



HAL
open science

Développement de stratégies chimiques et enzymatiques innovantes pour la transformation de la chitine

Gaël Huet

► **To cite this version:**

Gaël Huet. Développement de stratégies chimiques et enzymatiques innovantes pour la transformation de la chitine. Chimie organique. Université de Picardie Jules Verne, 2021. Français. NNT : 2021AMIE0044 . tel-03817266

HAL Id: tel-03817266

<https://theses.hal.science/tel-03817266>

Submitted on 17 Oct 2022

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 de Doctorat

Mention Chimie organique
Spécialité Chimie fine

présentée à *l'Ecole Doctorale en Sciences, Technologie, Santé*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Gaël Huet

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Développement de stratégies chimiques et enzymatiques
innovantes pour la transformation de la chitine*

Soutenue le 31 Mai 2021, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M^{me} S. Bouquillon, Professeur
M^{me} M. Draye, Professeur
M. J. Jasniewski, Maître de Conférences HDR
M. E. Husson, Maître de Conférences
M. A. Nguyen Van Nhien, Professeur
M^{me} C. A. Ahad Hadad, Maître de Conférences

Présidente
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-encadrant

À ma famille

Remerciements

Le travail effectué au cours de cette thèse a été rendu possible grâce au financement alloué par le Ministère de l'éducation ce dont je lui suis très reconnaissant. Les travaux ont été réalisés dans les laboratoires du LG2A (CNRS UMR 7378) et du GEC (CNRS UMR 7025). Je voudrais donc remercier les directeurs de ces laboratoires, le Professeur José Kovensky (LG2A, UPJV) et le Professeur Catherine Sarazin (GEC, UPJV) de m'avoir accueilli au sein de leur infrastructure. Je remercie particulièrement le Professeur Catherine Sarazin d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et d'avoir participé à de nombreuses discussions scientifiques qui n'ont permis de progresser dans mes travaux. De même, je n'oublie pas le Docteur Isabelle Dez qui a fait partie de mon comité de thèse et su se rendre disponible pour moi.

Je ne pourrais jamais assez remercier mes encadrants de thèse, le professeur Albert Nguyen Van Nhien (LG2A, UPJV), le Docteur Caroline A. Ahad Hadad (LG2A, UPJV) et plus officieusement le Docteur Eric Husson (GEC, UPJV). Grâce à eux, j'ai découvert un domaine dans lequel je suis épanoui et leur suis infiniment reconnaissant d'avoir cru en moi et de m'avoir tendu la main pour vivre cette expérience qui n'aurait pas été la même sans eux. Leurs qualités humaines sont indéniables et ils m'ont permis de me développer énormément d'un point de vue scientifique et personnel. Ils ont su me canaliser et faire preuve de patience. Je suis conscient des efforts qu'ils ont fournis pour que je puisse soutenir cette thèse et leur suis infiniment redevable pour cela.

Je remercie le Professeur Sandrine Bouquillon de l'université de Reims-Champagne Ardennes et le Professeur Micheline Draye de l'Université Savoie Mont Blanc d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que le Docteur Jordane Jasniewski de l'Université de Lorraine d'avoir bien voulu être examinateur. Je remercie de nouveau le Docteur Éric Husson de faire partie de ce jury de thèse en tant qu'examinateur. Les contraintes de temps et sanitaires ne sont pas faciles à gérer et je vous remercie donc tous d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé dans mes travaux comme Virginie Lambertyn (GEC, UPJV) qui m'a permis de me sentir comme chez moi au sein du GEC, le Docteur Sylvain Laclef (LG2A, UPJV) qui en plus de m'avoir aidé m'a fait rêver avec son humour de qualité. Je n'oublie pas le Docteur Dominique Cailleux (Plateforme analytique - UPJV) qui m'a aidé pour toutes les caractérisations nécessitant l'utilisation de spectroscopie à résonance nucléaire. De même pour le Docteur Matthieu Courty (LRCS- UPJV) pour toutes les expériences nécessitant une analyse thermogravimétrique.

Je tiens à remercier ma mère et mon père qui m'ont inculqué mes valeurs. Ils sont des repères dans ma vie et c'est indéniablement grâce à eux et à leur amour que je suis aujourd'hui sur le point de soutenir une thèse et je ne pourrais jamais assez les en remercier. Je remercie également ma sœur qui a une grande place dans mon cœur. Même si nous vivons dans des régions diamétralement opposées, elle a su me soutenir dans des moments difficiles. Je remercie les potos qui ont été des piliers pour mon moral ! Beber, désolé mon pote mais tu vas devoir m'appeler docteur ! Manu, faudra se refaire des soirées à Panam, une fois la situation redevenue meilleure ! Vincent, trouve-moi un autre surnom sinon t'existes plus à mes yeux !

Bien sûr on ne peut pas oublier toute la clique Amiénoise ! Nely, il faudra refaire un tour en Espagne pour mieux visiter et remanger à votre restaurant ! Josip, la prochaine fois que ça décale en Croatie, je décale direct avec vous ! Pacho, au final c'est toi qui vas finir ta vie à Amiens. On viendra te voir de temps en temps ! Chili forcément, j'espère que j'aurai rendu ton séjour à Amiens aussi stylé que tu auras rendu le mien. On n'oubliera pas de venir te voir en Argentine, promis ! Claudita, j'espère que je t'aurai fait découvrir un peu de la France comme tu m'as fait découvrir un peu du Mexique ! Sans cette clique, Amiens n'aurait pas été la même !

Enfin, un grand merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu partager du temps au laboratoire du GEC ou LG2A. Vous êtes nombreux, doctorants, postdocs, BIATS et permanents à avoir fait partie de ma vie pendant ces 4 ans. Celles-ci furent un plaisir pour moi et je n'oublierai pas, grâce à toutes ces rencontres, cette aventure qu'a été Amiens.

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	9
Introduction générale : Extraction et caractérisation de la chitine.....	11
I. La chitine	11
II. Aspect économique	13
III. Structure tridimensionnelle de la chitine	14
IV. Sources de chitine	16
V. Extraction de la chitine	17
1. Extraction classique dite chimique.....	17
2. Extraction par activation aux micro-ondes	18
3. Extraction par les liquides ioniques ou les solvants eutectiques profonds	18
4. Extraction biologique	20
VI. Techniques de caractérisation de la chitine.....	22
1. Détermination de la pureté de la chitine.....	23
2. Détermination du degré d'acétylation (DA).....	27
3. Détermination de la forme cristalline	29
4. Détermination de l'indice de cristallinité (IC)	30
5. Détermination du poids moléculaire (PM)	31
6. Détermination des propriétés morphologiques et texturales de la chitine	33
VII. Applications de la chitine et de ces dérivés	34
VIII. Préambule - Objectifs.....	37
Chapitre 1 : Prétraitements aux liquides ioniques et hydrolyses enzymatiques : Vers une bioraffinerie d'insecte.....	39
Partie A : État de l'art.....	39
I. Les oligosaccharides.....	39
II. Propriétés biologiques des COS	40
III. Propriétés biologiques de la glucosamine	42

IV.	Propriétés élicitrices des COS.....	42
V.	Synthèse des COS.....	43
VI.	Méthodes d'extractions de COS.....	45
1.	Hydrolyse acide	45
2.	Extraction de COS par broyage (broyeur à billes)	47
3.	Hydrolyse enzymatique.....	48
VII.	Prétraitements de la chitine.....	50
1.	Les fluides supercritiques.....	51
2.	Prétraitements en milieu acide.....	53
3.	Prétraitements microbiologiques	53
4.	Prétraitements mécaniques.....	54
5.	Explosion à la vapeur.....	54
VIII.	Prétraitement de la biomasse par les liquides ioniques	55
1.	Découverte des liquides ioniques	55
2.	Classification des liquides ioniques.....	56
3.	Les liquides ioniques à base de noyau imidazolium	58
4.	Applications des liquides ioniques à base de noyau imidazolium	59
5.	Solvatation de la biomasse par les liquides ioniques.....	60
6.	(Cyto)Toxicité des liquides ioniques à base de noyau imidazolium.....	62
7.	Stabilité et dégradation des liquides ioniques à noyau imidazolium	64
IX.	Objectif de nos travaux (Gael Huet et al. 2020).....	66
Partie B : Articles, résultats et discussion		68
Article 1		68
Article 2		100
Résultats :.....		164
I.	Discussion et conclusions.....	164
II.	Conclusions :	172

Chapitre 2 : Liquides ioniques <i>versus</i> liquides ioniques zwitterioniques : Impact des prétraitements des biomasses chitineuses et lignocellulosiques sur la dépolymérisation enzymatique	173
Partie A : État de l'art.....	173
I. Composition de la biomasse lignocellulosique.....	173
II. Cellulose.....	175
1. Structure chimique.....	175
2. Cristallinité et polymorphisme.....	175
III. Applications.....	177
IV. Fermentation alcoolique de monosaccharides.....	178
V. Objectif des travaux.....	180
Partie B : Article, résultats et discussion.....	183
Article 3	183
Résultats :	223
I. Discussion et conclusions.....	223
II. Conclusions :	228
Chapitre 3 : Liquides ioniques <i>versus</i> solvants eutectiques profonds : Impact des prétraitements sur l'obtention de chitosanes purs et hautement fonctionnalisables.....	230
Partie A : État de l'art.....	230
I. Le chitosane	230
II. Méthodes de désacétylation de la chitine.....	231
1. Réaction de désacétylation assistée par micro-ondes.....	231
2. Réaction de désacétylation catalysée par des désacétylases.....	231
3. Réaction de désacétylation par explosion à la vapeur	232
4. Désacétylation dans une enceinte pressurisée.....	232
III. Les solvants eutectiques profonds (DES)	233
IV. Fonctionnalisation du chitosane	238
1. Agents de greffages.....	238

2. Propriétés des acides gras.....	239
3. Applications des chitosanes fonctionnalisés.....	242
V. Objectif de nos travaux.....	243
Partie B : Article, résultats et discussion.....	244
Article 4.....	244
Résultats.....	287
I. LI <i>versus</i> DES.....	287
II. Réaction de désacétylation.....	289
III. N-acylation des chitosanes de haute pureté	290
IV. Conclusion	291
Conclusion et perspectives	292
Conclusions.....	292
Perspectives	295
Références	297

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AL : Acide lactique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATG : Analyse thermogravimétrique

BLC : Biomasse lignocellulosique

CC : Chlorure de choline

COS : *Chitin oligosaccharides* ou oligosaccharides de chitine

CP-MAS ¹³C : *Cross Polarization Magic-Angle Spinning*

[C₂min][OAc] : 1-éthyl-3-méthylimidazolium acétate

DA : Degré d'acétylation

DCOS : *Deacetylated chitin oligosaccharides* ou Oligosaccharides de chitine désacétylés

DES : *Deep eutectic solvent* ou Solvant eutectique profond

DP : Degré de polymérisation

DRX : Diffraction aux rayons X

DTG_{max} : Dérivée de la variation de masse

GlcNAc : *N*-acétylglucosamine

GlcNAc₂ : *N,N'*-diacétylchitobiose

HPLC : chromatographie liquide haute performance

IL(s) : Liquide(s) ionique(s)

IC : Indice de cristallinité

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

MEB : Microscopie électronique à balayage

MM : Masse molaire

PM : Poids moléculaire

RMN : Spectroscopie à résonance magnétique nucléaire

SEC : Chromatographie d'exclusion stérique

MALLS : Multi-angle light scattering

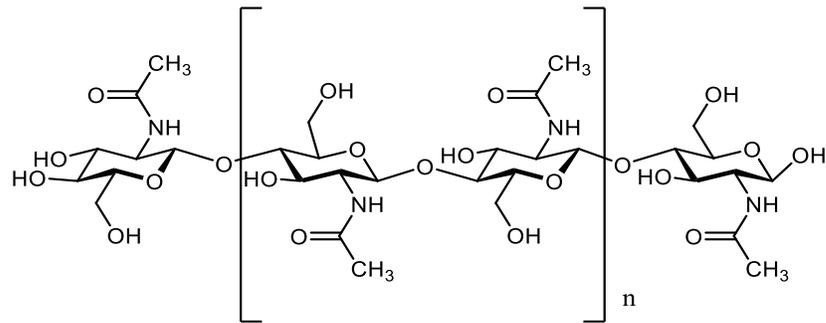
SG : *Streptomyces griseus*

TV : *Trichoderma viride*

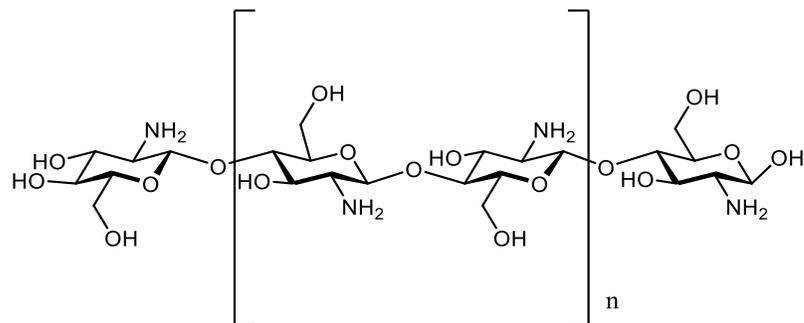
Introduction générale : Extraction et caractérisation de la chitine

I. La chitine

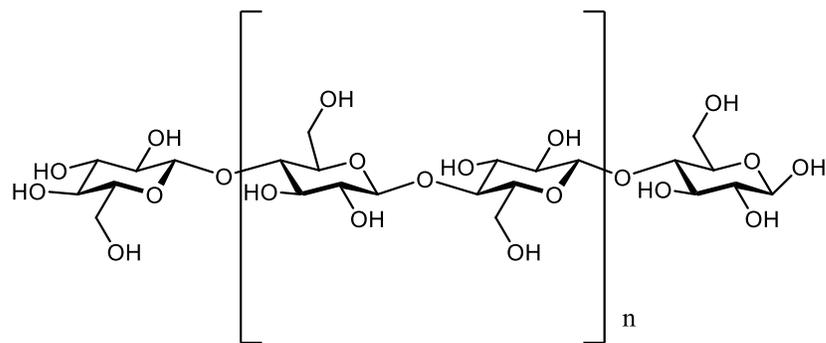
La chitine, second biopolymère le plus présent sur Terre après la cellulose, fut découverte en 1811 par Henri Braconnot dans la paroi des champignons. Elle se différencie de la cellulose par la présence d'un groupe fonctionnel *N*-acétyle en position 2. Elle est composée de la répétition du même motif saccharidique (la *N*-acétylglucosamine) reliés entre eux par des liaisons osidiques β 1-4 (Figure 1). Les motifs saccharidiques d'une chaîne de chitine sont majoritairement sous la forme acétylée. Toutefois, il est possible de trouver de manière aléatoire des motifs glucosamine au sein de cette chaîne. La chitine est présente dans les carapaces de crustacés, les cuticules d'insectes, dans la paroi des champignons (*Aspergillus nigers*, *Penicillium notatum*) et dans certains microorganismes comme les levures (*S. cerevisiae*, *C. albicans*). La chitine se retrouve également de façon plus mineure dans les plumes de calamar (Hamed, Özogul, and Regenstein 2016, Younes and Rinaudo 2015). Le chitosane, quant à lui, correspond à la forme désacétylée de la chitine, il est donc principalement constitué de motifs glucosamine.



Chitine



Chitosane



Cellulose

Figure 1 : Structures chimiques de la chitine, du chitosane et de la cellulose.

II. Aspect économique

À ce jour, la chitine provenant de l'industrie de la pêche est la seule chitine commercialisée à grande échelle. La production annuelle de ce biopolymère est difficilement quantifiable mais certaines données estiment qu'elle pourrait atteindre entre 10^{10} et 10^{11} tonnes de chitine par an uniquement pour l'écosystème marin qui est actuellement la ressource principale (Aunkham et al. 2018). Cependant, la grande majorité de cette chitine n'est pas exploitée, les déchets contenant ce polymère sont rejetés dans les mers et les océans et sont intégrés dans le cycle de vie d'organismes vivants. La chitine est donc plutôt un déchet provenant de l'industrie de la pêche et de l'agroalimentaire. D'autre part, des compagnies telles que *Heppe Medical Chitosan GmbH* en Allemagne ou *Chitolytic* au Canada se sont spécialisées dans la production de chitosane de très haute pureté.

Récemment, de nouvelles réglementations ont été mises en place pour l'alimentation animale et la farine d'insectes est maintenant autorisée comme nouvelle source d'alimentation (Novel Food Regulation (EU) 2015/2283). De ce fait, les élevages d'insectes ont commencé à se développer au niveau mondial. En France, les entreprises comme *Ynsect*, *Innovafeed* se sont spécialisées dans la production de larves de vers de farine et de larves de mouches du soldat noir. La compagnie *Alpha Chitin*, se positionne uniquement sur l'extraction et la valorisation de cuticules d'insectes pour la production de chitine et de chitosane. Le développement de cette nouvelle filière pourrait, à terme, permettre de produire de la chitine et du chitosane à des prix aussi concurrentiels que la filière pêche. Certaines entreprises se lancent également dans l'exploitation de chitine provenant de champignons. Ce type d'exploitation est toutefois difficilement rentable puisque bien que la quantité de chitine dans les parois des champignons peut être équivalente à celle des crustacés, son coût d'exploitation doit à ce jour être réduit et son extraction améliorée (Synowiecki and Ali Al-Khateeb 2010). En effet, la chitine de champignon, contrairement à celles provenant des crustacés et des insectes, n'est pas un sous-produit issu du procédé, mais le produit principal, son coût de production augmente donc inévitablement. La chitine est donc déjà présente sur le marché avec l'exploitation de carapaces de crustacés mais d'autres sources prometteuses provenant d'insectes et potentiellement de champignons commencent à faire leur apparition sur le marché.

III. Structure tridimensionnelle de la chitine

Les chaînes de polymères peuvent s'organiser entre elles de différentes façons. La structure supramoléculaire de la chitine est dictée par son réseau de liaisons hydrogène et peut s'agencer sous 3 formes cristallines en fonction des sources (Roy et al. 2017). La forme α est la forme la plus abondante et est présente en majorité dans les carapaces de crustacés et dans les cuticules d'insectes. Les chaînes constitutives de la chitine α sont antiparallèles (Figure 2). L'organisation du réseau de liaisons hydrogène, représentée dans la Figure 3, lui confère la particularité d'être la forme la plus cristalline des trois et donne donc une certaine rigidité aux carapaces de crustacés et aux cuticules d'insectes. La forme β est souvent présente dans les membranes des champignons qui sont bien plus flexibles. Cette forme est donc moins cristalline que la forme α en raison de la différence de l'agencement du réseau de liaisons hydrogène. Les chaînes de la forme β s'organisent entre elles de façon parallèle (Figure 2). La forme γ est beaucoup moins abondante puisqu'elle est présente dans de rares sources telles que la plume de calamar. Cette forme est très flexible et les chaînes s'organisent suivant un modèle de deux chaînes parallèles suivies d'une chaîne antiparallèle (Figure 2) (Pillai, Paul, and Sharma 2009; Jang et al. 2004). La cristallinité, le degré d'acétylation et le poids moléculaire sont des paramètres importants de la chitine puisque sa récalcitrance et son insolubilité dans les solvants aqueux ou organiques dépendent en grande partie de ceux-ci. Ceci n'est pas surprenant puisque la chitine est le polysaccharide responsable de l'intégrité structurale de l'exosquelette des crustacés et des insectes. Cette récalcitrance et cette insolubilité constituent un véritable verrou scientifique et technologique à sa valorisation à échelle industrielle.



