastics ». *Retrospective Theses and Dissertations*, janvier. https://doi.org/10.31274/rtd-180813-15660.
- Bubb, William A. 2003. « NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity ». *Concepts in Magnetic Resonance Part A* 19A (1): 1-19. https://doi.org/10.1002/cmr.a.10080.
- Buffetto, Fanny, Valérie Cornuault, Maja Gro Rydahl, David Ropartz, Camille Alvarado, Valérie Echasserieau, Sophie Le Gall, et al. 2015. « The Deconstruction of Pectic Rhamnogalacturonan I Unmasks the Occurrence of a Novel Arabinogalactan Oligosaccharide Epitope ». *Plant and Cell Physiology* 56 (11): 2181-96. https://doi.org/10.1093/pcp/pcv128.
- Capek, Peter, Marta Kubačková, Juraj Alföldi, Ladislav Bilisics, Desana Lišková, et Daniela Kákoniová. 2000. « Galactoglucomannan from the Secondary Cell Wall of Picea Abies L. Karst ». *Carbohydrate Research* 329 (3): 635-45. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00210-X.
- Carter, P. 2017. « Anabolic and Catabolic Reactions ». *Biology* (blog). 22 novembre 2017. https://biologyroena.wordpress.com/anabolic-and-catabolic-reactions/.
- Carvalheiro, Florbela, Talita Silva Fernandes, Luís C. Duarte, Sónia Lopes, Patrícia Moura, Helena Pereira, et Francisco M. Gírio. 2009. «Hydrothermal processing of hardwoods and agro-industrial residues: evaluation of xylooligosaccharides production ». In *2nd Wood Nordic Biorefinery Conference*.
- Cavaglieri, Claudia R, Anita Nishiyama, Luis Claudio Fernandes, Rui Curi, Elizabeth A Miles, et Philip C Calder. 2003. « Differential Effects of Short-Chain Fatty Acids on Proliferation and Production of pro- and Anti-Inflammatory Cytokines by Cultured Lymphocytes ». *Life Sciences* 73 (13): 1683-90. https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00490-9.
- Chatterjee, Sabornie, et Tomonori Saito. 2015. « Lignin-Derived Advanced Carbon Materials ». ChemSusChem 8 (23): 3941-58. https://doi.org/10.1002/cssc.201500692.
- Clément, Pascal, Jean-Jacques Bordes, et Dominique Lachenal. 2010. « Les possibilités de diversification : le cas d'un site papetier français ». *Annales des Mines Realites industrielles* Août 2010 (3): 49-58.
- Cooney, David O., Andrew Nagerl, et Anthony L. Hines. 1983. « Solvent Regeneration of Activated Carbon ». *Water Research* 17 (4): 403-10. https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90136-7.

- Costa Lopes, Andre M. da, Ana Rita C. Morais, et Rafał M. Łukasik. 2017. « Sustainable Catalytic Strategies for C5-Sugars and Biomass Hemicellulose Conversion Towards Furfural Production ». In *Production of Platform Chemicals from Sustainable Resources*, édité par Zhen Fang, Jr. Smith Richard L., et Xinhua Qi, 45-80. Biofuels and Biorefineries. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4172-3_2.
- Curmi, Hélène. 2018. « Etude de l'impact de l'autohydrolyse sur les constituants du bois et sur le déroulement du procédé de production de cellulose pure ». These de doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE). http://theses.fr/2018GREAI089.
- De Ruiter, G. A., H. A. Schols, A. G. Voragen, et F. M. Rombouts. 1992. « Carbohydrate Analysis of Water-Soluble Uronic Acid-Containing Polysaccharides with High-Performance Anion-Exchange Chromatography Using Methanolysis Combined with TFA Hydrolysis Is Superior to Four Other Methods ». Analytical Biochemistry 207 (1): 176-85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90520-h.
- Dechoux, T. 2014. « Valorisation pharmaceutique ou nutraceutique des hémicelluloses de la biomasse végétale ». France: Université Grenoble Alpes (ComUE).
- Deery, M. J., E. Stimson, et C. G. Chappell. 2001. « Size Exclusion Chromatography/Mass Spectrometry Applied to the Analysis of Polysaccharides ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 15 (23): 2273-83. https://doi.org/10.1002/rcm.458.
- Déglise, Xavier. 1982. « Thermochemical conversion of wood ». 1982. https://doi.org/10.4267/2042/21577.
- Deloule, Vivien. 2017. « Study on extraction and characterization of softwoods hemicelluloses oligomers and their influence on gut microbiota ». These de doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE). http://www.theses.fr/2017GREAI107.
- Deloule, Vivien, Christine Chirat, Claire Boisset, Bertrand Toussaint, et Jadwiga Chroboczek. 2017. « Production of hemicellulose oligomers from softwood chips using autohydrolysis followed by an enzymatic post-hydrolysis ». *Holzforschung* 71 (7-8): 575-81. https://doi.org/10.1515/hf-2016-0181.
- Desharnais, Lyne, Fang Du, et Nicolas Brosse. 2011. « Optimization of Galactoglucomannans and Acidic Arabinans Recovery in Softwood ». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 50 (24): 14217-20. https://doi.org/10.1021/ie202273d.
- Djordjevic, S. P., M. Batley, et J. W. Redmond. 1986. « Preparative Gel Chromatography of Acidic Oligosaccharides Using a Volatile Buffer ». *Journal of Chromatography A* 354 (janvier): 507-10. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)87060-6.
- Dornath, Paul, et Wei Fan. 2014. « Dehydration of Fructose into Furans over Zeolite Catalyst Using Carbon Black as Adsorbent ». *Microporous and Mesoporous Materials* 191 (juin): 10-17. https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2014.02.031.
- Duarte, Gilvan C., Leonora Rios S. Moreira, Paula Marcela D. Jaramillo, et Edivaldo Ximenes F. Filho. 2012. « Biomass-Derived Inhibitors of Holocellulases ». *BioEnergy Research* 5 (3): 768-77. https://doi.org/10.1007/s12155-012-9182-6.
- Dupont, Anne-Laurence, Denis Réau, Paul Bégin, Sabrina Paris-Lacombe, Jean Tétreault, et Gérard Mortha. 2018. « Accurate Molar Masses of Cellulose for the Determination of Degradation Rates in Complex Paper Samples ».

Carbohydrate Polymers 202 (décembre): 172-85. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.134.

- Dupont, M.Susan, et Robert R. Selvendran. 1987. « Hemicellulosic Polymers from the Cell Walls of Beeswing Wheat Bran: Part I, Polymers Solubilised by Alkali at 2°C ». Carbohydrate Research 163 (1): 99-113. https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80169-6.
- Dutta, Tanushree, Taejin Kim, Kowsalya Vellingiri, Daniel C. W. Tsang, J. R. Shon, Ki-Hyun Kim, et Sandeep Kumar. 2019. «Recycling and Regeneration of Carbonaceous and Porous Materials through Thermal or Solvent Treatment ». *Chemical Engineering Journal* 364 (mai): 514-29. https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.049.
- Eraghi Kazzaz, Armin, et Pedram Fatehi. 2020. « Technical Lignin and Its Potential Modification Routes: A Mini-Review ». *Industrial Crops and Products* 154 (octobre): 112732. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112732.
- Eseyin, Anthonia, E., et Philip Steele H. 2015. « An overview of the applications of furfural and its derivatives ». *International Journal of Advanced Chemistry* 3 (2): 42. https://doi.org/10.14419/ijac.v3i2.5048.
- Evtuguin, DmitryV., JorgeL. Tomás, ArturM. S. Silva, et CarlosPascoal Neto. 2003. « Characterization of an Acetylated Heteroxylan from Eucalyptus Globulus Labill ». *Carbohydrate Research* 338 (7): 597-604. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00529-3.
- Fakhrai, Reza. 2002. « Black Liquor Combustion in Kraft Recovery Boilers Numerical Modelling ». Stockholm, Sweden,: KTH.
- Feng, Y. M., X. L. Chang, W. H. Wang, et R. Y. Ma. 2009. « Separation of Galacto-Oligosaccharides Mixture by Nanofiltration ». *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, Festschrift Issue In honor of Professor Yi Hua Ma, 40 (3): 326-32. https://doi.org/10.1016/j.jtice.2008.12.003.
- Fengel, Dietrich, et Gerd Wegener. 1984. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin; New York: W. de Gruyter.
- Finke, Berndt, Bernd Stahl, Markus Pritschet, Dirk Facius, Jürgen Wolfgang, et Guenther Boehm. 2002. « Preparative Continuous Annular Chromatography (P-CAC) Enables the Large-Scale Fractionation of Fructans ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (17): 4743-48. https://doi.org/10.1021/jf011576q.
- FRY, STEPHEN C. 1989. « The Structure and Functions of Xyloglucan ». *Journal of Experimental Botany* 40 (1): 1-11. https://doi.org/10.1093/jxb/40.1.1.
- Galletti, GC. 1991. Production and Utilization of Lignocellulosics: Plant Refinery and Breeding, Analysis, Feeding to Herbivores, and Economic Aspects. London, New York, New York, NY, USA: Elsevier Applied Science.
- Garrote, G., H. Domínguez, et J. C. Parajó. 2001. « Generation of Xylose Solutions from Eucalyptus Globulus Wood by Autohydrolysis-Posthydrolysis Processes: Posthydrolysis Kinetics ». *Bioresource Technology* 79 (2): 155-64. https://doi.org/10.1016/s0960-8524(01)00044-x.
- Gil, Herminia Domínguez, et Juan Carlos Parajó. Garrote, 1999. « Mild Autohydrolysis: Environmentally Friendly Technology An for Xylooligosaccharide Production from Wood ». Journal of Chemical Technology (11): 1101-9. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-& Biotechnology 74 4660(199911)74:11<1101::AID-JCTB146>3.0.CO;2-M.