Figure 2 : Arrangements des chaînes de polymères des formes cristallines α , β et γ .

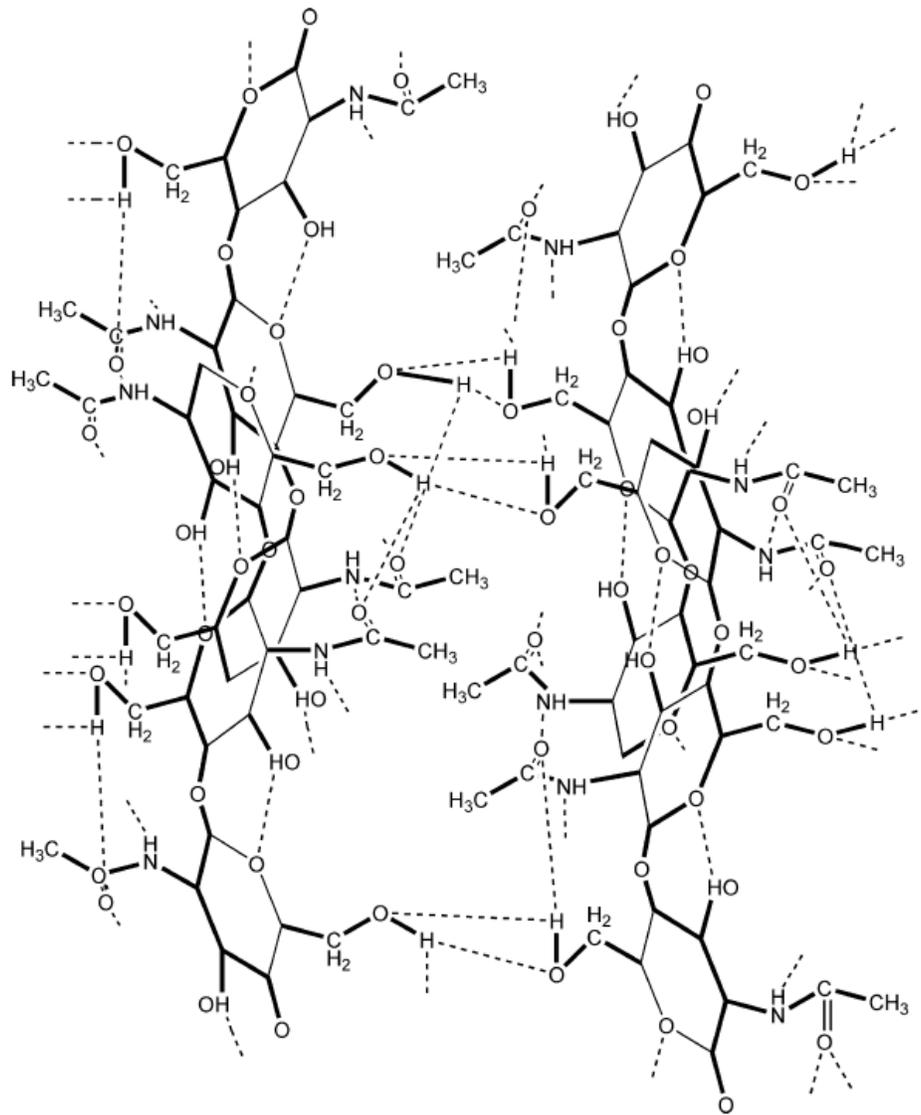


Figure 3 : Organisation du réseau des liaisons hydrogène de la chitine α (Pillai et al. 2009).

Grâce à cette organisation du réseau des liaisons hydrogène, il existe des zones plus ou moins ordonnées. Les zones extrêmement ordonnées sont appelées zones cristallines et les zones peu ordonnées sont appelées zones amorphes (Figure 4). C'est ce caractère semi-cristallin qui empêche la solubilisation en milieux aqueux et organique et qui limite les possibilités de fonctionnalisation chimique du polymère.



Figure 4 : Représentation schématique des zones cristallines et amorphes d'une fibre de chaînes de chitine.

IV. Sources de chitine

Comme évoqué précédemment, la chitine peut être extraite de différentes sources animales comme les carapaces de crustacés, les cuticules d'insectes et les plumes de calamar, ou de sources fongiques comme les parois membranaires des champignons (Hamed et al. 2016). Toutes ces biomasses chitineuses sont constituées de chitine, de protéines, de minéraux et de façon mineure, on trouve également de l'eau et des lipides. Quelques exceptions existent toutefois, dans le cas des champignons. Des glucanes peuvent être liés de manière covalente aux fibres de chitine et sont alors difficilement éliminables lors de l'extraction (Hassainia, Satha, and Boufi 2018). Le ratio entre les différents constituants varie en fonction de la source et pose d'énormes problèmes lors du traitement de ces biomasses. En effet, les biomasses provenant des carapaces de crustacés sont extrêmement riches en minéraux avec une teneur comprise entre 30% et 60% par rapport à la masse totale (Kaur and Dhillon 2015) alors que dans le cas des cuticules d'insectes, le pourcentage en minéraux est beaucoup plus faible (<6%) (Huet et al. 2020 ; Kaur and Dhillon 2015). Cette différence en minéraux entre ces deux sources se traduit par un pourcentage en chitine beaucoup plus élevé dans la biomasse d'insectes puisque par exemple 45% de la cuticule de *Bombyx eri* représente la teneur en chitine alors que celle chez les carapaces de crevettes est de l'ordre de 20% (Gael Huet et al. 2020). Cette faible teneur en minéraux peut amener à une extraction moins onéreuse et moins destructrice si cette dernière est adaptée à la source.

V. Extraction de la chitine

1. Extraction classique dite chimique

L'extraction classique de la chitine a été mise au point pour purifier une chitine provenant de crustacés. Cette dernière détient une haute teneur en minéraux par rapport à d'autres sources comme les champignons ou les insectes. Cette extraction est divisée en deux étapes essentielles et une facultative. Les deux premières étapes sont la déminéralisation en milieu acide et la déprotéinisation en milieu basique qui servent comme leurs noms l'indiquent, à éliminer les minéraux et les protéines de la biomasse chitineuse. La troisième étape, appelée blanchiment ou purification, se réalise en présence d'hypochlorite de sodium (NaClO) par exemple. L'objectif de cette dernière étape est principalement d'obtenir une poudre blanche plus facilement commercialisable. Cette extraction est transposable à d'autres biomasses chitineuses même si le ratio chitine/protéines/minéraux diffère.

L'extraction classique de la chitine n'est pas sans conséquence pour l'intégrité structurale du polymère. La déminéralisation correspond à un traitement acide utilisant généralement l'acide chlorhydrique (HCl) à une concentration de 1 M, à haute température (environ 100°C) pour une durée de 35 min. Cette étape a pour but d'éliminer le carbonate de calcium (CaCO₃) constituant majeur de la fraction minérale. Malgré un temps court, cette étape peut engendrer une dépolymérisation et réduire ainsi le poids moléculaire du polymère. De plus, les effluents acides générés lors de la neutralisation de cette étape devront être traités ce qui engendre un coût important du au traitement nécessaire pour dépolluer. Lors de l'étape de déprotéinisation, des bases fortes comme l'hydroxyde de sodium (NaOH) ou l'hydroxyde de potassium (KOH) à une concentration de 1 M sont également utilisées. Cette étape est mise en œuvre à haute température (entre 80 °C et 100 °C) et sur une durée relativement longue (jusqu'à 72 h) (c). Les bases utilisées vont hydrolyser les protéines qui seront ensuite éliminées lors des nombreux lavages successifs à l'eau. Cette étape donne également lieu à une dépolymérisation du polysaccharide et engendre un volume d'eau polluée très important (Kaur and Dhillon 2015). Une autre conséquence à prendre en compte lors de l'extraction est la désacétylation partielle aléatoire qui peut s'opérer (Kaur and Dhillon 2015). Celle-ci peut s'avérer être un problème pour les industriels qui se doivent de fournir des produits standardisés avec un poids moléculaire (PM)

et un degré d'acétylation (DA) identiques d'un lot à un autre (Kaur and Dhillon 2015). Par conséquent, de nouvelles techniques ont été étudiées en laboratoire pour rendre le procédé d'extraction plus écologique, durable, viable économiquement et moins invasif afin d'exploiter la chitine à son plein potentiel.

2. Extraction par activation aux micro-ondes

La technique d'extraction par activation aux micro-ondes a permis de fortement réduire la consommation énergétique de l'extraction en diminuant considérablement la durée de chacune des étapes. En effet, l'étape de déminéralisation par voie de chauffage classique a une durée d'environ 35 min et peut être réduite à seulement 8 min en conservant la même efficacité que la méthode classique (El Knidri et al. 2016). Il en est de même pour l'étape de déprotéinisation pour laquelle la durée a été réduite de 72 h à 8 min (El Knidri et al. 2016). De plus, cette technique pourrait être transposée à grande échelle puisque les équipements industriels existent déjà. Toutefois, cette méthode d'extraction ne peut être considérée comme verte car les quantités d'acides et de bases utilisées restent les mêmes et d'importantes quantités d'eau sont nécessaires lors des neutralisations.

3. Extraction par les liquides ioniques ou les solvants eutectiques profonds

De nouvelles techniques alternatives aux précédentes apparaissent, par exemple l'utilisation de liquides ioniques (LIs). Les liquides ioniques sont généralement des sels organiques avec des températures de fusion inférieures à 100 °C et sont non volatils ce qui peut s'avérer une caractéristique importante pour leur recyclage. Certains d'entre eux sont reconnus pour leur aptitude à solubiliser/solvater efficacement les biopolymères constitutifs de la biomasse lignocellulosique (cellulose, hémicellulose et lignine) (Yang et al. 2013; Auxenfans, Buchoux, Husson, et al. 2014; Auxenfans, Buchoux, Larcher, et al. 2014; Auxenfans, Husson, and Sarazin 2017; Husson et al. 2011) ou plus récemment la chitine (Julia L. Shamshina 2019). La capacité des liquides ioniques à solubiliser/solvater la chitine dépend en partie des paramètres Kamlet-Taft : le paramètre π représentant la polarité et la polarisabilité, le paramètre α représentant l'acidité du donneur d'hydrogène et le paramètre β représentant la basicité de l'accepteur d'hydrogène. La valeur du paramètre β est la valeur qui déterminera si un liquide ionique est assez basique pour pouvoir briser les liaisons hydrogène et solvater la chitine. le paramètre β doit être

supérieur à 0.5 (Julia L. Shamshina 2019, Waghorne 2020). Comme exposé précédemment, les LIs peuvent être recyclés et réutilisés, c'est pourquoi ils sont considérés comme des solvants verts bien que certains d'entre eux sont également toxiques. En effet, il existe certains points négatifs à leur utilisation comme leur potentiel éco-cytotoxicité, leur non biodégradabilité et leur coût important lié à la difficulté de les synthétiser et de les purifier (Shamshina 2019 ; Burrell et al. 2007). Cependant, certains LIs, comme $[\text{NH}_3\text{OH}][\text{OAc}]$, ont prouvé leur efficacité à solubiliser la chitine et extraire les minéraux et les protéines pour obtenir une chitine avec une pureté supérieure à 80 % (Shamshina et al. 2016).

Formules des paramètres Kamlet-Tafts :

$$E_T^N = \frac{ETN(30) - 30.7}{32.4}$$

$$\pi = \frac{v_{max} - v_0}{s}$$

$$\alpha = \frac{(ET(30) - 14,6(\pi - 0.23) - 30.31)}{16.5}$$

$$\beta = \frac{(1.035v(2)_{max} - v(1)_{max} + 2.64)}{2.8}$$

Où la polarité E_T^N normalisée est obtenue en mesurant le nombre d'onde correspondant à l'absorption maximale dans un solvant. $E_T(30)$ en kcal.mol^{-1} correspond à $28591/\lambda_{max}$ (nm). Ou λ_{max} est le nombre d'onde correspondant à l'absorption maximale. π est obtenue en mesurant le nombre d'onde correspondant à l'absorption maximale (v_{max} en kK (kilokeyser, 10^{-3} cm^{-1})) du colorant N,N-diéthyl-4-nitroaniline. De plus, $v_0 = 27,52 \text{ kK}$ et $S = -3,182$: où, v_0 est la valeur de régression pour un système de solvant de référence et S est la susceptibilité de l'intensité de l'absorption spectrale due au changement de dipolarité/polarisabilité du solvant. Le paramètre π^* fournit une mesure du rapport dipolarité/polarisabilité d'un solvant.

Le paramètre Kamlet-Taft β est obtenu en mesurant la différence relative de solvatochromisme entre la 4-nitroaniline $\nu(1)$ et la N,N-diéthyl-4-nitroaniline $\nu(2)$. (Lee, Ruckes, and Prausnitz 2008)

Les solvants eutectiques profonds (DES) sont synthétisés à partir d'au moins deux composés pouvant être liquides ou solides. Selon les proportions (point eutectique) et la température, ces mélanges de composés vont fusionner pour former un liquide appelé DES, qui restera sous forme liquide même après refroidissement. Les composés utilisés pour la synthèse des DES peuvent être de différentes natures mais sont toujours constitués d'un donneur et d'un accepteur de liaisons hydrogène. Ils représentent une alternative potentielle aux LIs puisqu'ils partagent des caractéristiques similaires comme la capacité à solubiliser des composés qui le sont difficilement en milieu aqueux ou organique. Ils sont aussi beaucoup plus faciles à synthétiser, beaucoup moins dangereux et moins toxiques pour l'environnement et pour les êtres vivants. Les composés utilisés pour la synthèse des DES sont souvent des métabolites primaires comme les acides aminés, des acides organiques, des sucres ou encore des dérivés de la choline (Paiva et al. 2014). Les DES pourraient donc avoir un potentiel plus important que les liquides ioniques puisqu'ils comblent les faiblesses de ces derniers. Plusieurs DES, synthétisés à partir de chlorure de choline, sont reconnus pour leur aptitude à déminéraliser et déprotéiniser la biomasse chitineuse avec une efficacité comparable à la voie chimique classique (Zhu et al. 2017).

Les LIs et les DES utilisés dans les prétraitements des biomasses seront d'avantages décrits dans les chapitres 1 et 3 de ce manuscrit.

4. Extraction biologique

L'extraction biologique est très intéressante puisqu'elle consiste à utiliser des enzymes ou directement des microorganismes pour éliminer les protéines et les minéraux de la biomasse. Le but de cette technique est de reproduire la déconstruction des protéines effectuée dans la nature par les microorganismes. Les extractions biologiques ont un faible impact sur l'environnement, elles sont également peu dangereuses et actuellement, l'utilisation de microorganismes est extrêmement bien maîtrisée par l'industrie (Kubicek and Rohr 2011.; Pilkington et al. 1998). De plus, les enzymes protéolytiques (protéases) utilisées dans ce type d'extraction ont pour

avantage d'être utilisées en milieu aqueux et d'être réutilisables plusieurs fois si elles ont été, au préalable, immobilisées sur support. Il est tout de même important de souligner que l'utilisation d'enzymes présente certaines limitations. En effet, les enzymes parviendront à hydrolyser les protéines mais n'auront pas d'impact sur les minéraux. Il sera donc nécessaire d'effectuer, au préalable, une déminéralisation par voie chimique si l'on souhaite obtenir une chitine de haute pureté.

Dans le cas des extractions utilisant des microorganismes, les microorganismes utilisés produisent naturellement de l'acide (lactique, citrique ou acétique) et par conséquent, la déminéralisation de la biomasse pourra avoir lieu. En effet, l'acide lactique libéré va réagir avec le carbonate de calcium pour produire du lactate de calcium qui précipitera et pourra être retiré du bioréacteur. De plus, l'acide lactique réduit le pH du milieu réactionnel, minimisant ainsi les contaminations indésirables de microorganismes dans le réacteur. Cependant, pour assurer une croissance microbienne optimale, une source de carbone et plus généralement du glucose, devra être rajoutée pendant la culture pour permettre à la fermentation de se poursuivre. En parallèle, la baisse du pH engendré par les bactéries activera les enzymes responsables de la déprotéinisation. Ces enzymes protéolytiques libérées se combinent aussi aux protéases résiduelles du tube digestif des crustacés et des protéases présentes naturellement dans la biomasse composée de carapaces. Ces fermentations peuvent aussi être réalisées en co-cultures puisque certaines souches s'entraideront en libérant certains métabolites qui seront utilisés par d'autres souches. Une synergie s'organise donc et permet de rendre le procédé plus efficace (Castro, Guerrero-Legarreta, and Bórquez 2018, Kaur and Dhillon 2015). La source de carbone (glucose) est souvent le paramètre principal du coût d'une fermentation. Toutefois, la co-culture rend la fermentation très efficace et peu onéreuse puisqu'une quantité de glucose moins importante est nécessaire pour faire perdurer la fermentation. Les désavantages de cette technique sont la durée et la pureté du produit final qui n'est pas aussi élevée que celle obtenue par une extraction chimique. Bien qu'ayant les capacités à être développée au niveau industriel, puisque déjà fortement démocratisée dans de nombreux domaines comme la brasserie (Pilkington et al. 1998) ou la production d'acide citrique (Kubicek and Rohr 2011), cette technique est encore très récente et peu connue pour une application liée à l'extraction de la chitine.

Tableau 2 : Techniques d'extractions

Techniques d'extractions	Caractéristique	Références
Chimique	Efficace mais polluante	Kaur and Dhillon 2015
Assisté par micro-onde	Courte et efficace mais polluante	El Knidri et al. 2016
Liquide ionique et DES	Plus respectueuse de l'environnement. Moins efficace	Shamshina, Barber, Gurau, Griggs, and R. D. Rogers 2016 Zhu et al. 2017
Microbiologique	Respectueuse de l'environnement. Encore peu de recul	Kubicek and Rohr 2011 Castro, Guerrero-Legarreta, and Bórquez 2018

VI. Techniques de caractérisation de la chitine

La chitine est un polymère caractérisé par plusieurs paramètres comme son poids moléculaire (PM), son degré d'acétylation (DA) et son indice de cristallinité (IC). De plus, la présence au sein des fibres, de protéines, de minéraux, d'eau et de lipides peut diminuer la pureté de celle-ci. Une grande variété de paramètres est à prendre en considération pour évaluer la qualité de cette dernière. Les caractéristiques physico-chimiques, propres à chaque chitine extraite, permettront de choisir le domaine d'application le plus adéquat pour celle-ci.

Chaque technique de caractérisation nous permettra d'obtenir des informations plus ou moins précises. Il est donc important de sélectionner les méthodes les plus fiables.

Les différentes techniques actuellement à disposition sont :

- La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)
- La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN)
- La diffraction aux rayons X (DRX)
- L'analyse thermogravimétrique (ATG)
- La mesure de la viscosité
- La détermination du pourcentage d'azote selon la méthode « Kjeldahl »
- Les analyses élémentaires
- La microscopie électronique

Selon la technique utilisée, nous obtiendrons des informations qualitatives et/ou quantitatives.

1. Détermination de la pureté de la chitine

La pureté d'une biomasse de chitine peut décliner en présence des minéraux, des protéines et les lipides résiduels. Pour déterminer la pureté de la chitine, il sera indispensable de connaître le pourcentage de chacun de ces composés présents dans la biomasse. Si les étapes d'extraction sont efficaces et correctement effectuées, seule la chitine demeurera.

L'IRTF permet d'obtenir des informations qualitatives sur la pureté d'une biomasse de chitine, de déterminer la présence de groupes fonctionnels propres aux molécules organiques présentes dans cette biomasse et aussi d'obtenir une information précise sur la forme cristalline de la chitine. Le principe repose sur les interactions entre la matière et la lumière. Lorsqu'un échantillon est soumis à un rayonnement dans le domaine de l'infrarouge (700nm à 0.1mm). La diminution de l'intensité du rayonnement qui traverse ce dernier est alors mesurée en fonction du nombre d'onde allant généralement de 500 cm^{-1} à 7000 cm^{-1} . Les bandes spécifiques au polymère de chitine sont répertoriées dans le Tableau 1 et, à titre d'exemple, le spectre de la chitine commerciale pure à 99 % est également présenté Figure 5.

Tableau 1 : Bandes infra-rouge caractéristiques de la chitine pure (Le Roux 2012).

Classes et attributions	Nombre d'onde (cm ⁻¹)
Déformation dans le plan, OH du groupement hydroxyle	3450
Élongation, NH du groupement amide	3360
Élongation, CH ₂ (symétrique et asymétrique) du cycle pyranose	2920, 2880, 1420, 1275, 1245
Élongation, C=O du groupement amide (I)	1655
Déformation dans le plan, NH du groupement amide	1560
Déformation dans le plan, NH ₂ de groupement amine	1590
Déformations dans le plan, OH et CH du cycle	1415, 1320
Déformation dans le plan, CH ₃ du groupement amide	1380
Déformation dans le plan, Groupe C-O	1255
Élongation, -C-O-C- de la liaison glycosidique	1150-1040

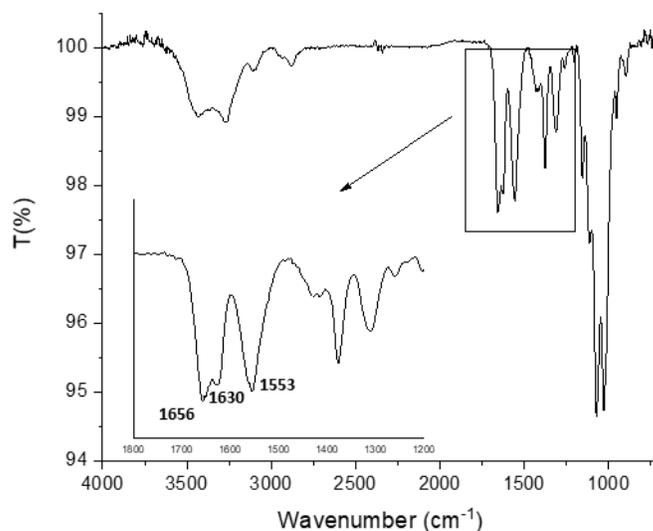


Figure 5 : Spectre IRTF de la chitine commerciale obtenu par la méthode de réflectance totale atténuée (ATR) (support germanium).

Le spectre IR ci-dessus est caractéristique d'une chitine pure à 99 %. Toutefois, dans le cas de chitine contenant des impuretés, la spectroscopie infrarouge est un atout indispensable, permettant d'obtenir de nombreuses informations sur les types d'impuretés. En effet, les protéines sont caractérisées par des liaisons peptidiques qui augmentent fortement l'intensité des bandes des C=O et NH observées à 1656 cm^{-1} et 1553 cm^{-1} respectivement. Lorsque la teneur en protéines devient trop importante, l'intensité de ces deux bandes augmente fortement. Le carbonate de calcium peut être identifié par une bande de vibration située au même endroit que les liaisons glycosidiques -C-O-C- entre 1150 cm^{-1} et 1040 cm^{-1} . Les deux bandes peuvent se superposer si elles sont présentes en même temps. Il en est de même pour l'eau résiduelle dont les liaisons OH sont caractérisées par une bande à 3450 cm^{-1} qui peut se superposer avec celle correspondant aux groupements hydroxyles de la chitine. La présence de lipides se traduira par la présence de nouvelles bandes sur le spectre à 2930 cm^{-1} et 2855 cm^{-1} assignées aux CH_2 des chaînes alkyles des lipides. Il est tout de même nécessaire de coupler la spectroscopie IR à d'autres techniques de caractérisation pour fournir des informations quantitatives concernant les impuretés.

L'analyse thermogravimétrique est une technique permettant d'obtenir une information sur la stabilité thermique d'une molécule ou d'un polymère. Dans le cas des biomasses de chitine, cette technique permet également de déterminer précisément la teneur en eau et en minéraux. Le principe consiste à incinérer sous argon un échantillon en augmentant progressivement la température au cours du temps. L'analyse thermogravimétrique de la chitine commerciale est représentée Figure 6. L'eau résiduelle correspond à la première perte de masse observée. Elle a lieu dès le début de la mesure jusqu'aux alentours de 100 °C . La seconde perte de masse, observée entre 250 °C et 400 °C , est liée à la dégradation des motifs saccharidiques s'initiant par les fonctions amides et les liaisons osidiques (Moussout et al. 2016). La rapidité avec laquelle se dégrade le polymère sous l'effet de la température ne semble pas dépendre du poids moléculaire mais de la forme cristalline et de la taille des agglomérats de chitine. La chitine α sera donc thermiquement plus résistante que la chitine β . Cela est lié à la forme cristallographique des cristaux, elle-même liée aux réseaux de liaisons hydrogène, à la taille des cristaux ainsi qu'à leur pureté (Stawski et al. 2008). Lorsque le reste de l'échantillon est ensuite consommé sous

atmosphère d'air pendant 30 minutes à 800 °C, la masse restante correspond uniquement aux minéraux initialement présents dans l'échantillon.

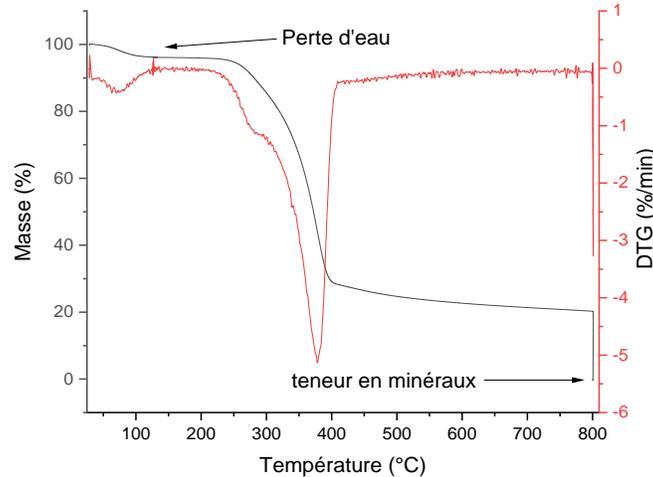
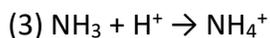
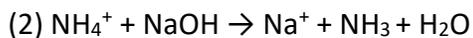


Figure 6 : Analyse thermogravimétrique de la chitine commerciale (crevette).

La méthode « Kjeldahl » est une technique permettant de déterminer le pourcentage total d'azote d'un échantillon et donc le taux de protéines. Le principe consiste à réduire, dans un premier temps, la totalité de l'azote de la biomasse en sel d'ammonium (NH_4^+) en présence d'acide sulfurique. Cette première étape est appelée la minéralisation (1). Elle est ensuite suivie de la distillation où l'ammonium en présence de soude caustique conduira à l'ammoniac (2):



La dernière étape est un simple titrage colorimétrique entre HCl et NH_3 pour redonner NH_4^+ (3). La quantité de HCl utilisée pour titrer la solution est équivalente à la quantité d'azote présent dans la biomasse initiale (Bradstreet 1954).

Cependant, pour déterminer le pourcentage de protéines de l'échantillon, des corrections sont à prendre en compte puisque la chitine, à l'état naturel, contient aussi de l'azote dans sa structure chimique. Cette détermination du pourcentage de protéines (P) doit aussi prendre en

compte la teneur en minéraux (I), en eau (W) et en lipides (L) avec la formule suivante (Díaz-Rojas et al. 2006) :

$$P = \frac{(Nt \times Cq + K - 100) \times Cp}{Cq - Cp}$$

Il est également possible de déterminer le pourcentage de chitine (Q) présent dans l'échantillon en utilisant la formule ci-dessous :

$$Q = \frac{(Nt \times Cp + K - 100) \times Cq}{Cp - Cq}$$

Avec :

Nt, le taux d'azote total de la biomasse.

K = I + L + W, la somme des pourcentages des composés non-azotés comme l'eau (**W**), les minéraux (**I**), et les lipides (**L**).

$$Cp = 6.25$$

$$Cq = \frac{(GlcNAc - GlcN) \times FA + GlcN}{N}$$

Cp et **Cq** sont des coefficients de conversion d'azote dans les protéines et dans la chitine respectivement. **N** représente la masse molaire d'un atome d'azote. **FA** est la fraction de sous unité saccharidiques acétylés.

$$GlcNAc = \frac{221.21 \times n - 18.02 \times (n-1)}{n}$$

$$GlcN = \frac{179.1724 \times n - 18.02 \times (n-1)}{n}$$

GlcNAc (N-acétylglucosamine) et **GlcN** (Glucosamine) représentent les masses molaires théoriques d'une unité saccharidique acétylée et non-acétylée du polymère de chitine répétée « n » fois et pouvant tendre vers l'infini.

2. Détermination du degré d'acétylation (DA)

Le degré d'acétylation (DA) de la chitine correspond au pourcentage d'unités acétylées par rapport au nombre d'unités totales et peut être déterminé par différentes méthodes (titrage

par une base forte, spectroscopie IR, RMN...). Les deux méthodes décrites ci-dessous sont les plus largement reportées dans la littérature :

-La spectroscopie IRTF peut servir à déterminer le degré d'acétylation (DA) puisque les bandes à 1655 cm^{-1} et 1560 cm^{-1} sont caractéristiques des liaisons C=O et N-H des groupements amide et la bande à 1560 cm^{-1} peut se déplacer vers 1590 cm^{-1} lorsque la chitine est désacétylée. Le DA est donc souvent calculé en utilisant les deux formules suivantes :

$$(1) \text{ DA} = (A_{1655}/A_{3450}) \times 100/1.33 \text{ (Moore et al. 1980)}$$

$$(2) \text{ DA} = (A_{1655}/A_{3450}) \times 115 \text{ (Duarte et al. 2002)}$$

Pour être en mesure d'utiliser ces formules, il faut au préalable s'assurer d'avoir utilisé la bonne méthode et effectué le bon traitement sur les spectres infrarouges, notamment la correction de la ligne de base. Cependant, ces calculs dépendent de l'intensité de la bande à 3450 cm^{-1} qui correspond aux groupements OH. Or, une chitine contenant trop d'eau résiduelle faussera le résultat. De plus, les intensités des bandes correspondantes aux groupements C=O et NH des fonctions amides peuvent aussi fausser les résultats s'il y a présence de protéines. Cette technique de calcul par IRTF ne sera donc pas utilisée car les données obtenues ne sont pas reproductibles (Kasaai 2008, Duarte et al. 2002, Kumirska et al. 2010).

La RMN des solides (CP-MAS ^{13}C : Cross Polarization Magic-Angle Spinning) est une autre technique employée pour la détermination du DA. Le principe de cette technique est de soumettre un échantillon à un champ magnétique pour faire entrer les noyaux en résonance. Le principe de calcul du DA à partir d'un spectre carbone consiste à intégrer les pics des 6 carbones du noyau saccharidique et de comparer cette valeur à celle correspondante à l'intégration du pic des CH_3 du groupement acétyle de la fonction amide (Figure 7). Cette méthode est valable et précise pour la RMN du ^{13}C (Heux et al. 2000, Saidi 2017).

$$(3) \text{ DA} = \frac{I_{\text{CH}_3}}{(I_{\text{C}1} + I_{\text{C}2} + I_{\text{C}3} + I_{\text{C}4} + I_{\text{C}5} + I_{\text{C}6})/6} \times 100$$

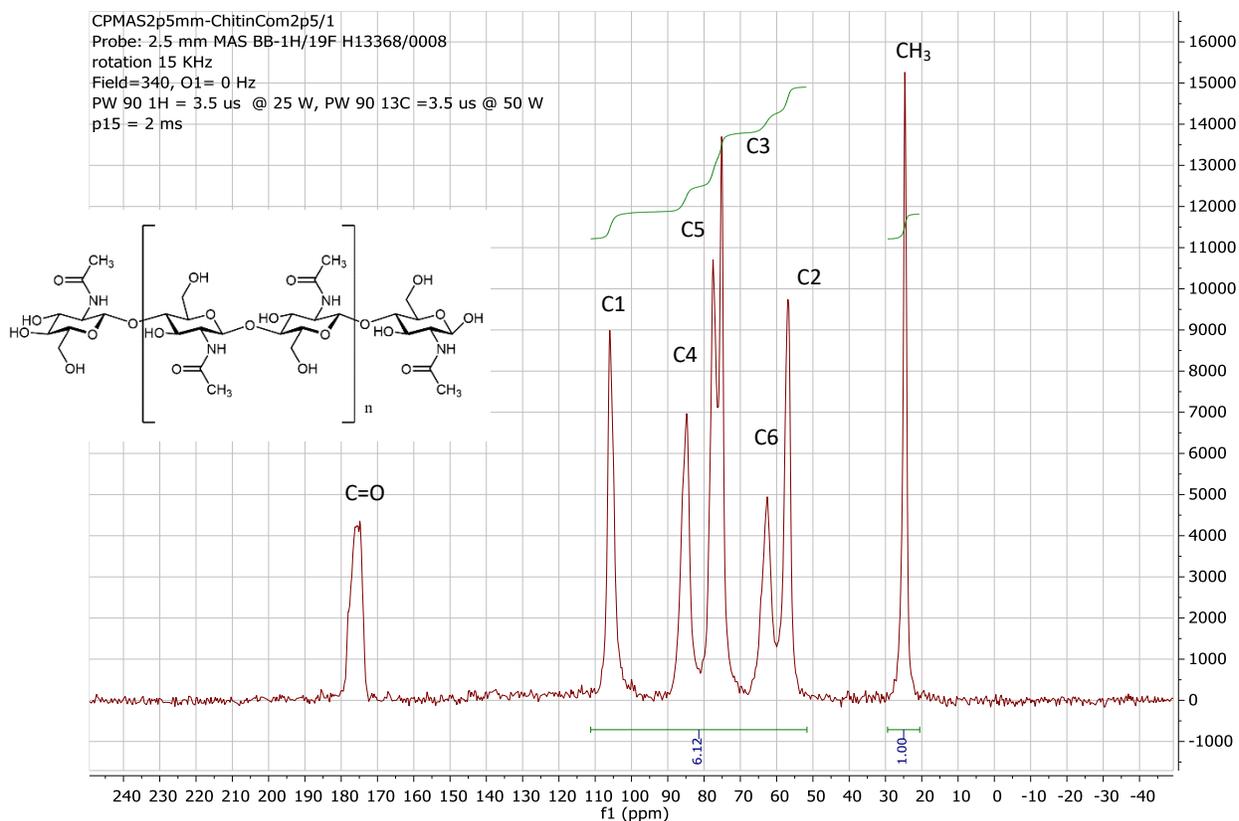


Figure 7 : Spectre ^{13}C CP-MAS de la chitine commerciale (crevette).

L'intégration du spectre RMN de la chitine commerciale Figure 7 peut donc nous permettre de calculer le DA. L'intégration des pics liés aux carbones du noyau saccharidique nous donne une aire de 6.12 contre 1 pour le pic représentant le groupement CH_3 de la fonction amide. À partir de la formule (3), on obtient :

$$\text{DA} = \frac{1}{6.12/6} * 100 = 98\%$$

Il est important d'ajouter que cette méthode possède une incertitude de $\pm 5\%$.

3. Détermination de la forme cristalline

La spectroscopie infrarouge (FTIR) permet de différencier les trois formes polymorphes α , β et γ de la chitine. Le spectre de la chitine α présente deux bandes à 1660 cm^{-1} et 1630 cm^{-1} , contre une seule bande à 1630 cm^{-1} pour la chitine β (Kumirska et al. 2010). Certaines bandes seront déplacées comme celle à 890 cm^{-1} pour la chitine β qui migrera à 895 cm^{-1} pour la chitine α . Il existe respectivement deux bandes supplémentaires pour la chitine β , à 1455 cm^{-1} et 1374

cm⁻¹. Ces deux bandes sont caractéristiques des déformations CH, CH₂ et CH₃ que la structure parallèle engendre (Le Roux 2012). Il est difficile de tirer des informations sur la chitine γ à partir d'un spectre FTIR puisqu'il combinera les caractéristiques des formes α et β . Cela est sûrement lié à la nature hybride de la forme γ qui comporte à la fois des chaînes parallèles et antiparallèles.

4. Détermination de l'indice de cristallinité (IC)

L'indice de cristallinité peut être obtenu par RMN selon une méthode CP-MAS ou par diffraction aux rayons X (DRX). Dans le cadre de cette thèse, nous avons opté pour la méthode par DRX en raison des contraintes de matériel et de temps. Le principe consiste à envoyer des rayons X sur une matière cristalline qui diffractera les rayons selon des angles précis caractéristiques de la nature de celle-ci. Plus la matière est ordonnée, plus l'intensité des rayons diffractés sera importante. La DRX permet d'identifier la nature des composants inorganiques mais peut aussi servir à déterminer l'indice de cristallinité des polymères organiques comme la cellulose ou la chitine (Kasaai 2008). Plus l'intensité des rayons X diffractés sera importante, plus le polymère sera cristallin. La cristallinité de la chitine peut être calculée avec l'équation suivante :

$$(4) IC = \frac{I_{max} - I_{am}}{I_{max}} \times 100$$

Où I_{max} est l'intensité maximale qui se trouve aux alentours de 20° et I_{am} représente l'intensité des zones amorphes du polymère qui se trouvent à 16° pour la chitine (Figure 8). Cette équation reflète une différence d'intensité entre des zones amorphes et des zones cristallines. Le carbonate de calcium, qui compose la grande majorité des minéraux présents dans la chitine, peut aussi être visualisé par cette méthode et donner une idée de la pureté d'une chitine. Les pics caractéristiques, pouvant démontrer la présence de carbonate de calcium, sont situés à 30°, 39° et 47° mais constituent un ensemble de pics mineurs.