- Gibson, Glenn R., et Marcel B. Roberfroid. 1995. « Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics ». *The Journal of Nutrition* 125 (6): 1401-12. https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401.
- Gierer, Josef. 1970. « The reactions of lignin during pulping. A description and comparison of conventional pulping processes ». SVENSKA TRAFORSKNINGSINSTITUTET STOCKHOLM.
- Gírio, F. M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, et R. Bogel-Łukasik. 2010. « Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review ». *Bioresource Technology* 101 (13): 4775-4800. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088.
- Giummarella, Nicola, et Martin Lawoko. 2017. « Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood ». *ACS Sustainable Chemistry* & *Engineering* 5 (6): 5156-65. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00511.
- Giummarella, Nicola, Liming Zhang, Gunnar Henriksson, et Martin Lawoko. 2016. « Structural Features of Mildly Fractionated Lignin Carbohydrate Complexes (LCC) from Spruce ». *RSC Advances* 6 (48): 42120-31. https://doi.org/10.1039/C6RA02399A.
- Golestani, Jahan. 2020. « Extraction d'hémicelluloses de fibres cellulosiques de résineux et de feuillus par traitements enzymatiques ». These de doctorat, Université Grenoble Alpes. http://theses.fr/2020GRALI030.
- González-Muñoz, María Jesús, Sandra Rivas, Valentín Santos, et Juan Carlos Parajó.
 2013. « Fractionation of Extracted Hemicellulosic Saccharides from Pinus Pinaster Wood by Multistep Membrane Processing ». *Journal of Membrane Science* 428 (février): 281-89. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.10.021.
- Goulas, Athanasios K, Petros G Kapasakalidis, Haydn R Sinclair, Robert A Rastall, et Alistair S Grandison. 2002. « Purification of Oligosaccharides bv Nanofiltration ». of Science Journal Membrane 209 (1): 321-35. https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00362-9.
- G.S. Chua, Miranda, et Morris Wayman. 1979. « Characterization of autohydrolysis aspen (P. tremuloides) lignins. Part 1. Composition and molecular weight distribution of extracted autohydrolysis lignin ». *Can. J. Chem* 57: 1141-49.
- Guigon, Valentin. 2019. « Etude de procédés de dépolymérisation d'oligosaccharides d'hémicelluloses dans le cadre d'une bioraffinerie papetière ». Université Grenoble Alpes.
- Gullichsen, J, H Paulapuro, et P Stenius. 2000. *Forest Products Chemistry*. Vol. 3. Helsinki University of Technology,. https://imisrise.tappi.org/TAPPI/Products/02/FIN/0202FIN03.aspx.
- Gullón, Patricia, Beatriz Gullón, Alejandra Cardelle-Cobas, José Luis Alonso, Manuela Pintado, et Ana Maria Gomes. 2014. «Effects of Hemicellulose-Derived Saccharides on Behavior of Lactobacilli under Simulated Gastrointestinal Conditions ». Food Research International 64 (octobre): 880-88. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.043.
- Guo, Fenfen, Wenjing Shi, Wan Sun, Xuezhi Li, Feifei Wang, Jian Zhao, et Yinbo Qu.
 2014. « Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism ».
 Biotechnology for Biofuels 7 (1): 38. https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-38.
- Guo, Qingbin, Lianzhong Ai, et Steve Cui. 2018. *Methodology for Structural Analysis of Polysaccharides*. Biobased Polymers. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96370-9.

- Guo, Qingbin, Steve W. Cui, Ji Kang, Huihuang Ding, Qi Wang, et Cathy Wang. 2015.
 « Non-Starch Polysaccharides from American Ginseng: Physicochemical Investigation and Structural Characterization ». *Food Hydrocolloids* 44 (février): 320-27. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.031.
- Guo, Qingbin, Steve W. Cui, Qi Wang, Xinzhong Hu, Qian Guo, Ji Kang, et Rickey Yada. 2011. « Extraction, Fractionation and Physicochemical Characterization of Water-Soluble Polysaccharides from Artemisia Sphaerocephala Krasch Seed ». *Carbohydrate Polymers* 86 (2): 831-36. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.034.
- Gütsch, Jenny Sabrina, et Herbert Sixta. 2011a. « The HITAC-process (high temperature adsorption on activated charcoal) new possibilities in autohydrolysate treatment ». *Lenzinger Ber.* 89 (janvier): 142-51.
- ———. 2011b. « Purification of Eucalyptus globulus water prehydrolyzates using the HiTAC process (high-temperature adsorption on activated charcoal) ». *Holzforschung* 65 (4). https://doi.org/10.1515/hf.2011.065.
- ———. 2012. « Regeneration of Spent Activated Charcoals Used for Lignin Removal from Prehydrolysis-Kraft Prehydrolyzates ». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51 (juin): 8624-30. https://doi.org/10.1021/ie3006116.
- Guttman, András. 1997. « Analysis of Monosaccharide Composition by Capillary Electrophoresis ». *Journal of Chromatography A* 763 (1): 271-77. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00750-9.
- Han, Wenjia, Chuanshan Zhao, Thomas Elder, Kefu Chen, Rendang Yang, Dongho Kim, Yunqiao Pu, Jeffery Hsieh, et Arthur J. Ragauskas. 2012. « Study on the Modification of Bleached Eucalyptus Kraft Pulp Using Birch Xylan ». *Carbohydrate Polymers* 88 (2): 719-25. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.025.
- Handberg, Eric, Konstantin Chingin, Nannan Wang, Ximo Dai, et Huanwen Chen.
 2015. « Mass Spectrometry Imaging for Visualizing Organic Analytes in Food: MS IMAGING OF FOOD ». *Mass Spectrometry Reviews* 34 (6): 641-58. https://doi.org/10.1002/mas.21424.
- Harazono, Akira, Tetsu Kobayashi, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Minoru Tada, Noritaka Hashii, Akiko Ishii, et al. 2011. « A Comparative Study of Monosaccharide Composition Analysis as a Carbohydrate Test for Biopharmaceuticals ». *Biologicals* 39 (3): 171-80. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.04.002.
- Harvey, David J. 1996. « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry of Oligosaccharides and Glycoconjugates ». *Journal of Chromatography A* 720 (1): 429-46. https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00307-X.

Hassler, John W. 1951. Active Carbon. Brooklyn: Chemical Pub. Co.

- Hayashi, Jun'ichi, Atsuo Kazehaya, Katsuhiko Muroyama, et A. Paul Watkinson. 2000. « Preparation of Activated Carbon from Lignin by Chemical Activation ». *Carbon* 38 (13): 1873-78. https://doi.org/10.1016/S0008-6223(00)00027-0.
- Heidarinejad, Zoha, Mohammad Hadi Dehghani, Mohsen Heidari, Gholamali Javedan, Imran Ali, et Mika Sillanpää. 2020. « Methods for Preparation and Activation of Activated Carbon: A Review ». *Environmental Chemistry Letters* 18 (2): 393-415. https://doi.org/10.1007/s10311-019-00955-0.
- Heinonen, Jari, Quentin Sanlaville, Henna Niskakoski, Juha Tamper, et Tuomo Sainio.
 2017. « Separation and Recovery of Lignin from Hydrolysates of Lignocellulose with a Polymeric Adsorbent ». Separation and Purification

- Hicks, Kevin B., et Scott M. Sondey. 1987. « Preparative High-Performance Liquid Chromatography of Malto-Oligosaccharides ». *Journal of Chromatography A* 389 (janvier): 189-94. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)94422-X.
- Hoffmann, G.C., et T. E. Timell. 1972a. « Polysaccharides in ray cells of compression wood of red pine (Pinus resinosa) » 6 (55): 871-73.

———. 1972b. « Polysaccharides in ray cells of normal wood of red pine (Pinus resinosa) » 5 (55): 733-36.