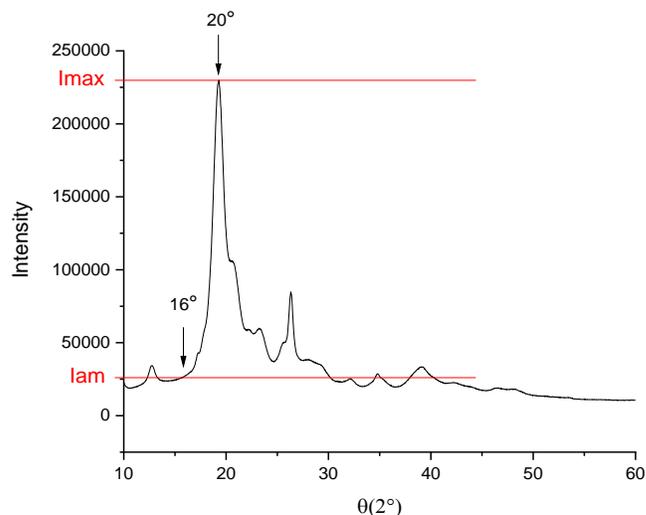


Figure 8 : Diffractogramme de la chitine commerciale.

Dans le cas de la chitine présentée Figure 8, en utilisant l'équation (4), le calcul de l'IC donne :

$$IC = (229924 - 27268) / 229924 = 88 \%$$

5. Détermination du poids moléculaire (PM)

Le poids moléculaire peut être déterminé par une mesure de viscosité du polymère dans un solvant ayant la capacité de solubiliser la chitine. Cette mesure est faite à l'aide d'un viscosimètre à capillaire. Il est important de souligner que cette méthode est surtout utilisée pour la détermination du poids moléculaire du chitosane. En effet, il est nécessaire d'avoir un échantillon parfaitement soluble ce qui est difficile à obtenir dans le cas de la chitine. Des études récentes ont également utilisé les liquides ioniques comme solvant de solubilisation de la chitine pour déterminer le poids moléculaire.

Le poids moléculaire est relié à la viscosité intrinsèque avec la formule de Mark-Houwink-Sakurada (Einbu 2007, Berat et al. 2013) :

$$[\eta] = K \times M^\alpha$$

Où η représente la viscosité intrinsèque en cm^3/g . K et α sont des constantes liées au solvant utilisé pour solubiliser le polymère. Elles peuvent être trouvées dans la littérature ou déterminées. Cependant, le viscosimètre ne permet pas directement de déterminer la viscosité intrinsèque mais la viscosité relative qui a pour équation :

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$$

Avec η_{rel} correspondant à la viscosité relative, t_0 le temps de rétention du solvant utilisé à l'état pur et t le temps de rétention du solvant ayant solubilisé le polymère, nous pouvons ainsi calculer la viscosité spécifique (η_{spe}) :

$$\eta_{spe} = \eta_{rel} - 1$$

Cependant, la viscosité du solvant dépend aussi de la quantité de chitine solubilisée et elle doit donc être reliée à la concentration par l'équation suivante intégrant la viscosité réduite (η_{red}) :

$$\eta_{red} = \eta_{spe}/C$$

La viscosité réduite donne donc une fonction dépendante de la concentration et peut nous permettre de déterminer la viscosité intrinsèque lorsque la concentration du polymère tend vers 0.

Finalement, le poids moléculaire peut être réduit à l'équation suivante :

$$M = ([\eta]/K) * (1/\alpha)$$

6. Détermination des propriétés morphologiques et texturales de la chitine

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique capable de produire des images à haute résolution de la surface de nos échantillons de chitine en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Il sera alors possible d'observer l'assemblage des fibres entre elles ou encore la taille des agrégats lorsque la chitine a été réduite en poudre. Les images obtenues révéleront des changements structuraux après une modification chimique (fonctionnalisation ou désacétylation). Elle sera également très utilisée dans le cadre de cette thèse pour comprendre l'impact du prétraitement sur la structure de la chitine à l'échelle microscopique.

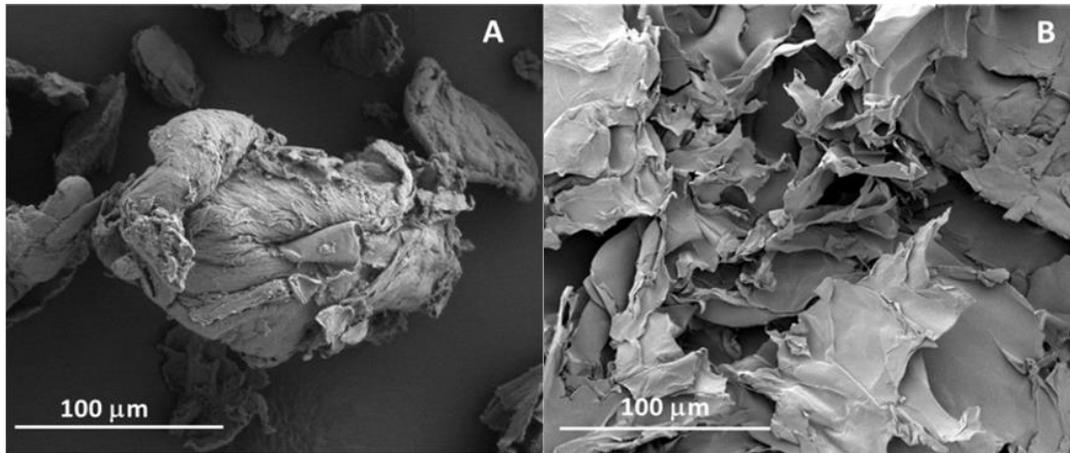


Figure 9 : Clichés MEB de la chitine commerciale (crevette) non traitée (gauche) et prétraitée au $[C_2min][OAc]$ (droite), (échelle 100µm).

Selon la pureté de la chitine et ses autres propriétés physico-chimiques (taille, solubilité, indice de cristallinité et DA), il sera alors possible de déterminer son application la plus adéquate.

VII. Applications de la chitine et de ces dérivés

Cette partie résume les applications les plus courantes que l'on trouve dans la littérature, à la fois pour la chitine, la chitine fonctionnalisée ou encore son dérivé désacétylé, le chitosane.

Étant biodégradable, biocompatible et biosourcée, la chitine peut être utilisée dans différents domaines. Son insolubilité, dans la presque totalité des solvants organiques et aqueux, lui permet d'être un bon support. En effet, la chitine a été utilisée dans le domaine médical en servant de support à des principes actifs magnétiques. Des nanoparticules de chitine carboxyméthylée ont ainsi démontré leur capacité à libérer un principe actif à pH 6.8, tout en montrant des propriétés antibactériennes. De plus, ces nanoparticules n'ont montré aucun effet cytotoxique lors de tests *in vivo* réalisés sur des souris. L'aspect magnétique de ces nanoparticules encapsulées pourrait permettre de les suivre à travers le corps mais d'autres études restent néanmoins à réaliser. L'encapsulation de principes actifs par de telles nanoparticules semble donc être des plus prometteuses (Dev et al. 2010).

La chitine peut aussi servir à immobiliser des enzymes ce qui peut les rendre réutilisables (Kilin et al. 2006). Ces immobilisations peuvent se faire aussi bien par adsorption, par liaison covalente en position C6 ou par réticulation (Verma et al. 2020). Une lipase pancréatique porcine a ainsi été greffée ou adsorbée sur de la chitine ou du chitosane, réduisant son activité mais augmentant les possibilités de réutilisation (Kilinc et al. 2006).

Les applications liées à la chitine sont donc fortement limitées au rôle de support en raison de sa récalcitrance et son insolubilité. À contrario, son dérivé désacétylé (le chitosane) soluble en milieux aqueux acide ou encore les nanocristaux/nanofibres de chitine dispersés dans l'eau ouvrent la voie à de nombreuses autres applications. Les nanocristaux de chitine ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique puisque contrairement à la chitine, ils forment une dispersion stable en milieu aqueux. En raison de leur propriétés mécaniques intéressantes, ils peuvent renforcer des matrices telles que les os (Pangon et al. 2016). Ces cristaux ont également la capacité de traverser les membranes par effet de friction (effet Yoshida) (Yoshida et al. 2001). *E.coli* a été ainsi modifiée génétiquement en intégrant un plasmide adsorbé sur des nanocristaux de chitine (Mendes et al. 2015).

La chitine est définie comme chitosane à partir du moment où 50% de ses sous-unités saccharidiques sont désacétylées. Le chitosane détient de nombreux avantages par rapport à la chitine puisque si la fonction amine est protonée, ce dernier sera soluble. Le chitosane est donc soluble en milieu aqueux acide et cette propriété conduit à de nombreuses applications par rapport à la chitine et notamment dans les domaines où la formation de films ou gels plus ou moins visqueux est requise. En plus de sa solubilisation possible, le chitosane possède des propriétés biologiques (antibactériennes, antifongiques) le plus souvent supérieures à celles de la chitine. Ces propriétés combinées permettent au chitosane de trouver sa place sur le marché de l'agroalimentaire comme agent gélifiant, dans les films protecteurs et conservateurs en raison également de ses propriétés antioxydantes (Elsabee and Abdou 2013, Luo and Wang 2013). L'encapsulation de nutriments ou de probiotiques peut aussi être réalisée avec le chitosane qui les protégera de l'acide gastrique et améliorera l'absorption de composés par l'intestin ou leur transfert dans ce dernier (Luo and Wang 2013).

Le chitosane peut aussi être employé en tant qu'excipient de substance active. L'encapsulation de l'insuline par des micelles formées avec du chitosane et du tripolyphosphate permet d'augmenter la biodisponibilité et l'absorption de l'insuline par l'intestin (Pan et al. 2002 ; Elgadir et al. 2015). Le chitosane est aussi connu pour ses propriétés régénératrices. Les films obtenus peuvent améliorer la cicatrisation de blessures ou de brûlures en prévenant de potentielles infections par l'oxygénation des plaies alliées à ses propriétés de régénération (Altiok, Altiok, and Tihminlioglu 2010, Dai, Tanaka, and Huang 2011).

Le chitosane est aussi reconnu comme dépolluant des sols et des eaux. C'est un bioadsorbant grâce à sa fonction amine qui peut chélater et dépolluer les métaux lourds lorsque celui-ci est supporté. Des nanoparticules $Zr_{0.52}Al_{0.48}OOH$ ont été greffées au chitosane ce qui permet d'adsorber AsO_3^{3-} et F^- , deux polluants majeurs (Prabhu and Sasaki 2017 ; Wang and Chen 2014). Ce biopolymère est également un bon support à d'autres composés comme des catalyseurs. En effet, Chandan Bodhak et al. ont adsorbé sur le chitosane, du cuivre II qui catalyse la réaction entre des arylhalides et des diamines/aminoalcools aliphatiques (Bodhak, Kundu, and Pramanik 2015).

Enfin, le stockage d'énergie est aussi une application possible pour le chitosane puisque les batteries ont besoin d'une membrane proton conducteur qui sépare l'anode de la cathode. Ces membranes sont coûteuses et nécessitent d'être proton conductrices, d'être chimiquement et mécaniquement stables et durables sous l'effet de la chaleur et de l'humidité. Des membranes à base de chitosane pourraient représenter une alternative plus écologique, et plus économique aux membranes actuellement utilisées dans les piles à combustibles qui fonctionnent avec un certain types d'électrolytes, appelés « *hydrogen-polymer electrolyte* » et considérés comme extrêmement onéreuses (Ma and Sahai 2013).

Les paramètres physico-chimiques de la chitine et de ses dérivés sont des paramètres primordiaux dans le choix des applications. Ils dépendront fortement de la biomasse de chitine utilisée et de la méthode d'extraction. De plus, nous avons souligné dans cette introduction générale que l'extraction de la chitine et sa transformation ont un coût important et un impact néfaste sur l'environnement. Il est alors important de trouver des solutions pour obtenir une chitine de haute qualité en réduisant le coût d'extraction permettant ainsi une meilleure valorisation de cette dernière.

Tableau 3 : Applications de la chitine et de ces dérivés

Domaine	Produit	Application	Référence
Catalyse	Chitine	Support	Kilinç et al. 2006
Médical	Chitosane	Film régénérateur	Altiok, Altiok, and Tihminlioglu 2010
Médical	Chitosane	Vectorisation	Dev et al. 2010
Dépollution	Chitosane	Complexation de métaux	Bodhak, Kundu, and Pramanik 2015
Agroalimentaire	Chitosane	Film antimicrobien	Elsabee and Abdou 2013
Stockage d'énergie	Chitosane	Membrane	Ma and Sahai 2013

VIII. Préambule - Objectifs

La chitine est un biopolymère à haut potentiel qui pourrait au même titre que la cellulose jouer un rôle bien plus important grâce à sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa non-toxicité. Le nombre des applications possibles pour la chitine est très élevé mais son exploitation à grande échelle ne s'est pas démocratisée en raison de son extraction coûteuse d'un point de vue financier et environnemental. La chitine commercialisée à ce jour est extraite de carapaces de crustacés, riches en minéraux. Dans le but de minimiser le coût de l'extraction et la pollution engendrée par celle-ci, nous avons opté pour d'autres sources de chitine. Les cuticules d'insectes contiennent peu de minéraux. Elles sont de ce fait beaucoup plus flexibles que les carapaces de crevettes. La première partie des travaux de cette thèse portera sur la valorisation de cette source, notamment les cuticules issues de larves de *Bombyx eri* contenant moins de 2% de minéraux. Nous montrerons qu'il est alors possible de s'affranchir de l'étape de déminéralisation. De plus, ce faible pourcentage en minéraux implique une plus haute teneur en chitine par rapport aux sources issues de crustacés et donc des rendements d'extraction plus élevés.

Le caractère récalcitrant de la chitine, rendant impossible sa solubilisation dans les solvants organiques classiques, est aussi un facteur à prendre en compte lors de sa valorisation en oligosaccharides. Le laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire (GEC, UPJV) possédant une forte expertise dans l'utilisation des liquides ioniques pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique, nous a été d'un grand support dans le cadre de nos travaux. Une partie de ce manuscrit sera dédiée à optimiser la méthodologie mise au point par le GEC aux biomasses chitineuses. Pour cela, plusieurs voies de prétraitement aux LI seront présentées et l'impact des prétraitements sur les rendements des hydrolyses enzymatiques sera également étudié. Lors de cette étude, nous comparerons les rendements en COS obtenus à partir des carapaces de crevettes et des cuticules d'insectes.

Toutefois, les paramètres coût de synthèse, cytotoxicité et biodégradabilité des LI à base d'imidazolium ne sont pas négligeables et limitent l'utilisation de cette méthodologie à l'échelle du laboratoire. Le chapitre 2 de ce manuscrit sera dédié à l'utilisation d'une nouvelle famille de LI, dits « zwitterioniques » pour le prétraitement des biomasses chitineuses et lignocellulosiques. Les synthèses des ZIL ont été réalisées au préalable au LG2A. Ces synthèses

multi-étapes sont optimisées et le produit de départ est une molécule bio-sourcée dérivant de la L-histidine. Aucune étape de purification par chromatographie n'est nécessaire, réduisant ainsi considérablement le coût global des synthèses. L'impact de ces prétraitements sur la structure supramoléculaire des biomasses sera décrit et comparé à celui des LI utilisés dans le premier chapitre.

Enfin, dans le troisième chapitre de ce manuscrit, nous présenterons les solvants eutectiques profonds (DES). Les DES sont souvent comparés aux liquides ioniques en raison de leur fort pouvoir de solvation. En outre, s'ils sont facilement synthétisables, peu onéreux et généralement considérés comme peu toxiques. Ils pourraient donc être une alternative intéressante aux liquides ioniques. Différentes biomasses chitineuses seront prétraitées au DES et l'impact de ces prétraitements sur l'efficacité de la réaction de désacétylation de la chitine en chitosane sera comparé à celui du [C₂mim][OAc].

Cette thèse s'organise sous forme d'articles scientifiques où chacun des trois chapitres comportera une introduction bibliographique, le ou les articles publiés, une partie discussion, et une conclusion générale.

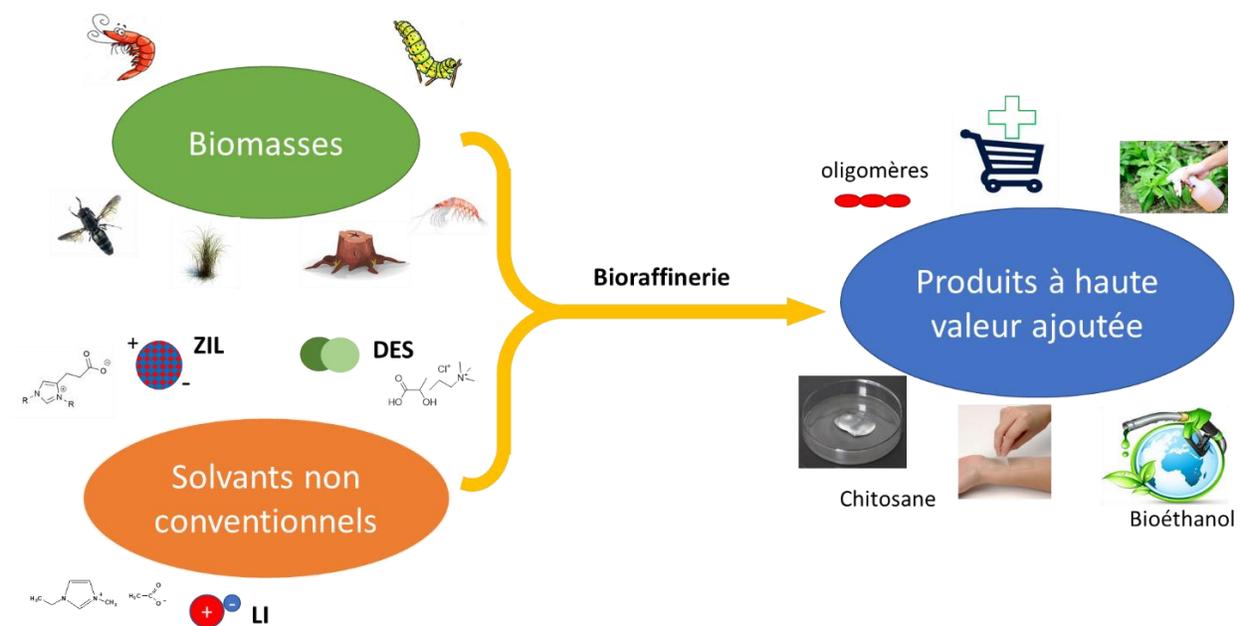


Figure 10 : Schéma récapitulatif des travaux de thèse sur la valorisation des biomasses chitineuses et lignocellulosiques.