- Hong, Changyoung, Derek Corbett, Richard Venditti, Hasan Jameel, et Sunkyu Park. 2019. « Xylooligosaccharides as Prebiotics from Biomass Autohydrolyzate ». *LWT* 111 (août): 703-10. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.098.
- Hopkins, Cummings, et Macfarlane. 1998. « Inter-Species Differences in Maximum Specific Growth Rates and Cell Yields of Bifidobacteria Cultured on Oligosaccharides and Other Simple Carbohydrate Sources ». *Journal of Applied Microbiology* 85 (2): 381-86. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00524.x.
- Huang, Caoxing, Ben Jeuck, Jing Du, Qiang Yong, Hou-min Chang, Hasan Jameel, et Richard Phillips. 2016. « Novel process for the coproduction of xylooligosaccharides, fermentable sugars, and lignosulfonates from hardwood ». *Bioresource technology* 219: 600-607.
- Huang, Hua-Jiang, Shri Ramaswamy, U. W. Tschirner, et B. V. Ramarao. 2008. « A Review of Separation Technologies in Current and Future Biorefineries ». *Separation and Purification Technology* 62 (1): 1-21. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.011.
- INNVENTIA. 2016. « Biorefinery Test Methods/ Kraft lignins Lignin and carbohydrate content Acid hydrolysis method ».
- Jacobs, Anna, Per Tomas Larsson, et Olof Dahlman. 2001. « Distribution of Uronic Acids in Xylans from Various Species of Soft- and Hardwood As Determined by MALDI Mass Spectrometry ». *Biomacromolecules* 2 (3): 979-90. https://doi.org/10.1021/bm010062x.
- Jacobs, Anna, Jon Lundqvist, Henrik Stålbrand, Folke Tjerneld, et Olof Dahlman. 2002. « Characterization of Water-Soluble Hemicelluloses from Spruce and Aspen Employing SEC/MALDI Mass Spectroscopy ». *Carbohydrate Research* 337 (8): 711-17. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00054-X.
- Jacquet, Nicolas, Caroline Vanderghem, Christophe Blecker, et Michel Paquot. 2010. « La Steam Explosion : Application En Tant Que Prétraitement de La Matière Lignocellulosique ». *BASE*, janvier. https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=6226.
- Janson, J. 1970. « Calculation of the Polysaccharide Composition of Wood and Pulp. » *Paperi Ja Puu* 52 (5): 323-29.
- Janson, J. 1974. « Analytik der polysaccharide in Holz und Zellstoff » 25 (9): 375-82.
- Johansson, M. H., et O. Samuelson. 1977. « Reducing End Groups in Brich Xylan and Their Alkaline Degradation ». *Wood Science and Technology* 11 (4): 251-63. https://doi.org/10.1007/BF00356924.
- Johnson, Amanda M., Hoon Kim, John Ralph, et Shawn D. Mansfield. 2017. « Natural acetylation impacts carbohydrate recovery during deconstruction of Populus trichocarpa wood ». *Biotechnology for Biofuels* 10 (février). https://doi.org/10.1186/s13068-017-0734-z.

- Jørgensen, Henning, Jan Bach Kristensen, et Claus Felby. 2007. « Enzymatic Conversion of Lignocellulose into Fermentable Sugars: Challenges and Opportunities ». *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1 (2): 119-34. https://doi.org/10.1002/bbb.4.
- Kabel, M. A, H. A Schols, et A. G. J Voragen. 2001. « Mass Determination of Oligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Following HPLC, Assisted by on-Line Desalting and Automated Sample Handling ». *Carbohydrate Polymers* 44 (2): 161-65. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00203-4.
- Kamerling, J P, G J Gerwig, J F G Vliegenthart, et J R Clamp. 1975. « Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides ». *Biochemical Journal* 151 (3): 491-95. https://doi.org/10.1042/bj1510491.
- Kamm, Birgit, Patrick R. Gruber, et Michael Kamm. 2005. « Biorefineries Industrial Processes and Products ». In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, édité par Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, I04_I01. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/14356007.I04_I01.
- Kammerer, Dietmar Rolf, Judith Kammerer, et Reinhold Carle. 2019. « Adsorption and Ion Exchange for the Recovery and Fractionation of Polyphenols: Principles and Applications ». In *Polyphenols in Plants*, 327-39. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00018-9.
- Karas, M, D Bachmann, et F Hillenkamp. 1985. « Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules » 57: 2935-39.
- Khan, Muhammad Azam. 2010. *Hydrolysis of Hemicellulose by Commercial Enzyme Mixtures*. http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:ltu:diva-49478.
- Kilpeläinen, Petri. 2015. « Pressurized hot water flow-through extraction of birch wood ».
- Kisonen, Victor, Kasinee Prakobna, Chunlin Xu, Arto Salminen, Kirsi S. Mikkonen, Dimitar Valtakari, Patrik Eklund, Jukka Seppälä, Maija Tenkanen, et Stefan Willför. 2015. « Composite Films of Nanofibrillated Cellulose and O-Acetyl Galactoglucomannan (GGM) Coated with Succinic Esters of GGM Showing Potential as Barrier Material in Food Packaging ». *Journal of Materials Science* 50 (8): 3189-99. https://doi.org/10.1007/s10853-015-8882-7.
- Koichi, KAKEGAWA. 2006. « Characterization of the cell walls prepared from Populus alba cells grown in boron deficient medium », janvier.
- Kumar, Adepu Kiran, et Shaishav Sharma. 2017. «Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review ». *Bioresources and Bioprocessing* 4 (1): 7. https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9.
- Laine, Christiane. 2005. « Structures of Hemicelluloses and Pectins in Wood and Pulp ». Finlande: Helsinki University of Technology.
- Lau, Ching-Shuan. 2012. « Characterization and Quantification of Monomers, Oligomers, and By-Products from Xylan During Biomass Pretreatment ». University of Arkansas, Fayetteville. https://core.ac.uk/display/84119096.
- Ledesma, B., S. Román, A. Álvarez-Murillo, E. Sabio, et J. F. González. 2014. « Cyclic Adsorption/Thermal Regeneration of Activated Carbons ». *Journal of Analytical*

and Applied Pyrolysis 106 (mars): 112-17. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.01.007.

- Lee, Sang Cheol, et Sunkyu Park. 2016. «Removal of Furan and Phenolic Compounds from Simulated Biomass Hydrolysates by Batch Adsorption and Continuous Fixed-Bed Column Adsorption Methods ». *Bioresource Technology* 216 (septembre): 661-68. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.007.
- Lehtonen, Mari, Suvi Teräslahti, Chunlin Xu, Madhav P. Yadav, Anna-Maija Lampi, et Kirsi S. Mikkonen. 2016. « Spruce Galactoglucomannans Inhibit Lipid Oxidation in Rapeseed Oil-in-Water Emulsions ». *Food Hydrocolloids* 58 (juillet): 255-66. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.006.
- Leschinsky, Moritz, Herbert Sixta, et Rudolf Patt. 2009. « Detailed mass balances of the autohydrolysis of Eucalyptus globulus at 170 C ». *BioResources* 4 (2): 687-703.
- Levy, P. F., J. E. Sanderson, R. G. Kispert, et D. L. Wise. 1981. « Biorefining of Biomass to Liquid Fuels and Organic Chemicals ». *Enzyme and Microbial Technology* 3 (3): 207-15. https://doi.org/10.1016/0141-0229(81)90087-9.
- Li, Haiming, Abrar Saeed, M. Sarwar Jahan, Yonghao Ni, et Adriaan van Heiningen. 2010. « Hemicellulose Removal from Hardwood Chips in the Pre-Hydrolysis Step of the Kraft-Based Dissolving Pulp Production Process ». *Journal of Wood Chemistry* and *Technology* 30 (1): 48-60. https://doi.org/10.1080/02773810903419227.
- Li, Jianguo, Huichao Hu, Hailong Li, Liulian Huang, Lihui Chen, et Yonghao Ni. 2017. « Kinetics and Mechanism of Hemicelluloses Removal from Cellulosic Fibers during the Cold Caustic Extraction Process ». *Bioresource Technology* 234 (juin): 61-66. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.026.
- Li, Jiebing, et Göran Gellerstedt. 2008. « Improved Lignin Properties and Reactivity by Modifications in the Autohydrolysis Process of Aspen Wood ». *Industrial Crops and Products*, 7th Forum of the International Lignin Institute, 27 (2): 175-81. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.07.022.
- Li, Junhui, Shan Li, Yangfan Zheng, Hua Zhang, Jianle Chen, Lufeng Yan, Tian Ding, et al. 2019. « Fast Preparation of Rhamnogalacturonan I Enriched Low Molecular Weight Pectic Polysaccharide by Ultrasonically Accelerated Metal-Free Fenton Reaction ». *Food Hydrocolloids* 95 (octobre): 551-61. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.025.
- Li, Zongquan, Menghua Qin, Chunlin Xu, et Xiaoqian Chen. 2013. « Hot Water Extraction of Hemicelluloses from Aspen Wood Chips of Different Sizes ». *BioResources* 8 (4): 5690-5700.
- Liang, Tu, Qing Fu, Fangbing Li, Wei Zhou, Huaxia Xin, Hui Wang, Yu Jin, et Xinmiao Liang. 2015. «Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Separation, Purification, and Quantification of Raffinose Family Oligosaccharides from Lycopus Lucidus Turcz ». *Journal of Separation Science* 38 (15): 2607-13. https://doi.org/10.1002/jssc.201500316.
- Lindberg, B., ROSELL KG, et S Svensson. 1973. « Positions of the O-acetyl groups in pine glucomannan ».
- Lindorfer, J., M. Lettner, F. Hesser, K. Fazeni, D. Rosenfeld, B. Annevelink, et M. Mandl. 2019. « Technical, Economic and Environmental Assessment of Biorefinery Concepts: Developing a practical approach for characterisation ». IEA Bioenergy Task 42 report. IEA Bioenergy.