Chapitre 1 : Prétraitements aux liquides ioniques et hydrolyses enzymatiques : Vers une bioraffinerie d'insecte.

Partie A : État de l'art

I. Les oligosaccharides

Les oligomères sont composés d'un faible nombre de motifs monomères représentant le degré de polymérisation (DP) qui peut être compris entre deux et quelques dizaines de motifs (une seule sous unité saccharidique ne constitue pas un oligomère en soit). Au-delà de quelques dizaines de motifs, il est plus convenable de parler de polymère (Weiss 2009). Les oligosaccharides, où le motif sera de nature saccharidique, peuvent correspondre à des fragments de polysaccharides. La masse molaire joue un rôle important sur les propriétés des oligomères. Un composé de deux sous-unités saccharidiques (DP2) n'aura donc pas les mêmes propriétés physico-chimiques et biologiques qu'un oligomère de six sous-unités saccharidiques (DP6), même si celui-ci est constitué des mêmes sous-unités (Klaerner et Padmanabhan 2016).

Parmi les oligomères existants, nous nous intéresserons particulièrement aux chito-oligosaccharides (COS), issus de la chitine et du chitosane. Ils sont composés de sous-unités saccharidiques de *N*-acétylglucosamine et de glucosamine et sont couramment utilisés dans le domaine pharmaceutique en servant de molécules plateformes. En effet, les COS présentent des propriétés similaires au polymère de chitine en termes de biodégradabilité, biocompatibilité et de non-toxicité, ouvrant ainsi un large champ d'applications dans le domaine médical. De plus, ils possèdent également des propriétés biologiques très prometteuses, étant naturellement antibactériens et antifongiques (Wang et al. 2008) (Tableau I.1).

II. Propriétés biologiques des COS

Tableau I.1 : Applications des Mono/oligosaccharides.

PROPRIÉTÉS ET APPLICATIONS	CARACTÉRISTIQUES	RÉFÉRENCES
ANTIBACTÉRIEN	COS de faible poids moléculaire et désacétylés	Li et al. 2016; Sánchez et al. 2017
ANTIFONGIQUE	COS de faible poids moléculaire et désacétylés	Mei et al. 2015; Rahman et al. 2015
ANTITUMORALE	COS acétylés et désacétylés	S. L. Wang et al. 2008, Masuda et al. 2014
EXCIPIENT	COS de très haut poids moléculaire (15kDa)	Azuma et al. 2015; Huang et al. 2012
ARTHROSE	Glucosamine	Dell et al. 2006; He et al. 2018; Hua et al. 2005, Einbu 2007; McCarty 1998
ÉLICITEUR	COS acétylés préférablement de DP6	Fujikawa et al. 2009, Chakraborty, Ghosh, and Das 2018, Das et al. 2015

Même si l'effet antibactérien des COS n'est pas encore totalement compris par la communauté scientifique, il semble dépendre, en grande partie, du degré d'acétylation (DA) et du degré de polymérisation (DP). Plus les COS sont désacétylés et de faibles poids moléculaires, plus ils gagneraient en pouvoir antibactérien. Les fonctions amines, cationiques en milieu acide, se fixeraient sur les protéines membranaires anioniques entraînant une perturbation dans le bon fonctionnement cellulaire et notamment dans l'absorption de nutriments par les microorganismes. L'impossibilité d'absorber des nutriments entraîne la mort cellulaire et la lyse des membranes. De plus, la fixation des COS sur les cellules entraînerait une agglomération cellulaire rendant encore plus problématique l'absorption de nutriments (Li et al. 2016; Sánchez et al. 2017).

Le mécanisme antifongique des COS désacétylés (DCOS) est tout aussi peu connu mais semblerait également dépendre de la concentration, du poids moléculaire et du degré d'acétylation. Comme pour les propriétés antibactériennes des COS, les DCOS sont soupçonnés

de se fixer sur les membranes des champignons chargées négativement et d'empêcher les échanges de nutriments ce qui entrainerait une perte de fluide intracellulaire ainsi qu'une perte de protéines. Une seconde hypothèse serait que les COS interagiraient avec l'ADN et les ARNm, ce qui perturberait les ribosomes lors de la traduction des ARNm et empêcherait ainsi le bon fonctionnement cellulaire de la synthèse de protéines (Mei et al. 2015; Rahman et al. 2015).

De plus, les COS et les DCOS possèdent des propriétés antitumorales qui suscitent beaucoup d'intérêt. En effet, la présence de COS ou de DCOS engendrerait une augmentation de la production de certaines cytokines. Les cytokines libérées induisent une spécialisation des lymphocytes pour lutter contre les cellules cancéreuses. En augmentant la production de cytokines, on améliore la différenciation des lymphocytes ce qui entraîne une cytotoxicité plus importante pour les cellules cancéreuses qui sont attaquées par ces mêmes lymphocytes. En plus d'améliorer l'efficacité du système immunitaire, les COS et DCOS induiraient aussi une apoptose des cellules cancérogènes chez l'homme (cellules leucémique U937 et tumeur du colon chez des souris (colon-26)) (S. L. Wang et al. 2008; Masuda et al. 2014). Les COS et DCOS agiraient donc de manière directe sur les cellules cancéreuses en entraînant leur apoptose et de manière indirecte en stimulant la réponse du système immunitaire face aux cellules cancéreuses.

Les COS peuvent aussi servir de vecteurs pour faire passer des principes actifs dans les matrices intracellulaires. Des tests *in vitro* ont permis de démontrer que l'administration de podophylotoxine par des micelles formées de COS couplés à de l'acide stéarique augmentait l'activité anticancéreuse, en comparaison à de la podophylotoxine administrée seule. Cette activité renforcée serait liée à une administration plus rapide de la podophylotoxine vectorisée dans des cellules (Azuma et al. 2015; Huang et al. 2012). Les COS ont aussi été utilisés dans des traitements oculaires où ils sont recouverts de nano-transporteurs de lipides. Ils ont permis une amélioration de la perméabilité et apporté des propriétés autoadhésives supérieures aux nanoparticules seules (Luo et al. 2011).

III. Propriétés biologiques de la glucosamine

L'arthrose est généralement soignée avec des anti-inflammatoires et des analgésiques qui ne servent qu'à diminuer la douleur et peuvent à long terme engendrer des complications gastro-intestinales et cardiaques importantes. La glucosamine, elle-même naturellement présente dans les matrices et tissus articulaires, serait une alternative intéressante puisqu'elle permettrait de limiter la dégradation et même de régénérer les articulations endommagées (Dell et al. 2006; He et al. 2018; Hua et al. 2005). De plus, le traitement par la glucosamine semblerait induire une augmentation de l'acide hyaluronique qui réduira la quantité de fluide de sulfate de kératane qui joue un rôle dans la dégradation du cartilage. De surcroît, l'acide hyaluronique fait partie du liquide synovial qui protège les articulations et augmente la viscosité de ce dernier, lui permettant ainsi de mieux résister aux chocs. Une personne souffrant d'arthrose développera plus de liquide synovial et la viscosité de ce dernier diminuera avec sa capacité à protéger les articulations. L'augmentation de la viscosité liée au surplus d'acide hyaluronique, lui-même engendré par la glucosamine permet donc une meilleure protection contre les chocs (Einbu 2007; McCarty 1998; He et al. 2018). Cependant, des études démontrent une certaine toxicité de la glucosamine sur le système rénal. Cette toxicité doit donc être d'avantage étudiée avant de démocratiser la glucosamine comme traitement contre l'arthrose car il ne semble au pas y avoir de consensus absolu sur le sujet (Anderson, Nicolosi, and Borzelleca 2005; Gueye et al. 2016) cependant l'usage de la glucosamine été autorisé par l'agence nationale de la sécurité du médicament et des produits de santé.

IV. Propriétés élicitrices des COS

Certains COS sont aussi considérés comme des éliciteurs et permettent donc d'activer les défenses des végétaux comme les plantes de tomates et les salades contre des microorganismes. Ils peuvent s'apparenter à des biopesticides. Des mécanismes de défense ont été mis en place par les plantes pour lutter contre les microorganismes comme les bactéries et les champignons. Toutefois, il est d'abord nécessaire pour les plantes de détecter les menaces avant de mettre en place une réponse immunitaire puisque mobiliser les défenses en permanence, est un processus coûteux en énergie. Une réelle course a lieu entre les microorganismes qui cherchent à cacher leur présence dans l'organisme infecté et la plante qui cherche des marqueurs de la présence de

l'infection par des champignons pathogènes. Une fois les marqueurs détectés, la plante mobilise ses défenses. Un des marqueurs de la présence des champignons est la chitine ou le chitosane qui peuvent être présents dans les parois des champignons. En mettant les plantes en présence de COS, ces derniers mimeront la présence de microorganismes potentiellement nocifs pour la plante et activeront une réponse immunitaire en sécrétant des chitinases (Fujikawa et al. 2009 ; Chakraborty et al. 2018). Il est important de mentionner que plus les DCOS ont un faible DA, plus ils perdent leur pouvoir éliciteur, excepté dans de rares cas où ils auront un effet supérieur au COS, puisqu'en raison des contraintes évolutives, certaines plantes se sont spécialisées dans la production de chitosanases au lieu de chitinases pour la plupart. Les DCOS de faible poids moléculaire ont des actions antifongiques et antibactériennes directes et par conséquent, peuvent aussi être considérés comme des biopesticides. La caractérisation des COS utilisés dans ce genre d'expériences reste, à ce jour, un point critique puisque la mesure du DA ou du poids moléculaire implique une certaine erreur ce qui a pour conséquence, des hypothèses souvent difficiles à confirmer (Das et al. 2015). D'après l'étude de Das et al. 2015, il semblerait que le DP6 soit le COS qui procure la réponse immunitaire la plus forte. Plusieurs méthodes d'administration peuvent être utilisées. La pulvérisation sur les plantes où les COS pénétreront par les feuilles, mimant ainsi les pathogènes présents dans l'air. Une autre méthode consiste à placer les COS dans le sol où ils pénétreront la plante par le système racinaire (Das et al. 2015).

V. Synthèse des COS

Deux stratégies de synthèse existent pour obtenir des oligomères. La première consiste à cibler la molécule d'intérêt et à ajouter par bloc, les sous-unités saccharidiques. Ce genre de synthèse nécessite de nombreuses étapes de protection/déprotection des groupements hydroxyles. Ces synthèses dites multi-étapes sont donc coûteuses, chronophages et énergivores puisqu'il est souvent nécessaire d'isoler les intermédiaires de réaction avant de lancer l'étape suivante. Barroca-Aubry et al. 2010 ont proposé une nouvelle stratégie permettant d'obtenir des chito-oligosaccharides (DP2 et DP3) de structures bien définies avec un contrôle parfait du nombre et de la position des unités GlcN et GlcNAc, le long de la chaîne oligomère (Figure I.1). Toutefois, cette synthèse nécessite l'utilisation d'étapes de protection/déprotection ainsi que l'activation d'un des accepteurs par un groupement trichloroacétimide ce qui implique une

baisse du rendement total de la synthèse et un coût non négligeable pour l'ensemble de cette dernière (Barroca-Aubry et al. 2010).

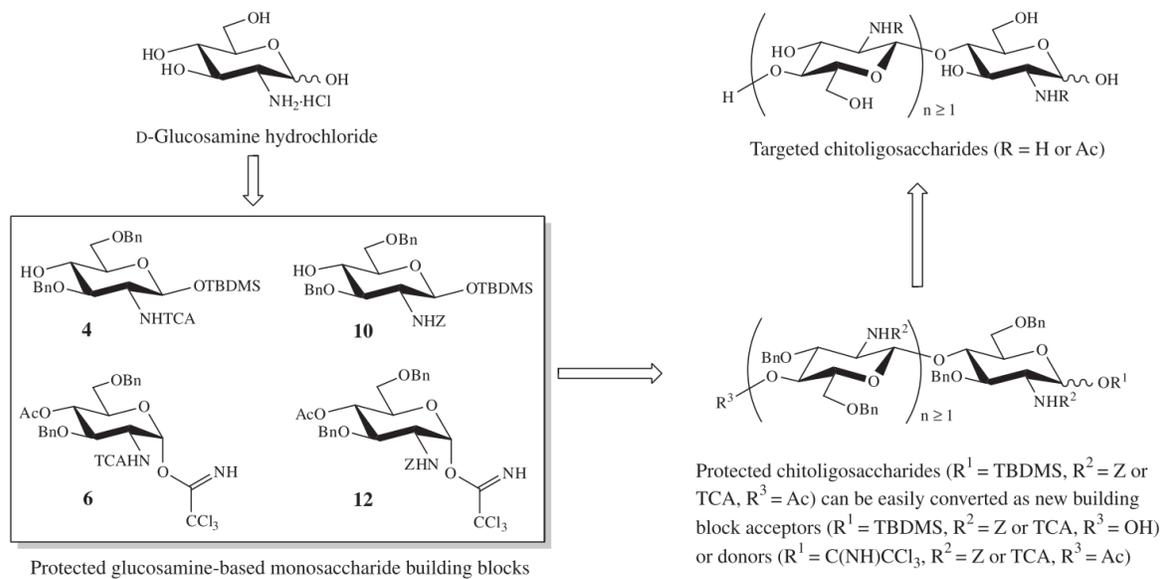


Figure I.1: Stratégies de synthèse des homo- et hétéro-chitooligosaccharides (extrait de Barroca-Aubry et al. 2010).

La deuxième méthode est la synthèse aléatoire réalisée quant à elle en une étape. Tous les composants sont mis en réaction et de nombreux oligomères, de tailles et de conformations différentes, seront obtenus. L'étape de purification, basée sur des techniques de chromatographie comme la chromatographie liquide haute performance par exclusion stérique (HPLC-SEC), est cependant difficile à optimiser en raison de la difficulté à séparer un nombre important de différents produits structurellement proches (Klaerner and Padmanabhan 2016).

Les deux approches ne sont donc pas optimales et d'autres méthodes comme les hydrolyses (chimique ou enzymatique) ou encore le broyage de polysaccharides sont donc envisagées pour obtenir ces oligomères.

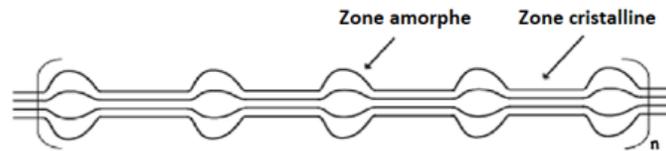
VI. Méthodes d'extractions de COS

De nouvelles méthodes, pour obtenir des oligomères à partir de biopolymères tels que la pectine, la cellulose ou encore la chitine, ont donc été mises au point et peuvent être classées en deux groupes : l'hydrolyse chimique ou enzymatique et les traitements mécaniques.

1. Hydrolyse acide

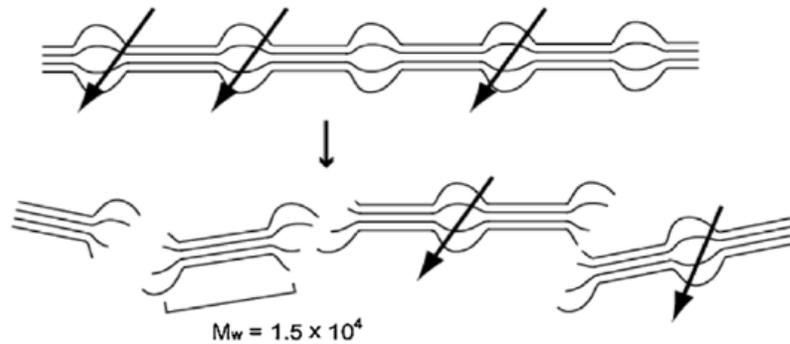
Les hydrolyses, effectuées par voie chimique, nécessitent l'utilisation d'acide fort à haute température comme l'acide chlorhydrique (HCl), qui est le plus couramment utilisé, ou encore l'acide sulfurique (Zlotnikov et al. 2007). L'acide agira en 3 étapes sur le polymère de chitine, son action est représentée dans la Figure I.2. Dans un premier temps, l'acide induit l'hydrolyse des zones amorphes de la chitine. La faible cristallinité de ces zones amorphes indique une faible organisation du réseau de liaisons hydrogène entraînant une faible densité des fibres entre elles. Cela permet à l'acide d'attaquer les liaisons osidiques. Cette première phase de l'hydrolyse va générer un hydrolysate contenant des oligomères de haut poids moléculaire. Une augmentation de la cristallinité du polymère de chitine résiduel (fraction de chitine non hydrolysée) peut même être observée durant cette phase résultant de l'élimination des zones amorphes. Dans un second temps, les zones cristallines et les oligomères de haut poids moléculaire, obtenus précédemment, sont hydrolysés en oligomères de faible poids moléculaire. Si l'hydrolyse acide est stoppée durant cette phase, une quantité importante de chitine n'aura pas été hydrolysée en raison de sa récalcitrance et un grand nombre d'oligomères de poids moléculaires différents seront obtenus. Si l'hydrolyse est poursuivie, des dégradations chimiques comme des désacétylations seront observées sur les COS obtenus (Einbu and Vårum 2007, 2008; Kazami et al. 2015; Novikov 2004 ; Dolgopyatova et al. 2013). Les hydrolyses en milieu acide sont donc difficilement contrôlables. Des rendements très aléatoires et une certaine hétérogénéité, concernant les poids moléculaires des COS extraits, sont observés. C'est donc une technique peu efficace, notamment en raison de la récalcitrance du polymère et du manque de sélectivité de la réaction d'hydrolyse.

I- Chitine avant hydrolyse

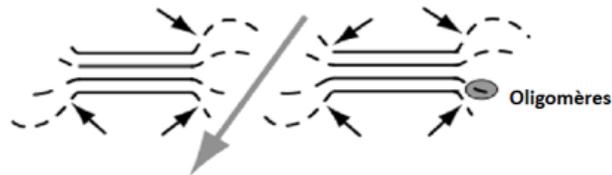


II- Premier niveau d'hydrolyse (0 - 5 min)

Fibre de chitine
 $M_w = 3,3 \times 10^5$



III- Deuxième niveau d'hydrolyse (5-30min)



IV- Troisième niveau d'hydrolyse (après 30min)

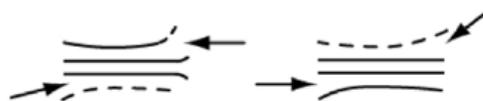


Figure I.2 : mécanisme simplifié de l'hydrolyse chimique de la chitine en présence d' HCl (PM en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (extraite de Kazami et al. 2015).