- LUNDQVIST, F, F ÖMAN, B SJÖGREN, et A JENSEN. 2009. « Separation of lignin and hemicelluloses from alkaline process liquors ». In .
- Lundqvist, Jon, Anna Jacobs, Magnus Palm, Guido Zacchi, Olof Dahlman, et Henrik Stålbrand. 2003. « Characterization of galactoglucomannan extracted from spruce (Picea abies) by heat-fractionation at different conditions ». *Carbohydrate Polymers*, nº 51: 203-11.
- Lundqvist, Jon, Anita Teleman, Linda Junel, Guido Zacchi, Olof Dahlman, Folke Tjerneld, et Henrik Stålbrand. 2002. « Isolation and Characterization of Galactoglucomannan from Spruce (Picea Abies) ». *Carbohydrate Polymers* 48 (1): 29-39. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00210-7.
- Maček, Andrej. 1999. « Research on Combustion of Black-Liquor Drops ». *Progress in Energy and Combustion Science* 25 (3): 275-304. https://doi.org/10.1016/S0360-1285(98)00027-6.
- Maekawa, Eiichi, Taizo Ichizawa, et Testuo Koshijima. 1989. « An Evaluation of the Acid-Soluble Lignin Determination in Analyses of Lignin by the Sulfuric Acid Method ». *Journal of Wood Chemistry and Technology* 9 (4): 549-67.
- Marinova, Mariya, Enrique Mateos-Espejel, Naceur Jemaa, et Jean Paris. 2009. « Addressing the Increased Energy Demand of a Kraft Mill Biorefinery: The Hemicellulose Extraction Case ». *Chemical Engineering Research and Design*, Special Issue on Biorefinery Integration, 87 (9): 1269-75. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2009.04.017.
- Marraccini, L. M., et T. N. Kleinert. 1959. « Ultraviolet Absorption of Acid Hydrolyzates of Unbleached Pulps ». *Holzforschung* 13 (2): 43-48. https://doi.org/10.1515/hfsg.1959.13.2.43.
- Mateo, Soledad, Inês Conceição Roberto, Sebastián Sánchez, et Alberto J. Moya. 2013. « Detoxification of Hemicellulosic Hydrolyzate from Olive Tree Pruning Residue ». *Industrial Crops and Products* 49 (août): 196-203. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.04.046.
- McDonald-Wharry, John. 2010. « CHARACTERISATION OF WATERSOLUBLE POLYSACCHARIDES PRODUCED DURING PREHYDROLYSIS OF PINUS RADIATA ». The University of Waikato.
- Meier, Dietrich, Bert van de Beld, Anthony V. Bridgwater, Douglas C. Elliott, Anja Oasmaa, et Fernando Preto. 2013. « State-of-the-Art of Fast Pyrolysis in IEA Bioenergy Member Countries ». *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 20:619-641, avril. https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.061.
- Meier, Hans. 1962. « Studies on a galactan from tension wood of beech (Fagus sylvatica L.) » 16 (2275-2283).
- Mendes, C. V. T., M. G. V. S. Carvalho, C. M. S. G. Baptista, J. M. S. Rocha, B. I. G. Soares, et G. D. A. Sousa. 2009. « Valorisation of Hardwood Hemicelluloses in the Kraft Pulping Process by Using an Integrated Biorefinery Concept ». *Food and Bioproducts Processing*, Special Issue on Biorefinery Innovations, 87 (3): 197-207. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.06.004.
- Mikkelson, Atte, Hannu Maaheimo, et Terhi K. Hakala. 2013. « Hydrolysis of Konjac Glucomannan by Trichoderma Reesei Mannanase and Endoglucanases Cel7B and Cel5A for the Production of Glucomannooligosaccharides ». *Carbohydrate Research* 372 (mai): 60-68. https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.02.012.
- Mikkonen, Kirsi S., et Maija Tenkanen. 2012. « Sustainable Food-Packaging Materials Based on Future Biorefinery Products: Xylans and Mannans ». *Trends in Food Science & Technology*, Special Section: Food Integrity and Traceability, 28 (2): 90-102. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.012.

- Monot, Claire. 2015. « Contribution à l'étude des complexes lignine-hydrates de carbone (LCC) dans le bois : étude de l'impact des différentes étapes d'un procédé de bioraffinerie sans soufre sur les LCC ». Phdthesis, Université Grenoble Alpes. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01293498.
- Montané, Daniel, Débora Nabarlatz, Anna Martorell, Vanessa Torné-Fernández, et Vanessa Fierro. 2006. « Removal of Lignin and Associated Impurities from Xylo-oligosaccharides by Activated Carbon Adsorption ». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45 (7): 2294-2302. https://doi.org/10.1021/ie051051d.
- Morais de Carvalho, Danila, Antonio Martínez-Abad, Dmitry V. Evtuguin, Jorge Luiz Colodette, Mikael E. Lindström, Francisco Vilaplana, et Olena Sevastyanova. 2017. « Isolation and Characterization of Acetylated Glucuronoarabinoxylan from Sugarcane Bagasse and Straw ». *Carbohydrate Polymers* 156 (janvier): 223-34. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.022.
- Mosier, Nathan, Charles Wyman, Bruce Dale, Richard Elander, Y. Y. Lee, Mark Holtzapple, et Michael Ladisch. 2005. « Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass ». *Bioresource Technology* 96 (6): 673-86. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025.
- Moure, Andrés, Patricia Gullón, Herminia Domínguez, et Juan Carlos Parajó. 2006. « Advances in the Manufacture, Purification and Applications of Xylo-Oligosaccharides as Food Additives and Nutraceuticals ». *Process Biochemistry* 41 (9): 1913-23. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.011.
- Mu'azu, Nuhu Dalhat, Nabeel Jarrah, Mukarram Zubair, et Omar Alagha. 2017. « Removal of Phenolic Compounds from Water Using Sewage Sludge-Based Carbon Adsorption: А Review. » International Activated Journal of Environmental Research and Public Health 14 (10). https://doi.org/10.3390/ijerph14101094.
- Mullen, Walter T. 1989. Combustion of black liquor. United States US4857282A, filed 13 janvier 1988, et issued 15 août 1989. https://patents.google.com/patent/US4857282A/en.
- Nascimento, Adamara M., Lauro M. de Souza, Cristiane H. Baggio, Maria Fernanda de P. Werner, Daniele Maria-Ferreira, Luisa M. da Silva, Guilherme L. Sassaki, Philip A. J. Gorin, Marcello Iacomini, et Thales R. Cipriani. 2013. «Gastroprotective Effect and Structure of a Rhamnogalacturonan from Acmella Oleracea ». *Phytochemistry* 85 (janvier): 137-42. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.024.
- Naseem, Amina, Shazia Tabasum, Khalid Mahmood Zia, Mohammad Zuber, Muhammad Ali, et Aqdas Noreen. 2016. « Lignin-Derivatives Based Polymers, Blends and Composites: A Review ». *International Journal of Biological Macromolecules* 93 (décembre): 296-313. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.030.
- Ogier, Jean-Claude, Jean-Philippe Leygue, D. Ballerini, J. Pourquie, et Luc Rigal. 1999. « Production d'éthanol a partir de biomasse lignocellulosique ». *Oil & Gas Science and Technology-revue De L Institut Francais Du Petrole - OIL GAS SCI TECHNOL* 54 (janvier): 67-94. https://doi.org/10.2516/ogst:1999004.
- Oinonen, Petri, Holger Krawczyk, Monica Ek, Gunnar Henriksson, et Rosana Moriana. 2016. « Bioinspired composites from cross-linked galactoglucomannan and microfibrillated cellulose: Thermal, mechanical and oxygen barrier properties ». *Carbohydrate polymers* 136: 146-53.

- Oriez, Vincent, Jérôme Peydecastaing, et Pierre-Yves P.-Y. Pontalier. 2019. « Lignocellulosic biomass fractionation by mineral acids and resulting extract purification processes: Conditions, yields, and purities ». *Molecules* 24 (23): 21 p. https://doi.org/10.3390/molecules24234273.
- Oshima, Motoyoshi. 1965. «Wood Chemistry Process Engineering Aspects ». https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300598854.
- Palm, M. 2004. « Separation of Hemicellulosic Oligomers from Steam-Treated Spruce Wood Using Gel Filtration ». *Separation and Purification Technology* 36 (3): 191-201. https://doi.org/10.1016/S1383-5866(03)00215-6.
- Palm, Magnus, et Guido Zacchi. 2003. « Extraction of Hemicellulosic Oligosaccharides from Spruce Using Microwave Oven or Steam Treatment ». *Biomacromolecules* 4 (3): 617-23. https://doi.org/10.1021/bm020112d.
- Pawar, Prashant Mohan-Anupama, Sanna Koutaniemi, Maija Tenkanen, et Ewa J. Mellerowicz. 2013. «Acetylation of woody lignocellulose: significance and regulation ». Frontiers in Plant Science 4 (mai). https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00118.
- Peng, Feng, Pai Peng, Feng Xu, et Run-Cang Sun. 2012. « Fractional Purification and Bioconversion of Hemicelluloses ». *Biotechnology Advances*, Biorefining: Thermochemical and Enzymatic Biomass Conversion, 30 (4): 879-903. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.018.
- Pérez, S, M. A Rodríguez-Carvajal, et T Doco. 2003. « A Complex Plant Cell Wall Polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A Structure in Quest of a Function ». *Biochimie*, Free and conjugated sugars. Biochemistry and molecular biology. Dedicated to Andre Verbert and Jean Agneray, 85 (1): 109-21. https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00053-1.
- Perila, O., et C. T. Bishop. 1961. « ENZYMIC HYDROLYSIS OF A GLUCOMANNAN FROM JACK PINE (PINUS BANKSIANA LAMB.) ». *Canadian Journal of Chemistry*. https://doi.org/10.1139/v61-100.
- Persin, Z., K. Stana-Kleinschek, T. J. Foster, J. E. G. van Dam, C. G. Boeriu, et P. Navard. 2011. « Challenges and Opportunities in Polysaccharides Research and Technology: The EPNOE Views for the next Decade in the Areas of Materials, Food and Health Care ». *Carbohydrate Polymers* 84 (1): 22-32. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.044.
- Pinelo, Manuel, Gunnar Jonsson, et Anne S. Meyer. 2009. « Membrane Technology for Purification of Enzymatically Produced Oligosaccharides: Molecular and Operational Features Affecting Performance ». Separation and Purification Technology 70 (1): 1-11. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.08.010.
- Pinto, Paula Rodrigues, Inês Ferreira Mota, Carla Marques Pereira, Ana Mafalda Ribeiro, José Miguel Loureiro, et Alírio Egídio Rodrigues. 2017. « Separation and Recovery of Polyphenols and Carbohydrates from Eucalyptus Bark Extract by Ultrafiltration/Diafiltration and Adsorption Processes ». Separation and Purification Technology 183 (août): 96-105. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.04.003.
- Polari, Lauri, Pauliina Ojansivu, Sari Mäkelä, Christer Eckerman, Bjarne Holmbom, et Seppo Salminen. 2012. « Galactoglucomannan Extracted from Spruce (Picea Abies) as a Carbohydrate Source for Probiotic Bacteria ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (44): 11037-43. https://doi.org/10.1021/jf303741h.
- Prakobna, Kasinee, Victor Kisonen, Chunlin Xu, et Lars A. Berglund. 2015. « Strong Reinforcing Effects from Galactoglucomannan Hemicellulose on Mechanical

Behavior of Wet Cellulose Nanofiber Gels ». *Journal of Materials Science* 50 (22): 7413-23. https://doi.org/10.1007/s10853-015-9299-z.

- Pranovich, Andrey, Bjarne Holmbom, et Stefan Willför. 2016. « Two-Stage Hot-Water Extraction of Galactoglucomannans from Spruce Wood ». *Journal of Wood Chemistry* and *Technology* 36 (2): 140-56. https://doi.org/10.1080/02773813.2015.1104543.
- Pu, Yan, Trevor Treasure, Ronalds Gonzalez, Richard A. Venditti, et Hasan Jameel. 2013. «Autohydrolysis Pretreatment of Mixed Softwood to Produce Value Prior to Combustion ». *BioEnergy Research* 6 (3): 1094-1103. https://doi.org/10.1007/s12155-013-9343-2.
- Rahikainen, Jenni, Saara Mikander, Kaisa Marjamaa, Tarja Tamminen, Angelos Lappas, Liisa Viikari, et Kristiina Kruus. 2011. « Inhibition of Enzymatic Hydrolysis by Residual Lignins from Softwood - Study of Enzyme Binding and Inactivation on Lignin-Rich Surface ». *Biotechnology and Bioengineering* 108 (12): 2823-34. https://doi.org/10.1002/bit.23242.
- Ramaswamy, Hosahalli S., et Michele Marcotte. 2005. Food Processing: Principles and Applications. CRC Press.
- Rasmussen, H., D. Tanner, H. R. Sørensen, et A. S. Meyer. 2017. « New Degradation Compounds from Lignocellulosic Biomass Pretreatment: Routes for Formation of Potent Oligophenolic Enzyme Inhibitors ». *Green Chemistry* 19 (2): 464-73. https://doi.org/10.1039/C6GC01809B.
- Reis, A., M.R.M. Domingues, A.J. Ferrer-Correia, et M.A. Coimbra. 2003. « Structural Characterisation by MALDI-MS of Olive Xylo-Oligosaccharides Obtained by Partial Acid Hydrolysis ». *Carbohydrate Polymers* 53 (1): 101-7. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00007-9.
- Reyes, Pablo, Regis Teixeira Mendonça, Jaime Rodríguez, Pedro Fardim, et Beatriz Vega. 2013. « CHARACTERIZATION OF THE HEMICELLULOSIC FRACTION OBTAINED AFTER PRE-HYDROLYSIS OF PINUS RADIATA WOOD CHIPS WITH HOT-WATER AT DIFFERENT INITIAL PH ». Journal of the Chilean Chemical Society 58 (1): 1614-18. https://doi.org/10.4067/S0717-97072013000100024.
- Richter, G. 1956. « Some aspects of prehydrolysis pulping » 39 (14): 193-210.
- Rivas, Sandra, Beatriz Gullón, Patricia Gullón Estévez, José Alonso, et Juan Parajó. 2012. « Manufacture and Properties of Bifidogenic Saccharides Derived from Wood Mannan ». *Journal of agricultural and food chemistry* 60 (avril): 4296-4305. https://doi.org/10.1021/jf300524s.
- Roberfroid, Marcel. 2007. « Prebiotics: The Concept Revisited ». *The Journal of Nutrition* 137 (3): 830S-837S. https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S.
- Roudier, A. 1962 16: 343.
- Roudier, A. J., et L. Eberhard. 1960. « The hemi-celluloses of P. pinaster from the Landes ». *Bulletin de la Societe chimique de France*, nº No. 11/12: 2074-85.
- Rowell, R. 2012. Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites, Second Edition. CRC Press.
- Rowell, R.M. 2012. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. CRC Press. https://books.google.fr/books?id=Kn_RBQAAQBAJ.
- Ruiz, Encarnación, Beatriz Gullón, Patrícia Moura, Florbela Carvalheiro, Gemma Eibes, Cristóbal Cara, et Eulogio Castro. 2017. « Bifidobacterial Growth Stimulation by Oligosaccharides Generated from Olive Tree Pruning Biomass ». Carbohydrate Polymers 169 (août): 149-56. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.014.

Rydholm, Sven A. 1965. Pulping processes. New York: Interscience Publishers.