À titre d'exemple, Rupley et al (1964) ont réalisé l'hydrolyse acide de 20 g de chitine dans HCl 11 M à 0 °C dans un broyeur à billes et ont ensuite laissé la solution entre 2 et 3 h à 40 °C. Les rendements obtenus sont reportés dans le Tableau I.2 ci-dessous :

Tableau I.2 : Résultats de l'hydrolyse acide effectuée sur la chitine.(Rupley 1964)

FRACTIONS ISOLÉES		RENDEMENTS (EXPRIMÉS EN G D'OLIGOMÈRE) POUR 20 G DE CHITINE
OLIGOMÈRES	Monomère	6.9
	Dimère	2.6
	Trimère	1.8
	Tétramère	1.3
	Pentamère	0.7
FRACTIONS RESTANTES		0.7
PRÉCIPITÉS LAVÉS		5.5**
CHITINE NON HYDROLYSÉE		3.1

**Traces de sels présentes

Lors d'une hydrolyse acide, de nombreux oligomères de tailles différentes sont également extraits. Il est donc difficile d'obtenir des rendements élevés pour un type d'oligomère spécifique. Cependant, une étude menée par Falk et al. (1966) a permis de déterminer les conditions d'extraction pour obtenir des rendements optimaux en glucosamine (DP1). Selon cette étude, dans une solution HCl à 10 M, lorsque 50 % de la masse du polymère est hydrolysée, la quantité en DP1 produit est la plus importante (Falk 1966). Plus récemment, la cinétique de l'hydrolyse de la chitine par l'acide chlorhydrique a été étudiée pour suivre l'évolution de la proportion des différents oligomères en fonction du temps et la conclusion est que l'obtention d'oligomères par hydrolyse acide n'est pas aléatoire. Si maîtrisée et en fonction des conditions opératoires, il est possible d'obtenir des oligomères de taille désirée (Einbu, Grasdalen, and Vårum 2007).

2. Extraction de COS par broyage (broyeur à billes)

Un intense broyage, dans un broyeur à billes, pendant une longue période, peut amener à l'obtention de COS de différents poids moléculaires. Les travaux de Margoutidis décrivent l'obtention de COS allant de monomères aux pentamères et à différentes concentrations. Les seules concentrations déterminées sont celles du DP1 et DP2 qui atteignent des rendements de 5.1% et 3.9% respectivement au bout de 6h de broyage (Margoutidis et al. 2018). Néanmoins, le temps de broyage est long, les rendements obtenus sont faibles et cette technique n'est pas

spécifique ce qui implique des étapes de purification pour séparer les différents produits. De plus, les broyeurs à billes industriels sont pas/peu répandus actuellement ce qui fait que cette technique, bien qu'intéressante, nécessite encore d'être optimisée.

3. Hydrolyse enzymatique

Les hydrolyses enzymatiques ont pour avantage, grâce à leurs conditions douces de mise en œuvre, d'être reconnues comme des alternatives durables et plus respectueuses de l'environnement que les hydrolyses chimiques. Les chitinases utilisées peuvent provenir de différents types d'organismes tels que les mycètes ou les bactéries. On citera, par exemple, les chitinases commerciales de *Trichoderma viride* (TV) et de *Streptomyces griseus* (SG). Même si le prix de certaines enzymes est extrêmement élevé et qu'elles restent par conséquent encore peu utilisées au niveau industriel, elles ont aussi pour avantage, de pouvoir être immobilisées sur un support facilitant ainsi leur réutilisation. Contrairement aux hydrolyses acides par voie chimique, les chitinases sont généralement un mix d'enzymes, agissant en synergie sur la chitine. Chacune d'entre elles permet une réaction spécifique et l'obtention de COS avec des degrés de polymérisation attendus. En modulant le ratio des différentes enzymes (Figure I.3), il est donc potentiellement possible d'obtenir un oligosaccharide spécifique. Les sites actifs des enzymes ne reconnaissent pas les motifs saccharidiques désacétylés et ne peuvent donc pas les hydrolyser. En raison de la spécificité des enzymes, le chitosane ou encore les chitines, possédant un DA assez faible, ne pourront pas être hydrolysés efficacement. En effet, le site actif des chitinases ne reconnaît pas les motifs désacétylés et les chitinases ne peuvent donc pas hydrolyser la chitine.

Deux types d'enzymes ont été identifiés dans les chitinases : les endochitinases et les exochitinases. Le schéma représentant le mécanisme de l'hydrolyse enzymatique de la chitine catalysée par les chitinases est présenté Figure I.3. Les endochitinases (EC.3.2.1.14) permettront d'hydrolyser de manière aléatoire, les chaînes de chitines au niveau des liaisons osidiques β 1-4. Les produits ainsi obtenus sont les oligosaccharides de tailles très diverses puisque l'hydrolyse se fait aléatoirement. Le deuxième type de chitinases correspond aux exochitinases. Elles sont composées de deux sous types : les chitobiosidases et les β -1-4-glucosamidases. Les chitobiosidases (EC.3.2.1.29) permettront d'hydrolyser la chitine en *N,N'*-diacétylchitobiose (DP2) (Figure I.4). L'hydrolyse en présence de chitobiosidases se réalise uniquement sur

l'extrémité des chaînes de chitine. Ce type d'exochitinase fonctionne donc bien avec les endochitinases qui fourniront plus de sites disponibles pour les chitobiosidases. Le deuxième type d'exochitinases correspond aux β 1-4-glucosaminidases (EC.3.2.1.30) qui elles hydrolyseront les oligomères produits par les endochitinases pour les hydrolyser sur les liaisons osidiques β 1-4. Toutefois, seul le mono-oligomère (DP1, Figure I.4) est obtenu (Javed et al. 2013). Toutes ces enzymes agissent en synergie et peuvent être retrouvées dans différentes proportions dans les mix de chitinases commerciales.

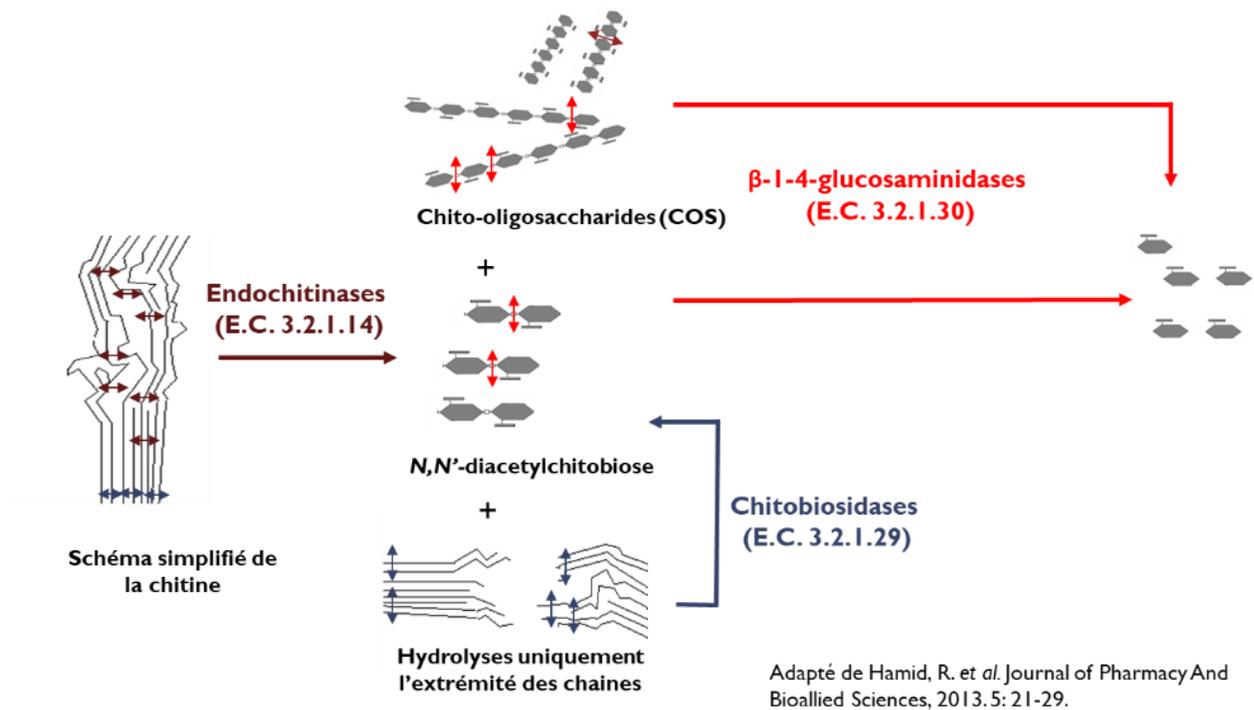


Figure I.3 : Schéma du mécanisme de l'hydrolyse enzymatique réalisée en présence de chitinases.

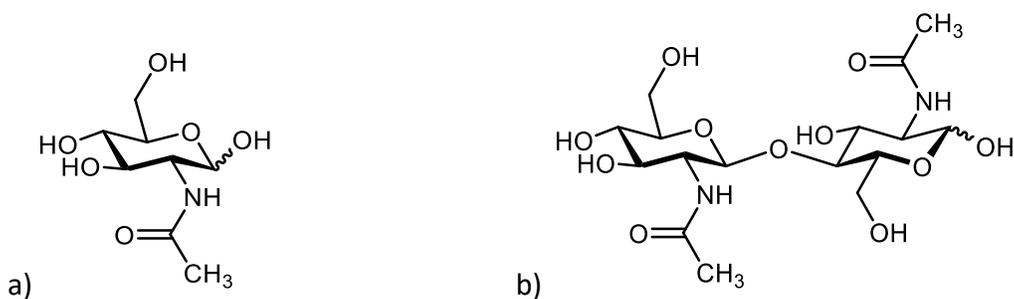


Figure I.4 : Structures chimiques de la N-acétylglucosamine (DP1) (a) et de la N,N'-diacétylchitobiose (DP2) (b).

Les enzymes accèdent difficilement aux liaisons lorsque les chitines sont fortement cristallines. Un prétraitement devra alors être utilisé pour rendre les liaisons ciblées plus accessibles et augmenter ainsi les rendements d'hydrolyse.

Cette faible accessibilité du polymère constitue un véritable verrou scientifique et technologique à sa dépolymérisation par voie enzymatique. Le prétraitement du polymère (ou de la biomasse chitineuse) constitue donc une étape clé, en vue de sa valorisation en COS.

VII. Prétraitements de la chitine

Dans cette partie bibliographique, nous avons choisi de sélectionner uniquement les exemples de prétraitements mis en œuvre en amont de l'hydrolyse enzymatique. Différents types de prétraitements existent comme les prétraitements chimiques, physicochimiques, biologiques, mécaniques ou encore mécano-chimiques. Le but de chaque prétraitement est d'augmenter l'accessibilité du polymère aux enzymes ce qui facilite la coupure des liaisons et permet l'obtention de rendements supérieurs aux hydrolyses enzymatiques réalisées sans prétraitement. Les différentes stratégies décrites dans la littérature visent soit à amorphiser la chitine en détruisant le réseau de liaisons hydrogène, impliquant ainsi une baisse de l'indice de cristallinité de la chitine, ou soit à dépolymériser la chitine, c'est-à-dire de réduire son poids moléculaire.

Les méthodes décrites dans la littérature sont listées ci-dessous.

1. Les fluides supercritiques

Ils suscitent beaucoup d'intérêt car ils sont considérés comme verts puisqu'il s'agit généralement d'eau ou de CO₂ chauffés à haute pression et à haute température (point critique de l'eau : 374 °C et 22.1 MPa, point critique du CO₂ : 30 °C et 7.29 MPa). Une fois le point critique dépassé, les molécules ne sont plus liquides ou gazeuses mais dans un quatrième état : celui de fluide supercritique. Les fluides supercritiques combinent les avantages des gaz et des liquides. Ils seront capables de solubiliser des substances de façon très spécifique, comme le ferait un liquide, mais ils se diffusent aussi dans un solide comme le ferait un gaz. L'eau supercritique a le pouvoir de solubiliser la chitine et agit sur cette dernière selon un mécanisme en 3 étapes présenté dans la Figure I.5. La première étape est l'étape, dite de gonflement, et correspond à l'étape du prétraitement. Elle survient très rapidement puisqu'elle se produit, dès les toutes premières minutes de la réaction, et notamment, dès la première minute à une température de 400°C. La distance entre les différentes chaînes de chitine augmente ainsi. La seconde étape est la dissolution, les chaînes de chitine se dissolvent dans le fluide supercritique. Cependant, si cette étape dure trop longtemps, une réaction secondaire peut se produire. Elle consiste en l'hydrolyse du polymère suivie de son entière dégradation. Il n'est donc plus possible d'obtenir des COS (Osada et al. 2015). Dans l'optique d'un simple prétraitement, il est important de contrôler le temps de réaction pour s'arrêter à l'étape de gonflement. Les hydrolyses enzymatiques, réalisées sur la chitine ayant subi l'étape de gonflement, donnent lieu à des rendements bien plus élevés puisque l'on passe de 5 % de rendement en GlcNAc₂ (DP2) pour une chitine non prétraitée, à 37 % pour une chitine prétraitée (Osada et al. 2013). L'indice de cristallinité reste stable mais c'est bien l'augmentation de la distance entre les chaînes qui entraîne un meilleur accès au substrat pour les enzymes. Ce prétraitement est donc très intéressant puisqu'il permet une nette augmentation des rendements en DP2. De plus, il est considéré comme vert puisque le solvant utilisé est l'eau et le temps de prétraitement est court (1 à 2 minutes). Il reste quelques inconvénients à l'utilisation de fluide supercritique. L'utilisation au niveau industriel de ces techniques à haute température et haute pression représente toujours un risque pour la sécurité des employés et des sites industriels (Osada et al. 2012, 2013).

De plus, même si ce type de traitement permet d'éliminer les protéines présentes dans la biomasse, elle ne permet pas d'éliminer le CaCO_3 (Osada et al. 2015).

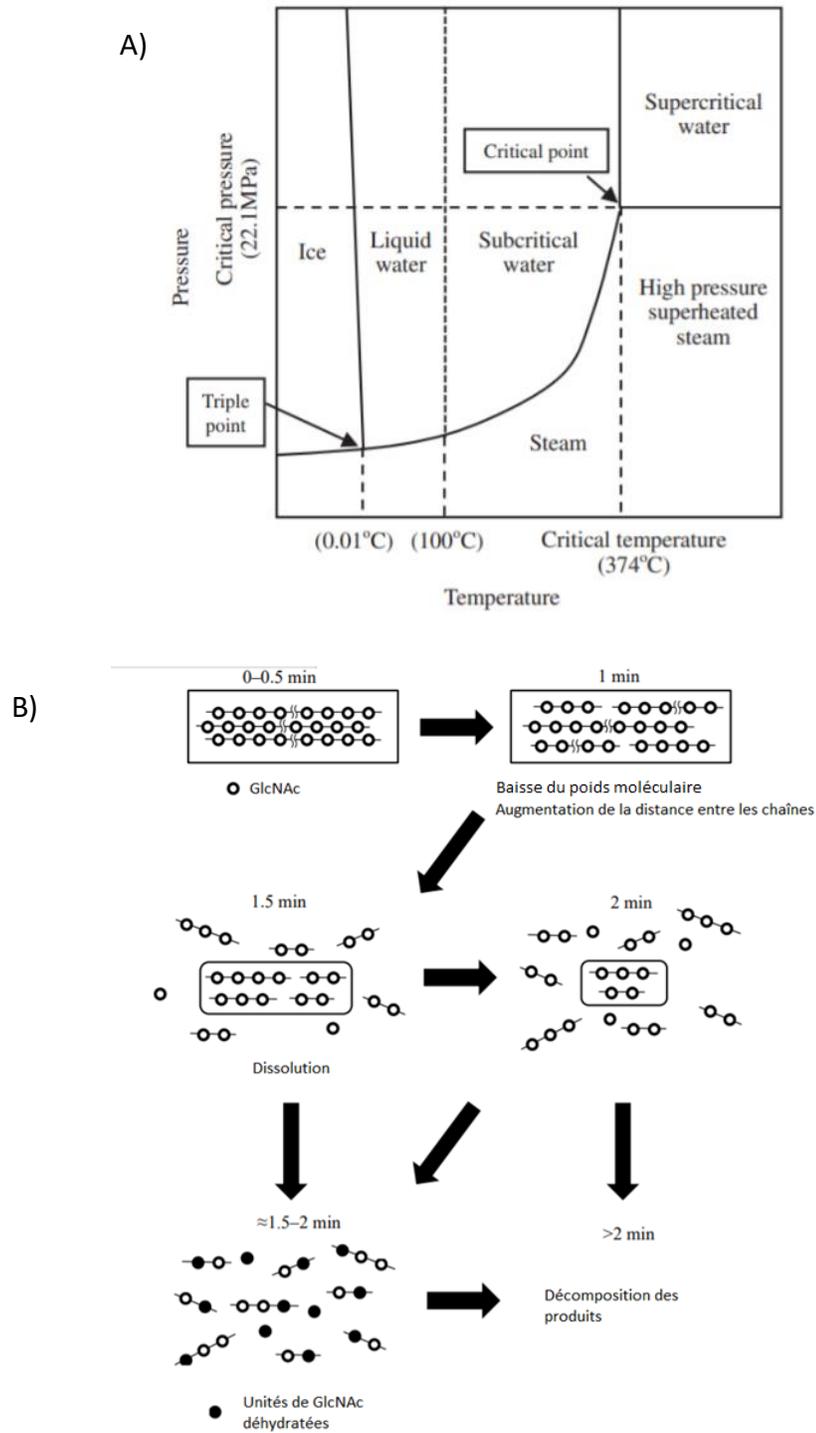


Figure I.5 : Schémas représentant le diagramme de phase de l'eau (A) (Okajima and Sako 2014) et l'action de l'eau supercritique sur le polymère de chitine (B) (extrait de Osada et al. 2015).

2. Prétraitements en milieu acide

Les prétraitements en présence d'acides forts comme HCl ou H₂SO₄ peuvent être utilisés pour permettre aux enzymes d'hydrolyser efficacement la chitine. Cette méthode a permis de passer à des rendements d'hydrolyses en *N*-acétylglucosamine de 12.8 % pour une chitine non prétraitee, à 36 % pour une chitine prétraitee en milieu acide (Vyas and Deshpande 1991). Cependant, ce type de prétraitement pose un problème majeur lié à la pollution générée par les traitements des effluents acides produits lors des lavages. Ce prétraitement, couplé à une hydrolyse enzymatique, présente toutefois l'avantage d'améliorer l'obtention d'oligomères de degré de polymérisation spécifique, contrairement à une simple hydrolyse acide, où une grande variété de COS de poids moléculaires variables peut être obtenue. De plus, cette méthode remédie également au problème de dégradation totale du polymère, observée lors de l'utilisation de fluides supercritiques (Chen, Shen, and Liu 2010).