- Saha, Badal C. 2003. «Hemicellulose Bioconversion». *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30 (5): 279-91. https://doi.org/10.1007/s10295-003-0049-x.
- Sainio, Tuomo, Irina Turku, et Jari Heinonen. 2011. « Adsorptive Removal of Fermentation Inhibitors from Concentrated Acid Hydrolyzates of Lignocellulosic Biomass ». *Bioresource Technology* 102 (10): 6048-57. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.107.
- Sanders, Mary Ellen, Francisco Guarner, Richard Guerrant, Peter R. Holt, Eamonn MM Quigley, R. Balfour Sartor, Philip M. Sherman, et Emeran A. Mayer. 2013.
 « An Update on the Use and Investigation of Probiotics in Health and Disease ». *Gut* 62 (5): 787-96. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302504.
- Sanglard, Marion. 2013. « Production simultanée de fibres cellulosiques blanchies et de polyxylosides d'alkyle dans le cadre d'une bioraffinerie papetière ». France: Université Grenoble Alpes (ComUE).
- Šauperl, Olivera, Aleš Doliška, A Hadela, et S Strnad. 2016. « Functionalization of polyethyleneterephthalate fibers using galactoglucomannan from spruce wood » 86 (2): 202-9.
- Scheller, Henrik Vibe, et Peter Ulvskov. 2010. « Hemicelluloses ». Annual Review of *Plant Biology* 61: 263-89. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- Sen, Dwaipayan, Aaron Gosling, Geoff W. Stevens, Prashant K. Bhattacharya, Andrew R. Barber, Sandra E. Kentish, Chiranjib Bhattacharjee, et Sally L. Gras. 2011.
 « Galactosyl Oligosaccharide Purification by Ethanol Precipitation ». *Food Chemistry* 128 (3): 773-77. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.076.
- Shen, Jing, Ishneet Kaur, Mir Mojtaba Baktash, Zhibin He, et Yonghao Ni. 2013. « A Combined Process of Activated Carbon Adsorption, Ion Exchange Resin Treatment and Membrane Concentration for Recovery of Dissolved Organics in Pre-Hydrolysis Liquor of the Kraft-Based Dissolving Pulp Production Process ». *Bioresource Technology* 127 (janvier): 59-65. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.031.
- Shiiba, Kaoru, et Hiroyoshi Hara. 1998. Arabinoxylo-oligosaccharide. JP2807575B2, issued 8 octobre 1998. https://patents.google.com/patent/JP2807575B2/en.
- Shimizu, K, D.N.-S Hon, et N Shiraishi. 1991. « Chemistry of hemicelluloses ». In *Wood and Cellulosic Chemistry*, Marcel Dekker, 177-214. New York and Basel.
- Silva, Acarlia, Henrique Rodrigues Marcelino, Monique Gomes, Elquio Oliveira, Toshiyuki Jr, et Socrates Egito. 2012. « Xylan, a Promising Hemicellulose for Pharmaceutical Use ». In . https://doi.org/10.5772/33070.
- Sims, Ian M., David J. Craik, et Antony Bacic. 1997. « Structural Characterisation of Galactoglucomannan Secreted by Suspension-Cultured Cells of Nicotiana Plumbaginifolia ». *Carbohydrate Research* 303 (1): 79-92. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00144-4.
- Simson, B. W., et T. E. Timell. 1978. « Polysaccharides in cambial tissues of Populus tremuloidesand Tilia americana. I. Isolation, fractionation and chemical composition of the cambial tissues ». *Cellul. Chem. Technol* 22: 39-50.
- Sipponen, Mika, Jenni Rahikainen, Timo Leskinen, Ville Pihlajaniemi, Maija-Liisa Mattinen, Heiko Lange, Claudia Crestini, et Monika Österberg. 2017. « Structural changes of lignin in biorefinery pretreatments and consequences to enzyme-lignin interactions - OPEN ACCESS ». *Nordic Pulp and Paper*

Research Journal 32 (décembre): 550-71. https://doi.org/10.3183/NPPRJ-2017-32-04-p550-571.

Sista Kameshwar, Ayyappa Kumar, et Wensheng Qin. 2018a. « Understanding the structural and functional properties of carbohydrate esterases with a special focus on hemicellulose deacetylating acetyl xylan esterases ». *Mycology* 9 (4): 273-95. https://doi.org/10.1080/21501203.2018.1492979.

——. 2018b. « Structural and functional properties of pectin and lignincarbohydrate complexes de-esterases: a review ». *Bioresources and Bioprocessing* 5 (1): 43. https://doi.org/10.1186/s40643-018-0230-8.

Sixta, Herbert. 2006a. « Multistage kraft pulping ». *Handbook of Pulp*, janvier, 325-65. ——, éd. 2006b. *Handbook of Pulp*. 1^{re} éd. Wiley.

https://doi.org/10.1002/9783527619887.

- Sjöström, E. 1993. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. 2nd ed. London: Academic Press. https://doi.org/10.1016/C2009-0-03289-9.
- Sjöström, E., et R. Alén. 1999. « Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking ». In *Springer Series in Wood Science*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03898-7.
- Sjöström, E., et U. Westermark. 1999. « Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution ». In *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*, édité par Eero Sjöström et Raimo Alén, 1-19. Springer Series in Wood Science. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03898-7_1.
- Sjöström, Eero. 1993. *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*. 2nd éd. London Academic: Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2009-0-03289-9.
- Sjöström, Jaana. 1990. « Detrimental substances in pulp and paper production : approaches to chemical analysis of deposits and dissolved organic matter ». Turku: A ° bo Akademi University, Department of Chemical Engineering. http://data.nationallibrary.fi/bib/me/W00068307200.
- Song, Tao, Andrey Pranovich, et Bjarne Holmbom. 2013. « Separation of Polymeric Galactoglucomannans from Hot-Water Extract of Spruce Wood ». *Bioresource Technology* 130 (février): 198-203. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.149.
- Song, Tao, Andrey Pranovich, Ivan Sumerskiy, et Bjarne Holmbom. 2008. « Extraction of galactoglucomannan from spruce wood with pressurised hot water ». *Holzforschung* 62 (6). https://doi.org/10.1515/HF.2008.131.
- Stålbrand, H., J. Lundqvist, A. Andersson, P. Hägglund, L. Anderson, F. Tjerneld, A. Jacobs, et al. 2003. « Isolation, Characterization, and Enzymatic Hydrolysis of Acetyl-Galactoglucomannan from Spruce (Picea abies) ». In *Hemicelluloses: Science and Technology*, 864:66-78. ACS Symposium Series 864. American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/bk-2004-0864.ch005.
- Stamm, A. J. 1964. « Wood and Cellulose Science. » *Wood and Cellulose Science.* https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19640604227.
- Suhas, P.J.M. Carrott, et M.M.L. Ribeiro Carrott. 2007. « Lignin from natural adsorbent to activated carbon: A review ». *Bioresource Technology* 98 (12): 2301-12. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.008.
- Sundberg, Anna, Kenneth Sundberg, Camilla Lillandt, et Bjarne Holmhom. 1996. « Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography ». *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 11 (4): 216-19. https://doi.org/10.3183/npprj-1996-11-04-p216-219.

- Sunna, A., et G. Antranikian. 1997. « Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria ». *Critical Reviews in Biotechnology* 17 (1): 39-67. https://doi.org/10.3109/07388559709146606.
- Swennen, Katrien, Christophe M. Courtin, Bart Van der Bruggen, Carlo Vandecasteele, et Jan A. Delcour. 2005. « Ultrafiltration and Ethanol Precipitation for Isolation of Arabinoxylooligosaccharides with Different Structures ». Carbohydrate Polymers 62 (3): 283-92. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.001.
- Taherzadeh, Mohammad J., et Keikhosro Karimi. 2007. « ENZYMATIC-BASED HYDROLYSIS PROCESSES FOR ETHANOL ». *BioResources* 2 (4): 707-38.
- Taherzadeh, Mohammad, et Keikhosro Karimi. 2007. « Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review ». *BioResources* 2 (août).
- Tanaka, Koichi, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida, et T. Matsuo. 1988. « Protein and Polymer Analyses up to m/z 100 000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2 (8): 151-53. https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802.
- Tanthapanichakoon, W., P. Ariyadejwanich, P. Japthong, K. Nakagawa, S. R. Mukai, et H. Tamon. 2005. « Adsorption-Desorption Characteristics of Phenol and Reactive Dyes from Aqueous Solution on Mesoporous Activated Carbon Prepared from Waste Tires ». Water Research 39 (7): 1347-53. https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.044.
- TAPPI, UM. 1991. « 250. Acid-soluble Lignin in Wood and Pulp, TAPPI Useful Methods ». *Tappi, Atlanta, GA, USA*.
- Taylor, R., L. Nattrass, G. Alberts, P. Robson, C. Chudziak, A. Bauen, I. M. Libelli, et al. 2015. « From the Sugar Platform to Biofuels and Biochemicals : Final Report for the European Commission Directorate-General Energy ». N° ENER/C2/423-2012/SI2.673791. E4Tech, RE-CORD, WUR. https://research.wur.nl/en/publications/from-the-sugar-platform-to-biofuels-and-biochemicals-final-report.
- Teleman, Anita, Jon Lundqvist, Folke Tjerneld, Henrik Stålbrand, et Olof Dahlman. 2000. « Characterization of Acetylated 4-O-Methylglucuronoxylan Isolated from Aspen Employing 1H and 13C NMR Spectroscopy ». *Carbohydrate Research* 329 (4): 807-15. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00249-4.
- Teleman, Anita, Maria Nordström, Maija Tenkanen, Anna Jacobs, et Olof Dahlman. 2003. « Isolation and Characterization of O-Acetylated Glucomannans from Aspen and Birch Wood ». *Carbohydrate Research* 338 (6): 525-34. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00491-3.
- Tenkanen, Maija, Jürgen Puls, Marjaana Rättö, et Liisa Viikari. 1993. « Enzymatic Deacetylation of Galactoglucomannans ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 39 (2): 159-65. https://doi.org/10.1007/BF00228600.
- Tenkanen, Maija, Jeff Thornton, et Liisa Viikari. 1995. « An Acetylglucomannan Esterase of Aspergillus Oryzae; Purification, Characterization and Role in the Hydrolysis of O-Acetyl-Galactoglucomannan ». *Journal of Biotechnology* 42 (3): 197-206. https://doi.org/10.1016/0168-1656(95)00080-A.
- Terzyk, Artur P. 2004. « Molecular Properties and Intermolecular Forces—Factors Balancing the Effect of Carbon Surface Chemistry in Adsorption of Organics from Dilute Aqueous Solutions ». *Journal of Colloid and Interface Science* 275 (1): 9-29. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.011.

- Testova, L., K. Vilonen, Henna Riikka Pynnönen, Tiina Maija Tenkanen, et H. Sixta. 2009. « Isolation of Hemicelluloses from Birch Wood: Distribution of Wood Components and Preliminary Trials in Dehydration of Hemicelluloses ». *Lenzinger Berichte* 87: 58-65.
- Thomas, Jerry R., Michael McNeil, Alan G. Darvill, et Peter Albersheim. 1987. « Structure of Plant Cell Walls 1 ». *Plant Physiology* 83 (3): 659-71.
- Thornton, Jeff, Rainer Ekman, Bjarne Holmbom, et Folke Örså. 1994. « Polysaccharides Dissolved from Norway Spruce in Thermomechanical Pulping and Peroxide Bleaching ». *Journal of Wood Chemistry and Technology* 14 (2): 159-75. https://doi.org/10.1080/02773819408003092.
- Timell, T. E. 1967. « Recent Progress in the Chemistry of Wood Hemicelluloses ». *Wood Science and Technology* 1 (1): 45-70. https://doi.org/10.1007/BF00592255.
- Timell, T.E. 1961. « Isolation of galactoglucomannans from the wood of gymnosperms ». *TAPPI* 44: 88-96.
- Timell, Tore E. 1964. « Wood hemicelluloses: part I ». In *Advances in carbohydrate chemistry*, 19:247-302. Elsevier.
- Tran, Honghi, et Douglas W. Reeve. 1988. « Scientists and engineers take time to reflect at the International Colloquium on High-temperature Research Related to Black Liquor Combustion ».
- Tunc, M. Sefik, et Adriaan R. P. van Heiningen. 2008. « Hemicellulose Extraction of Mixed Southern Hardwood with Water at 150 °C: Effect of Time ». Industrial & Engineering Chemistry Research 47 (18): 7031-37. https://doi.org/10.1021/ie8007105.
- Tunc, Mehmet Sefik, et Adriaan R.P. van Heiningen. 2011. « Characterization and Molecular Weight Distribution of Carbohydrates Isolated from the Autohydrolysis Extract of Mixed Southern Hardwoods ». Carbohydrate Polymers 83 (1): 8-13. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.015.
- Um, Byung-Hwan. 2012. « Evaluation of Secondary Acid and Enzymatic Hydrolysis of Hemicellulose in Hot Water Pre-Pulping Extract of Mixed Hardwoods ». *Journal of the Korean Wood Science and Technology* 40 (mars): 123-32. https://doi.org/10.5658/WOOD.2012.40.2.123.
- U.S. Department of Energy. 2005. « Biomass programm ». Arlington, Virginia.
- Vegas, Rodolfo, Susana Luque, José Ramón Alvarez, José Luis Alonso, Herminia Domínguez, et Juan Carlos Parajó. 2006. « Membrane-Assisted Processing of Xylooligosaccharide-Containing Liquors ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (15): 5430-36. https://doi.org/10.1021/jf060525w.
- Vila, Carlos, Javier Romero, Jose Francisco, Valentin Santos, et J. Parají. 2012. « On the recovery of hemicellulose before kraft pulping ». *BioResources* 7 (août): 4179-89.
- Villarreal, M. L. M, A. M. R. Prata, M. G. A Felipe, et J. B. Almeida E Silva. 2006. « Detoxification Procedures of Eucalyptus Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by Candida Guilliermondii ». *Enzyme and Microbial Technology*, Papers from the 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld-2005), 40 (1): 17-24. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.032.
- Vinardell, Maria Pilar, et Montserrat Mitjans. 2017. « Lignins and Their Derivatives with Beneficial Effects on Human Health ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6). https://doi.org/10.3390/ijms18061219.

- Volpi, Nicola, Francesca Maccari, et Robert J. Linhardt. 2008. « Capillary Electrophoresis of Complex Natural Polysaccharides ». *Electrophoresis* 29 (15): 3095-3106. https://doi.org/10.1002/elps.200800109.
- Wang, Haiyan, Masoud Jahandar Lashaki, Mohammadreza Fayaz, Zaher Hashisho, John H. Philips, James E. Anderson, et Mark Nichols. 2012. « Adsorption and Desorption of Mixtures of Organic Vapors on Beaded Activated Carbon ». *Environmental Science & Technology* 46 (15): 8341-50. https://doi.org/10.1021/es3013062.
- Wang, Zhaojiang, Jingshun Zhuang, Xiaojun Wang, Zongquan Li, Yingjuan Fu, et Menghua Qin. 2016. « Limited Adsorption Selectivity of Active Carbon toward Non-Saccharide Compounds in Lignocellulose Hydrolysate. » *Bioresource Technology* 208 (février): 195-99. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.072.
- Warnquist, B., G. Svedberg, N. Ihren, P. Ulmgren, et R. Lindstroem. 1992. « Black Liquor Gasification », avril. https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/7041117.
- Werpy, T., et G. Petersen. 2004. « Top Value Added Chemicals from Biomass -Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas ». DOE/GO-102004-1992. US Department of Energy, produced by the Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL). https://doi.org/10.2172/15008859.
- Willför, S, R Sjöholm, C Laine, M Roslund, J Hemming, et B Holmbom. 2003a. « Characterisation of Water-Soluble Galactoglucomannans from Norway Spruce Wood and Thermomechanical Pulp ». *Carbohydrate Polymers* 52 (2): 175-87. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00288-6.
- ———. 2003b. « Characterisation of Water-Soluble Galactoglucomannans from Norway Spruce Wood and Thermomechanical Pulp ». *Carbohydrate Polymers* 52 (2): 175-87. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00288-6.
- Willför, Stefan, et Bjarne Holmbom. 2004. « Isolation and Characterisation of Water Soluble Polysaccharides from Norway Spruce and Scots Pine ». Wood Science and Technology 38 (3): 173-79. https://doi.org/10.1007/s00226-003-0200-x.
- Willför, Stefan, Patrik Rehn, A. Sundberg, Kenneth Sundberg, et Bjarne Holmbom. 2003. « Recovery of water-soluble acetyl-galactoglucomannans from mechanical pulp of spruce ». *Tappi Journal* 2 (octobre): 27-32.
- Willför, Stefan, Kenneth Sundberg, Maija Tenkanen, et Bjarne Holmbom. 2008. « Spruce-Derived Mannans – A Potential Raw Material for Hydrocolloids and Novel Advanced Natural Materials ». *Carbohydrate Polymers* 72 (2): 197-210. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.006.
- Xing, Xiaohui, Steve W. Cui, Shaoping Nie, Glyn O. Phillips, H. Douglas Goff, et Qi Wang. 2015. « Study on Dendrobium Officinale O -Acetyl-Glucomannan (Dendronan ®): Part II. Fine Structures of O -Acetylated Residues ». Carbohydrate Polymers 117 (mars): 422-33. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.121.
- Xu, Chunlin, Ann-Sofie Leppänen, Patrik Eklund, Peter Holmlund, Rainer Sjöholm, Kenneth Sundberg, et Stefan Willför. 2010. « Acetylation and Characterization of Spruce (Picea Abies) Galactoglucomannans ». *Carbohydrate Research* 345 (6): 810-16. https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.01.007.
- Xue, Bai-Liang, Jia-Long Wen, Feng Xu, et Run-Cang Sun. 2012. « Structural Characterization of Hemicelluloses Fractionated by Graded Ethanol
Precipitation from Pinus Yunnanensis ». *Carbohydrate Research* 352 (mai): 159-65. https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.02.004.