3. Prétraitements microbiologiques

Les prétraitements microbiologiques sont récents et semblent donner des résultats très prometteurs puisqu'ils permettent, dans un second temps, de tendre vers une dépolymérisation totale de la chitine par voie enzymatique (Zhang et al. 2018). Cette technique, déjà maîtrisée à échelle industrielle, est de plus, peu coûteuse et écologique. Les mécanismes d'action de ce prétraitement sur la chitine ne sont pas encore totalement compris mais il semblerait que, à l'instar des prétraitements acides, celui-ci permet l'obtention d'une chitine extrêmement fibrilleuse où le diamètre des fibres est dans le domaine nanométrique. Les auteurs ont montré une baisse importante du poids moléculaire de la chitine, ce qui tend à conclure à une dépolymérisation incontrôlée. De plus, ce prétraitement peut être réalisé à pH neutre en utilisant *Chitinolyticbacter meiyuanensis SYBC-H1*. Aucune neutralisation des eaux de rinçage n'est nécessaire dans ce cas. Ce prétraitement permet également de rendre les fibres beaucoup plus accessibles aux enzymes. Il permettrait donc d'obtenir d'excellents rendements en COS comme le montre une étude antérieure, reportant un rendement de conversion de la chitine de 96 % en *N*-acétylglucosamine (Zhang et al. 2018).

4. Prétraitements mécaniques

Les prétraitements mécaniques utilisent des forces physiques comme des chocs ou de fortes pressions pour briser les fibres de chitines et réduire le poids moléculaire du polymère. Elles réduiront généralement l'indice de cristallinité, le poids moléculaire et la taille physique des particules de chitine ce qui les rend plus digestible par les enzymes. Ces prétraitements peuvent être de différentes natures et réalisés par broyage, ultrasonication ou à l'aide de jets de liquides à haute pression (Aklog et al. 2017). Les broyages peuvent notamment permettre d'augmenter les rendements des hydrolyses en GlcNAc₂ de 5 % (chitine non-prétraitée), à 60 % (chitine prétraitée) (Osada et al. 2013).

Par ailleurs, une chitine prétraitée par de l'eau supercritique, couplée à un deuxième prétraitement tel qu'un broyage effectué à l'aide d'un broyeur à billes, a permis d'obtenir un rendement en GlcNAc₂ de 93 % après hydrolyse enzymatique (Osada et al. 2013).

Un homogénéisateur à haute pression a aussi permis d'élever les rendements en *N*-acétylglucosamine de 21.8 % à 78.1 %. L'homogénéisateur force de la chitine présente dans une solution aqueuse à passer à travers un trou à débit constant. Ce trou est un point de compression qui va engendrer une force de pression et permettre la défibrillation la chitine. Cette méthode s'est montrée plus efficace que les prétraitements aux ultrasons et par ultramicrobroyage qui ont tous deux permis d'obtenir des rendements de 50% en *N*-acétylglucosamine après hydrolyse enzymatique (Wei et al. 2017). Si l'ultrasonication et l'ultramicrobroyage sont utilisés en combinaison, les rendements peuvent atteindre 72% en *N*-acétylglucosamine (Gao et al. 2015). Ces deux méthodes soumettent la chitine à des ultrasons en milieu aqueux, pendant plusieurs minutes et permettent de dissocier ou d'individualiser les fibres de chitine. Toutes ces méthodes sont dites propres et considérées comme invasives pour le polymère, puisqu'elles entraînent sa dépolymérisation (Osada et al. 2013).

5. Explosion à la vapeur

L'explosion à la vapeur a aussi démontré une aptitude à améliorer les performances de l'hydrolyse enzymatique de la chitine. La première étape de l'explosion à la vapeur est la compression. Elle consiste à amener à haute pression et haute température la chitine, placée

dans une enceinte qui doit au préalable être humide. Dans une deuxième phase, une dépressurisation est réalisée, diminuant brusquement la pression de l'enceinte à pression atmosphérique. La vapeur générée expansera ainsi la chitine et induira une certaine porosité dans la structure du polymère. Cette méthode semble constituer un prétraitement efficace pour qu'une hydrolyse enzymatique soit effectuée dans un second temps et suffise à obtenir des rendements compétitifs. Cette méthode est moins agressive pour le polymère que d'autres prétraitements mécaniques, puisque l'hydrolyse engendrée par le prétraitement est mineure et peu de motifs seront désacétylés ou dégradés contrairement aux hydrolyses acides classiques. Dans l'étude de Villa-Lerma, les rendements en *N*-acétylglucosamine passent de 5.9 % sans prétraitement, à 23.6 % en traitant préalablement la chitine par une explosion à la vapeur (Villa-Lerma et al. 2013).

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux prétraitements par les liquides ioniques (LIs). Cette stratégie a été fortement utilisée par nos collaborateurs du GEC (UPJV) dans le cas de biomasses végétales (Auxenfans, Buchoux, Husson, et al. 2014; Auxenfans, Buchoux, Larcher, et al. 2014; Auxenfans et al. 2017; Husson et al. 2011) et nous avons essayé d'adapter certaines de leurs conditions expérimentales, au polymère de chitine. Avant d'exposer nos résultats, l'état de l'art comprenant les différentes familles de LIs, leurs propriétés ainsi que les prétraitements de la biomasse par les LIs sera présenté ci-dessous.

VIII. Prétraitement de la biomasse par les liquides ioniques

1. Découverte des liquides ioniques

Les liquides ioniques sont des sels, constitués le plus souvent, d'un cation organique et d'un anion organique ou inorganique dont la température de fusion est inférieure à 100°C (Welton 2018). Ils sont considérés comme des alternatives prometteuses aux solvants organiques classiques puisqu'ils sont considérés non volatiles du fait de leur tension de vapeur négligeable (Welton 2018). Les liquides ioniques, grâce à leur stabilité, peuvent être recyclés et réutilisés. Ils ont généralement une polarité importante et peuvent solubiliser un bon nombre de composés, qu'ils soient organiques, inorganiques, apolaires ou bien polaires. Ils bénéficient aussi d'une

conductivité élevée et d'une fenêtre électrochimique plus importante que les solvants classiques (Welton 2018).

La première notion de liquide ionique date de 1914 avec le chercheur Paul Walden. À la recherche de sels fondus, il découvre que le nitrate d'éthylammonium ($[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$) avait une température de fusion égale à $12\text{ }^\circ\text{C}$ (Walden and Molekulargr 1914). Il venait alors de découvrir le premier LI appartenant au sous-groupe des liquides ioniques protiques. Toutefois, cette découverte passa inaperçue de la communauté scientifique et ce ne fut que 40 ans plus tard que les LIs réapparurent dans la littérature avec les travaux de Hurley et Weir, en 1951. Les auteurs ont synthétisé et étudié le bromure de 1-éthylpyridinium-chlorure d'aluminium ($[\text{C}_2\text{py}]\text{Br}^- \text{AlCl}_3$) et son application pour l'électrodéposition de métal (Hurley et al. 1951).

Plus tard, George Parshall, en travaillant sur des systèmes à faible point de fusion, découvre deux autres liquides ioniques, le tétraéthylammonium trichlorogermanate ($[\text{Et}_4\text{N}][\text{GeCl}_3]$) et le tétraéthylammonium trichlorostanate ($[\text{Et}_4\text{N}][\text{SnCl}_3]$). Ces deux LIs ont servi de solvant lors de réactions d'hydrogénation, en présence de catalyseurs de platine (Parshall 1972). Plusieurs groupes de recherche se sont alors penchés sur la synthèse de LIs comme par exemple, Warren Paul, avec la famille des tétraalkylborures de tétraalkylammonium et plus particulièrement, le triéthylhexylborure de triéthylhexylammonium ($\text{N}_{22226}\text{B}_{22226}$). Il étudia leurs effets, dans des réactions organiques en tant que solvant, et mesura leur toxicité et leur effet antibactérien (Rosenthal et al 1975; Ford, Hauri, and Smith 1974). À cette époque, selon la problématique à résoudre, de nombreux chercheurs travaillèrent en parallèle sur différentes familles de LIs. Ce n'est qu'en 1983, que la revue intitulée « *Room Temperature Molten Salt System* », écrite par Chuck Hussey, créa un engouement scientifique pour les liquides ioniques et où les travaux sur ceux-ci, prirent de l'ampleur (Hussey 1983).

2. Classification des liquides ioniques

Quatre grandes catégories de liquides ioniques existent à ce jour avec chacune leurs sous-catégories. Les liquides ioniques aprotiques, protiques, inorganiques et solvatés. Bien que ces quatre catégories soient définies, certains liquides ioniques peuvent faire partie de plusieurs

catégories à la fois. Leurs propriétés seront également présentées (Angell Austen, Ansari, and Zhao 2012).

-Les liquides ioniques aprotiques ont pour cation une molécule organique. Ce sont des liquides ioniques très populaires et donc très étudiés dans de nombreux domaines. Cette catégorie se décompose en de nombreuses sous-catégories comme les liquides ioniques à cation imidazolium, pyridinium et pyrrolidinium (Figure I.6).

-Les liquides ioniques protiques sont composés d'une base et d'un acide de Brønsted, par exemple le 1-butyl-3-méthylimidazolium hydrogen sulfate ($[\text{Bmim}]^+[\text{HSO}_4]^-$) ou encore le 1-méthylimidazolium trifluoroacetic acid ($[\text{Hmim}]^+[\text{TFA}]^-$).

-Les liquides ioniques inorganiques sont composés d'un cation inorganique mais peuvent se trouver sous la forme aprotique ou protique comme $\text{AlCl}_3\text{-NaCl-KCl}$ utilisé dans les batteries, ou bien NaFSA-KFSA (FSA = bis(fluorosulfonyl)imide).

-Les liquides ioniques solvatés sont souvent composés de cations multivalents qui normalement ne rempliraient pas les critères de la température de fusion inférieure à 100°C . On les appelle aussi sels fondus basse température. Les sels d'ammonium quaternaires font partie de cette catégorie mais peuvent aussi être considérés comme protiques (Figure I.6).

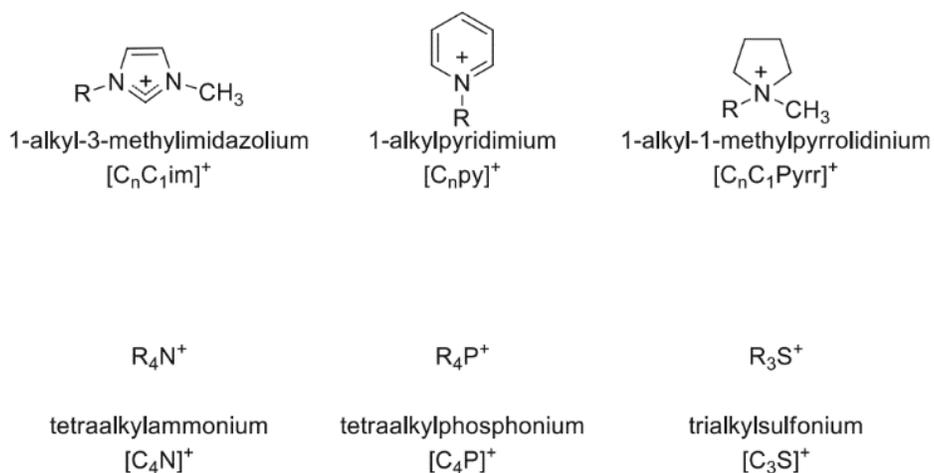


Figure I.6 : Cations couramment utilisés pour la synthèse de liquides ioniques.

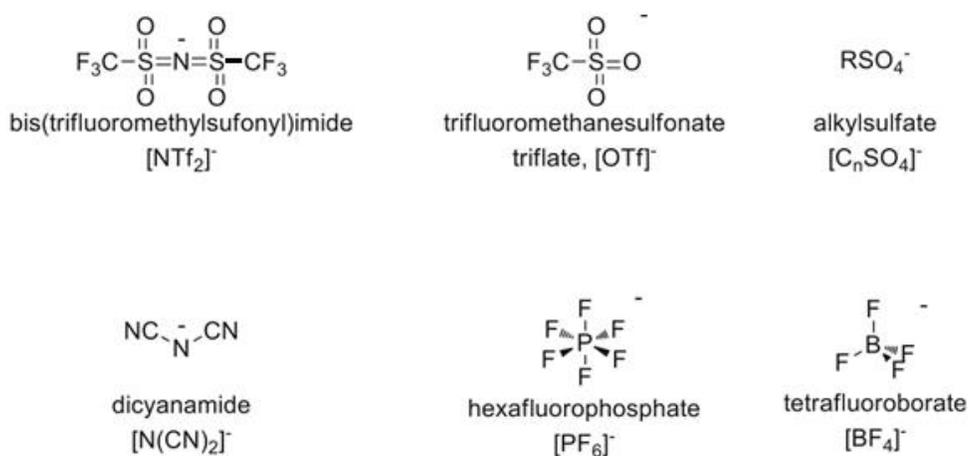


Figure I.7: Anions couramment utilisés pour la synthèse de liquides ioniques.

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'utilisation de LIs comportant un noyau imidazolium. Cette famille a montré d'excellentes capacités de solubilisation de biomasses récalcitrantes (Auxenfans, Buchoux, Husson, et al. 2014; Auxenfans, Buchoux, Larcher, et al. 2014b; Yang et al. 2013).

3. Les liquides ioniques à base de noyau imidazolium

Le cation imidazolium jouit d'une grande popularité dans la communauté scientifique grâce à sa capacité à former facilement des liquides ioniques (Oh 2012). Une grande variété de LIs à base d'imidazolium a ainsi été obtenue et utilisée dans de nombreuses applications listées ci-après. Cette aptitude à être utilisé dans la synthèse de LIs est majoritairement due à la capacité du proton central du cycle, d'agir en donneur d'hydrogène. Il est cependant nécessaire de combiner un cation imidazolium à un accepteur d'hydrogène assez fort pour pouvoir créer le liquide ionique (Welton 2018). Le principe de la métathèse anionique est souvent utilisé dans la synthèse de liquide ionique (Figure I.8). Ainsi, cette méthode va permettre de substituer l'anion d'un sel d'halogénure par l'anion d'un autre sel inorganique choisi pour son anion. La purification peut ensuite se faire par simple filtration ou par extraction liquide-liquide selon la solubilité des produits.

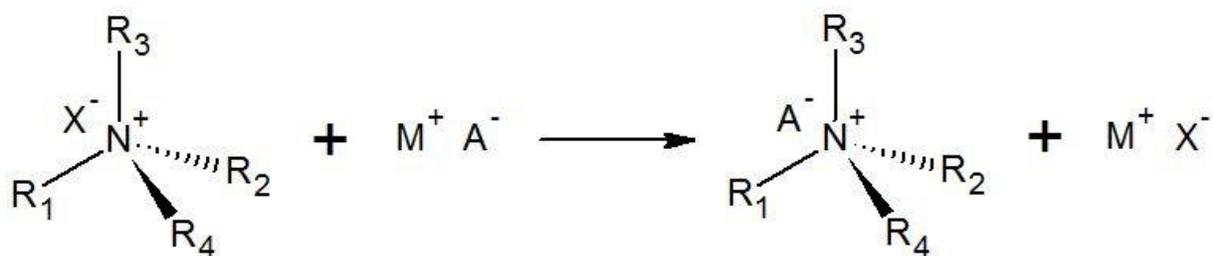


Figure I.8 : Schéma synthétique de la réaction de métathèse anionique (Jonathan Szymczak 2013).

4. Applications des liquides ioniques à base de noyau imidazolium

Les liquides ioniques et notamment ceux possédant un noyau imidazolium peuvent être utilisés dans de nombreux domaines d'applications. Leur grande stabilité thermique, électrochimique et leur conductivité en font de parfaits candidats pour des applications dans le stockage de l'énergie (Bag et al. 2016; Sagaidak et al. 2018 ; Zafer et al. 2009). Cette famille de LIs trouve aussi une place importante dans le domaine de la catalyse (Migowski and Dupont 2007). Les LIs à base de noyau imidazolium peuvent être également utiles, dans des réactions enzymatiques. Ils représentent une alternative intéressante aux solvants organiques classiques lors de réaction d'estérification (Jiang et al. 2009; Zarski et al. 2016; Wang et al. 2017; Zhao et al. 2017). En effet, leur capacité à solvater la biomasse lignocellulosique telle que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine a suscité un très fort engouement de la part de nombreux groupes de recherche (Badgujar and Bhanage 2015).

5. Solvatation de la biomasse par les liquides ioniques

Comme nous l'avons précisé auparavant, de nombreuses catégories de LIs existent mais tous ne présentent pas la capacité de solubiliser, même partiellement, les constituants des biomasses dites récalcitrantes, telles que la cellulose ou la chitine. Les liquides ioniques des familles imidazoliums et pyridiniums comme les chlorures d'alkylimidazoliums, les chlorures d'alkylpyridiniums, les carboxylates d'alkylimidazoliums et les dialkylphosphates (ou phosphonates) d'alkylimidazoliums ont démontré leur capacité à solubiliser la cellulose (Auxenfans et al. 2017; Liu et al. 2012; Verma et al. 2019). Dans le cas de la chitine, les LIs capables de solubiliser ce polymère sont répertoriés dans le Tableau I.3. Certaines structures de LIs sont également présentées Figure I.9. Le taux de solubilisation dépend de la structure du LI mais également du poids moléculaire, et du degré d'acétylation de la chitine.

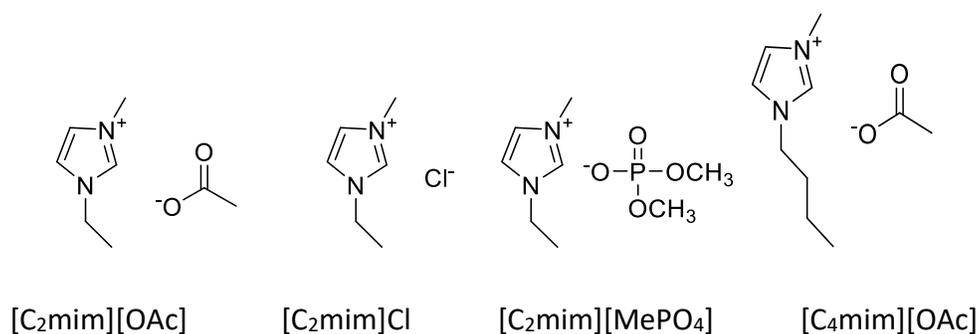


Figure I.9 : Structures de LIs à base de noyau imidazolium utilisés pour solubiliser le polymère de chitine.

Tableau I.3 : Solubilité de la cellulose et de la chitine dans les LI à base de noyau imidazolium après 1 h d'agitation à 100°C (Shamshina, 2019, Jena & Jena, 2010, Mikkola et al., 2007).