- Yang, Haibing, Matheus R. Benatti, Rucha A. Karve, Arizona Fox, Richard Meilan, Nicholas C. Carpita, et Maureen C. McCann. 2020. « Rhamnogalacturonan-I Is a Determinant of Cell–Cell Adhesion in Poplar Wood ». *Plant Biotechnology Journal* 18 (4): 1027-40. https://doi.org/10.1111/pbi.13271.
- Yapo, Beda M. 2011. « Rhamnogalacturonan-I: A Structurally Puzzling and Functionally Versatile Polysaccharide from Plant Cell Walls and Mucilages ». *Polymer Reviews* 51 (4): 391-413. https://doi.org/10.1080/15583724.2011.615962.
- Yoo, Chang Geun, Xianzhi Meng, Yunqiao Pu, et Arthur J. Ragauskas. 2020. « The Critical Role of Lignin in Lignocellulosic Biomass Conversion and Recent Pretreatment Strategies: A Comprehensive Review ». *Bioresource Technology* 301 (avril): 122784. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122784.
- Yu, Osbert, et Kwang Ho Kim. 2020. « Lignin to Materials: A Focused Review on Recent Novel Lignin Applications ». *Applied Sciences* 10 (13): 4626. https://doi.org/10.3390/app10134626.
- Zhang, Shu, Jian'an Liu, Yi Chen, Shaoxiang Xiong, Guanghui Wang, Jun Chen, et Guoqiang Yang. 2010. « A Novel Strategy for MALDI-TOF MS Analysis of Small Molecules ». *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21 (1): 154-60. https://doi.org/10.1016/j.jasms.2009.09.024.
- Zhang, Yongchao, Singhi Wang, Wenyang Xu, Fang Cheng, Andrey Pranovich, Annika Smeds, Stefan Willför, et Chunlin Xu. 2019. «Valorization of Lignin– Carbohydrate Complexes from Hydrolysates of Norway Spruce: Efficient Separation, Structural Characterization, and Antioxidant Activity». ACS Sustainable Chemistry & Engineering 7 (1): 1447-56. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05142.
- Zhang, Yu, Changlei Xia, Mingming Lu, et Maobing Tu. 2018. « Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates ». *Biotechnology for Biofuels* 11 (1): 178. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1182-0.
- Zheng, Jiayi, Baoying Pan, Jiangxiong Xiao, Xianda He, Zhe Chen, Qianlin Huang, et Xiaoqing Lin. 2018. «Experimental and Mathematical Simulation of Noncompetitive and Competitive Adsorption Dynamic of Formic Acid–Levulinic Acid–5-Hydroxymethylfurfural from Single, Binary, and Ternary Systems in a Fixed-Bed Column of SY-01 Resin ». https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6020168.

Résumé

ABSTRACT

Facing climate change and the near end of the oil age led us to rethink our consumption patterns and energy models, to insure a sustainable future four human beings. In this way, the biorefinery plays an important role and is a key concept to bring a part of the solution, exploiting the potential of biomass, which is renewable and widely available, for energy production and chemicals, materials, human health, and agri-food products manufacturing. Hence, this project aims at valorizing wood hemicelluloses in the frame of a lignocellulosic biorefinery integrated in a kraft pulp mill. These are complex heteropolysaccharides accounting for one third of wood and ones of the most abundant biopolymers on earth. Both softwood and hardwood chips industrial mixtures are used for hemicelluloses oligomers extraction prior to the kraft process through a low-tech and green process (without using any chemicals) named autohydrolysis. This pretreatment step allows for the solubilization of oligosaccharides, monosaccharides, lignin fragments and other small molecular weight organic compounds and is the only one used at an industrial scale to produce hemicelluloses from wood. The chemical composition of these wood hydrolysates depends much on wood species and autohydrolysis severity. The main objective of the thesis is to design a sort of universal scheme of analytical methods that can be applied to any kind of hydrolysate in order to identify, quantify and isolate its hemicelluloses families.

The study of the molecular diversity of soluble oligosaccharides containing liquors produced at high and low temperature (170 and 150°C) is based on several purifications' steps before analysis. First of all, membrane filtration is used with different molecular weight cut-offs to classify and separate oligomers and impurities according to their size. In a second part, soluble lignin and sugar degradation products generated during autohydrolysis are removed by adsorption on activated charcoal. Less polydisperse and 99% pure oligosaccharides mixtures are thus obtained thanks to the optimization and combination of these two techniques of purification. Nevertheless, big losses of hemicelluloses are triggered by these treatments between 70 and 80% compared to the raw hydrolysate. In the end, the last chapter of experiments deals with the final purification and characterization steps of these purified samples which are performed by size exclusion liquid chromatography and mass spectrometry analyses. This chromatographic technique operating at low pressure is an interesting tool for the separation of neutral oligomers from hexuronic acid substituted oligomers in both hardwood and softwood extracts. Also, elimination of recalcitrant lignin carbohydrates complexes was achieved for some fractions as well as the isolation of specific bioactive molecules of low degree of polymerization (potential nutraceutical applications).

<u>Key words</u>: Biorefinery, Hemicelluloses, Soluble Oligosaccharides, Wood Chemistry, Analytical Chemistry, Activated Charcoal, Ultrafiltration, GFC-SEC, MALDI-TOF MS, GC-FID, HPAEC-PAD

RESUME

La définition de nouveaux modes de consommation et la fin progressive de l'ère pétrolière s'imposent à nous comme piliers pour assurer un avenir soutenable aux générations futures. C'est dans ce sens que la bioraffinerie au sens large a un rôle majeur à jouer aujourd'hui et qu'elle a été désignée comme concept clé d'exploitation durable d'une ressource renouvelable qu'est la biomasse végétale pour la production d'énergie, de matériaux et de produits chimiques, mais aussi de produits pour l'alimentation animale et la santé humaine. Dans ce contexte, cette thèse vise à valoriser les hémicelluloses du bois dans le cadre d'une bioraffinerie lignocellulosique intégrée à la production de fibres de cellulose. Ces hétéropolysaccharides complexes représentent 30% du bois et sont les deuxièmes biopolymères les plus abondants sur terre. Dans ce projet, ils sont donc extraits par solubilisation en amont du procédé papetier par un prétraitement nommé autohydrolyse. Ce traitement relativement propre car consommant peu d'énergie et n'utilisant aucun produit chimique, est choisi pour la production d'hémicelluloses à partir de mélanges de copeaux de bois industriels de feuillus et de résineux. Il s'agit du seul moyen de production d'hémicelluloses issue du bois déjà utilisé à échelle industrielle. La caractérisation des hydrolysats résultants est complexe car ils contiennent des composés de nature chimique très différente dont la composition varie grandement avec l'essence de bois et la sévérité du traitement. Le principal objectif de cette thèse est de définir un schéma de méthodes analytiques applicable et adaptable à tout type d'hydrolysat, afin d'en isoler et cartographier les familles d'hémicelluloses.

L'étude de la diversité moléculaire des oligosaccharides solubles contenus dans ces autohydrolysats de bois, produits à basse et haute température (150 et 170°C), passe par plusieurs étapes de purification et d'analyse. D'abord les oligomères sont classés et séparés des impuretés en fonction de leur taille grâce à l'emploi de l'ultrafiltration membranaire. Puis la lignine et les produits de dégradation des sucres formés lors de l'autoprotolyse sont éliminés des hydrolysats par adsorption sur des grains de charbon actif. L'optimisation et la combinaison de ces deux techniques de purification adaptées à l'essence de bois et la température d'extraction utilisées permettent ainsi d'obtenir des mélanges d'oligosaccharides moins polydispersés que l'hydrolysat de départ et purs en oligosaccharides d'hémicelluloses à 99%. Cependant ces traitement engendrent des pertes en oligosaccharides, de l'ordre de 70 à 80% en masse sèche par rapport à l'hydrolysat de départ. Elles sont dues à l'adsorption sur le charbon actif ou au passage à travers les pores des membranes de filtration. Ces mélanges sont donc plus aptes à être fractionnés par chromatographie liquide d'exclusion stérique et analysés par spectrométrie de masse. Il s'agit de la dernière partie expérimentale de cette étude. La chromatographie d'exclusion stérique a notamment permis la quantification et la séparation entre oligomères chargés d'acides hexuroniques et oligomères neutres à la fois des hydrolysats de feuillus et de résineux produits à haute température. Pour certaines fractions l'élimination des complexes lignine hydrates de carbone récalcitrant à l'adsorption au charbon actif a pu être réalisée ainsi que l'isolation de certaines molécules bioactives de faible degré de polymérisation (valorisables en produits nutraceutiques).

<u>Mots clés :</u> Bioraffinerie, Autohydrolyse, Hémicelluloses, Oligosaccharides Solubles, Chimie du Bois, Chimie Analytique, Charbon Actif, Ultrafiltration, GFC, MALDI-TOF MS, GC-FID, HPAEC-PAD