LIQUIDES IONIQUES	SOLUBILITÉ DE LA CHITINE (%) (100 °C ; 1 H)	SOLUBILITÉ DE LA CELLULOSE (%) ^A	PARAMÈTRES DE KAMLET TAFT		RÉFÉRENCES
			π	$-\beta$	
ACÉTATE DE 1-ÉTHYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM : [C ₂ MIM][OAC]	≥5 %	8	0.91 (90 °C)	1.23 (90 °C)	Sun et al. 2014
ACÉTATE DE 1-BUTYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM : [C ₄ MIM][OAC]	≥5 %	12	0.89 (90 °C)	1.18 (90 °C)	Doherty et al. 2010
CHLORURE DE 1-ÉTHYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM : [C ₂ MIM]Cl	Partiellement soluble	10-14	1.17 (80 °C)	0.95 (80 °C)	Fujita et al. 2013
CHLORURE DE 1-BUTYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM : [C ₄ MIM]Cl	Partiellement soluble	20	1.13 (Température non spécifiée)	0.95 (Température non spécifiée)	Spange 2008
CHLORURE DE 1-ALLYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM : [AMIM]Cl	Partiellement soluble	14.5	1.17 (Température non spécifiée)	0.83 (Température non spécifiée)	Jingyi Hu et al. 2014
BROMURE DE 1-ALLYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM : [AMIM]BR	≥5 %	Faible	ND	ND	
HEXAFLUOROPHOSPHATE DE 1-BUTYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM: [C ₄ MIM][PF ₆]	Insoluble	Insoluble	1.032 (25 °C)	0.207 (25 °C)	Lee, Ruckes, and Prausnitz 2008
TETRAFLUOROBORURE DE 1-BUTYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM : [C ₄ MIM][BF ₄]	Insoluble	Insoluble	1.047 (25 °C)	0.376 (25 °C)	Lee 2011
BIS(TRIFLUOROMÉTHYLSULFONYL)IMIDE DE 1-BUTYL-3-MÉTHYLIMIDAZOLIUM: [C ₄ MIM][NTF ₂]	Insoluble	Insoluble	0.984 (25 °C)	0.243 (25 °C)	Lee et al. 2008

^a Conditions optimisées pour chaque étude. ND : non déterminé.

La capacité d'un liquide ionique, à solubiliser la chitine ou d'autres polysaccharides, repose en partie sur sa capacité à perturber le réseau de liaisons hydrogène inter- et intra-chaînes. Le liquide ionique doit avoir de forts accepteurs de liaisons hydrogène pour pouvoir s'insérer dans les fibres et interagir avec de potentiels atomes d'hydrogène initialement liés à

d'autres fibres de chitine. Ce potentiel d'interaction est évalué en fonction de la valeur du paramètre beta (β), un des paramètres Kamlet-Taft. β est calculé en mesurant la différence relative de solvatochromisme dans le 4-nitroaniline et la *N,N*-diéthyl-4-nitroaniline.

$$\beta = \frac{(1.035 \cdot \nu(2)_{max} - \nu(1)_{max} + 2.64)}{2.8}$$

$\nu(1)_{max}$ et $\nu(2)_{max}$ correspondent à la longueur d'onde à laquelle l'absorbance maximale a été mesurée dans le 4-nitroaniline (1) et la *N,N*-diéthyl-4-nitroaniline (2) respectivement. β représente la basicité de l'accepteur d'électron, il s'agit du paramètre le plus important pour la solubilisation de la chitine et doit être supérieur à 0.5 pour être capable de solubiliser la chitine (Waghorne 2020; Shamshina 2019). Finalement, il s'établit une compétition entre les interactions des liquides ioniques avec la chitine et des fibres de chitines entre elles. Plus l'anion du liquide ionique montre une basicité importante, plus il sera capable de rompre le réseau des liaisons hydrogène, en se liant aux hydrogènes présents sur la chitine. Pour bien choisir le liquide ionique, il faut prendre en compte ce facteur (Shamshina 2019; W. T. Wang et al. 2010).

Comme présenté précédemment, les liquides ioniques peuvent être recyclés, le plus souvent par l'addition d'un anti-solvant, utilisé lors de la régénération du LI. Après séparation de l'anti-solvant par évaporation, le liquide ionique devient réutilisable. Dans le cas du LI [C₂mim][OAc], l'eau peut être utilisée comme anti-solvant. Les travaux de nos collaborateurs, réalisés sur une biomasse lignocellulosique (sciure de bois), prétraitée par [C₂min][OAc], ont montré qu'il était possible de recycler jusqu'à sept fois le LI avant de perdre en efficacité (Auxenfans, Buchoux, Larcher, et al. 2014). Cette aptitude, à être recyclée, est extrêmement importante puisqu'elle permet de réduire considérablement le coût du prétraitement et de s'inscrire dans une stratégie de chimie durable.

6. (Cyto)Toxicité des liquides ioniques à base de noyau imidazolium

Les liquides ioniques, et notamment ceux à noyau imidazolium, ne sont pas encore pleinement exploités, puisque leur coût de synthèse est souvent élevé en raison des purifications difficiles pour obtenir un produit final anhydre pur (Gnahm and Kolb 2011). De plus, un bon

nombre de liquides ioniques s'avèrent non biodégradables et très toxiques. Ils peuvent dénaturer les enzymes et perturber le fonctionnement cellulaire des organismes. En effet, Il est suspecté, que les cations des liquides ioniques réagissent et se lient avec les sites anioniques des enzymes, ce qui entraîneraient des modifications de leur structure tridimensionnelle pouvant conduire à une perte d'activité (Stock et al. 2004).

Les liquides ioniques perturbent le fonctionnement cellulaire des bactéries et gênent les activités biologiques et la croissance des cellules. Dans le cas des LIs à base de noyau imidazolium, plus les chaînes alkyles présentes sur le noyau sont longues, plus le LI sera toxique (Romero et al. 2008). Ces imidazoliums à longues chaînes perturberont la croissance des microorganismes (Ganske and Bornscheuer 2006). Il est suspecté que la présence de longues chaînes alkyles hydrophobes permette aux LIs de s'insérer dans les membranes des cellules, ce qui augmente leur perméabilité et peut induire leur rupture. La toxicité des imidazoliums peut être corrélée à leur caractère lipophile. La nature de l'anion, quant à lui, joue un rôle plutôt mineur dans leur cytotoxicité (Thuy Pham, Cho, and Yun 2010).

Les organismes, comme les algues, sont aussi sujets à la toxicité des imidazoliums puisque ces derniers perturberont le phénomène de la photosynthèse (Larson, Frost, and Lamberti 2008; Thuy Pham et al. 2010). Les plantes terrestres ne sont pas non plus épargnées par la toxicité de cette famille de LIs. En plus de perturber la photosynthèse, ils freineraient le développement des jeunes pousses. Cependant, il a été démontré qu'à faible concentration, les liquides ioniques favoriseraient la croissance des plantes (Lin-Song Wang et al 2009). Enfin, concernant ces plantes terrestres, plus un imidazolium semble hydrophobe, plus il est toxique pour la plante (Thuy Pham et al. 2010).

Certains LIs à noyau imidazolium, comme le bromure de 1-méthyl-3-octylimidazolium ($[C_8mim]Br$), sont connus pour déclencher de sévères irritations sur les organismes exposés (Li et al. 2009). De plus, une étude réalisée sur des grenouilles élevées en milieu aqueux ionique, montre que les embryons issus des grenouilles, présentent des malformations et un taux de mortalité bien plus important dans la phase de neuro-développement (Li et al. 2009). Les expositions majeures des organismes comme l'ingestion d'eau ou de nourritures souillées aux

liquides ioniques peuvent conduire à la mort, s'ils sont ingérés en trop grande quantité (Li et al. 2009).

Dans la majorité des cas, la toxicité des anions ne joue qu'un rôle mineur mais ces derniers peuvent être classés selon l'ordre de cytotoxicité décroissante suivant : $[\text{SbF}_6]^- > [\text{PF}_6]^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{CF}_3\text{SO}_3]^- > [\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OSC}_3]^- > [\text{Br}]^- \approx [\text{Cl}]^-$ (Stolte et al. 2006).

7. Stabilité et dégradation des liquides ioniques à noyau imidazolium

a. Dégradation forcée des noyaux imidazoliums

En raison de leur forte stabilité chimique et thermique, les liquides ioniques sont, par nature, peu biodégradables. Toutefois, ils peuvent être dégradés par oxydation chimique ou en étant soumis à de fortes températures. Pour ce qui est de la famille des imidazoliums, l'efficacité de ces deux types de dégradation dépend aussi de la longueur des chaînes alkyles présentes sur le noyau. Nous pouvons citer l'oxydation par H_2O_2 couplée à des rayonnements UV. Dans ce cas, même si les chaînes alkyles longues engendrent une forte résistance aux réactions d'oxydation, cette combinaison permet d'atteindre des taux de dégradation intéressants (Stepnowski and Zaleska 2005). À contrario, si la dégradation thermique est choisie, les longues chaînes alkyles facilitent la dégradation thermique (Awad et al. 2004).

b. Biodégradabilité des imidazoliums

Ces deux types de dégradations sont cependant forcées et ne se déroulent pas de manière naturelle. Les liquides ioniques restent donc très stables dans leur environnement. Certains micro-organismes parviennent, avec le temps, à les dégrader mais cela reste difficile en raison de la toxicité des liquides ioniques envers ces derniers. Il semble que les microorganismes parviennent à hydrolyser les liquides ioniques à l'aide d'enzymes qui reconnaissent certains groupements comme des amides et des esters. D'autres enzymes, spécifiques aux groupements acides carboxyliques ou hydroxyles, réduisent l'efficacité des LIs. En l'absence de groupement hydrolysable sur les LIs, les microorganismes sont incapables de dégrader efficacement les imidazoliums, c'est pourquoi les LIs sont généralement très peu biodégradables (Gathergood, Scammells, and Garcia 2006; Gathergood, Teresa, and Scammells 2004; Thuy Pham, Cho, and Yun 2010).

Par ailleurs, la nature de l'anion joue, cette fois-ci, un rôle dans le succès de la dégradation biologique. La biodégradabilité en fonction de l'anion décroît dans le sens suivant : $[\text{PF}_6]^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{Br}]^-$. Cela serait dû au caractère hydrophile des liquides ioniques composés de ces anions (Gathergood et al. 2006, 2004). La toxicité des produits de dégradation, commence à être étudiée et ces derniers sont généralement moins toxiques que les LIs. Cependant, de nombreuses études sont à poursuivre puisqu'un petit changement dans la structure d'un liquide ionique peut amener à une meilleure ou à une moins bonne dégradabilité (Jordan and Gathergood 2015).

La rétention des liquides ioniques dans les sols dépend beaucoup de leur composition et notamment des minéraux présents. Des interactions électrostatiques entre LIs et minéraux s'opèrent et peuvent même amener à des liaisons extrêmement stables pour les longues chaînes alkyles. Ces liaisons fortes s'effectuent aussi sur les sédiments marins. Cependant, la toxicité des liquides ioniques au niveau des sédiments marins n'a pas encore été étudiée (Stepnowski, 2005). Les liquides ioniques peuvent donc être extrêmement dangereux pour l'environnement et leur traitement après manipulation doit être précautionneux pour ne pas en déverser dans l'écosystème.

Néanmoins, certaines plantes sont capables de dépolluer les sols contaminés par des liquides ioniques, si leur concentration n'est pas trop élevée. Elles stockeront généralement le liquide ionique majoritairement dans leurs racines mais il peut aussi être présent dans leurs parties foliaires. Une plante fourragère, l'ivraie, a été étudiée pour sa capacité à éliminer $[\text{C}_4\text{min}][\text{Br}]$ de solutions aqueuses. Une fois dans la plante, 11 à 15 % du $[\text{C}_4\text{min}][\text{Br}]$ a été métabolisé en différents produits observables Figure I.10 (Habibul et al. 2019). Les métabolites sont, pour certains, obtenus par oxydation du $[\text{C}_4\text{min}][\text{Br}]$.

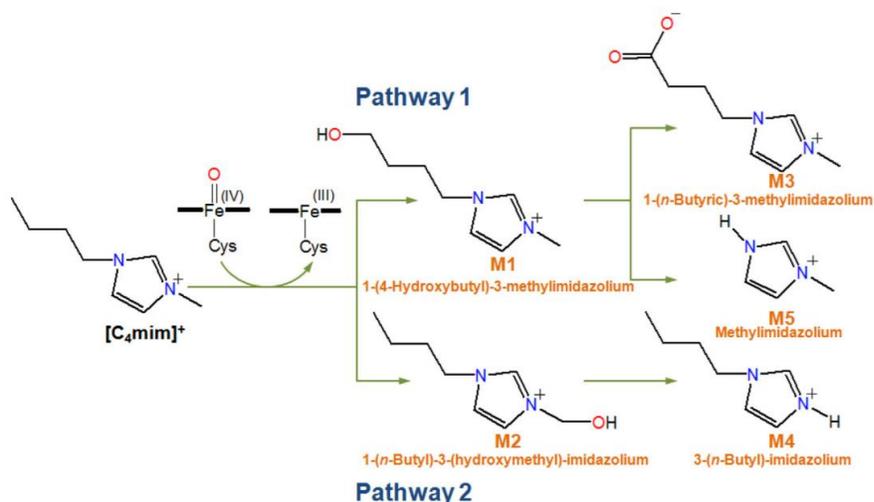


Figure I.10 : Biotransformation du [C₄mim]⁺ en différents métabolites dans l'ivraie (Habibul et al. 2019).

Le choix des LIs à base de noyau imidazolium ainsi que les conditions opératoires et les concentrations en LIs utilisées pour réaliser nos travaux de recherche lors de cette thèse ont fortement été influencés par l'ensemble de ces informations et des travaux réalisés au GEC (Auxenfans, Buchoux, Husson, et al. 2014; Auxenfans, Buchoux, Larcher, et al. 2014; Auxenfans, Husson, and Sarazin 2017).

IX. Objectif de nos travaux (Gael Huet et al. 2020)

L'objectif de ces travaux consiste à étudier l'impact des prétraitements aux liquides ioniques sur la chitine, dans le but, d'améliorer sa dépolymérisation enzymatique. La première étude est réalisée sur une chitine commerciale disponible et qui provient de carapaces de crustacés (Husson et al. 2017). La compréhension des changements structuraux, engendrés par le prétraitement aux liquides ioniques sur la chitine, est aussi l'un des grands aspects des deux études réalisées. Plusieurs types de chitinases ont été testés afin d'étudier leur sélectivité pour obtenir différents oligosaccharides. De plus, différentes méthodes de prétraitement ont été effectuées, dans le but de minimiser à la fois les quantités de liquide ionique utilisées et le nombre d'étapes à effectuer. Dans un second temps, la chitine provenant de plusieurs sources non commerciales seront testées dans les conditions les plus optimales (Gael Huet et al. 2020). Parmi ces sources, nous avons choisi celles provenant de différents insectes. En effet, si la littérature sur la chitine extraite de crustacés est abondante, elle l'est beaucoup moins sur celle

provenant des insectes. Certaines données peuvent être contradictoires ou simplement issues d'une simple extrapolation des données sur la chitine des crustacés. De plus, l'émergence de la bioraffinerie de l'insecte, nous a fortement incité à explorer cette chitine afin de la valoriser au mieux. Les deux sources de chitine (crustacés et insectes) seront caractérisées à différents niveaux d'extraction, dans le but de mieux comprendre la différence de composition de celles-ci et, en quoi, cela favorise leur utilisation à plus grande échelle. Enfin la fermentescibilité en milieu ionique par *Scheffersomyces stipitis* des hydrolysats obtenus a été étudiée (Figure I.11).

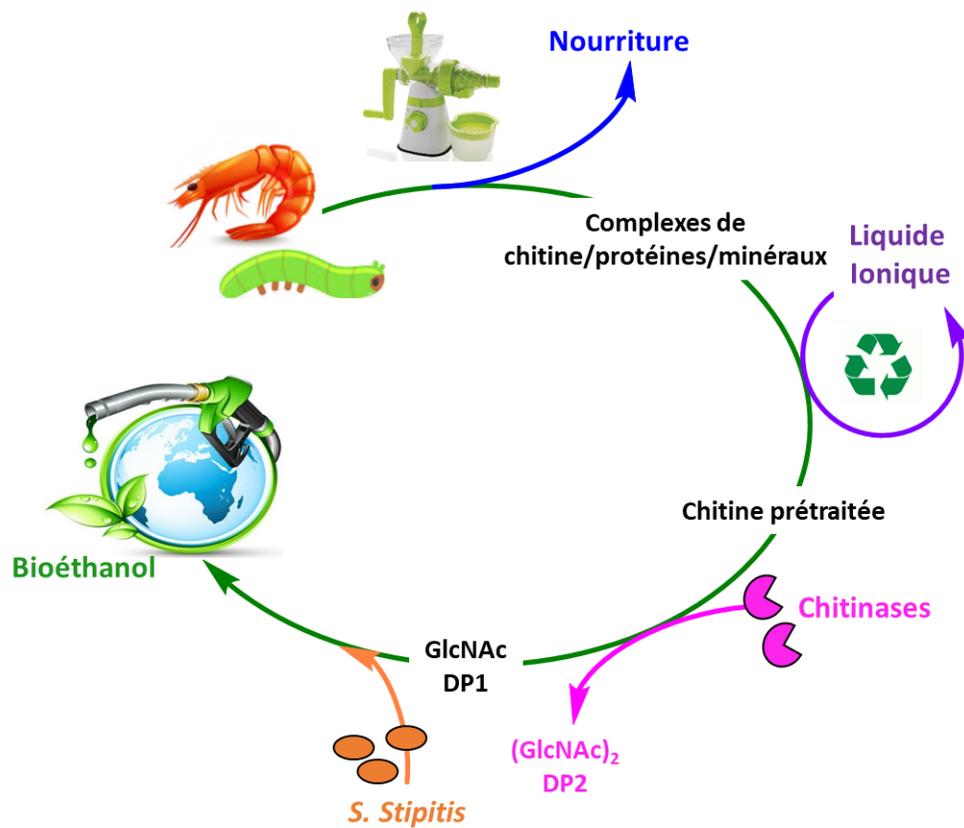


Figure I.11 : Transformation des biomasses chitineuses en bioéthanol.

Partie B : Articles, résultats et discussion

Article 1

1 **Effect of room temperature ionic liquids on selective**
2 **biocatalytic hydrolysis of chitin *via* sequential or**
3 **simultaneous strategies**

4 E. Husson,^a C. Hadad,^{b,c} G. Huet,^{a,b,c} S. Laclef,^{b,c} D. Lesur,^{b,c} V. Lambertyn,^a A. Jamali,^{c,d} S.
5 Cottise C. Sarazin,^a A. Nguyen Van Nhien,^{b,c*}

6 ^{a.} Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire, FRE CNRS 3580, Université de Picardie Jules
7 Verne - UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex 1, France.

8 ^{b.} Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378,
9 Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - UFR des Sciences – 80039 cedex Amiens,
10 France.

11 ^{c.} Institut de Chimie de Picardie, FR CNRS 3085, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue
12 Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

13 ^{d.} Plateforme de Microscopie Electronique - Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint-
14 Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

15 ^{e.} Laboratoire de Réactivité et de Chimie des Solides, UMR CNRS 7314 - Université de Picardie
16 Jules Verne, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

17 *Corresponding author: albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

18

19 **Abstract**

20

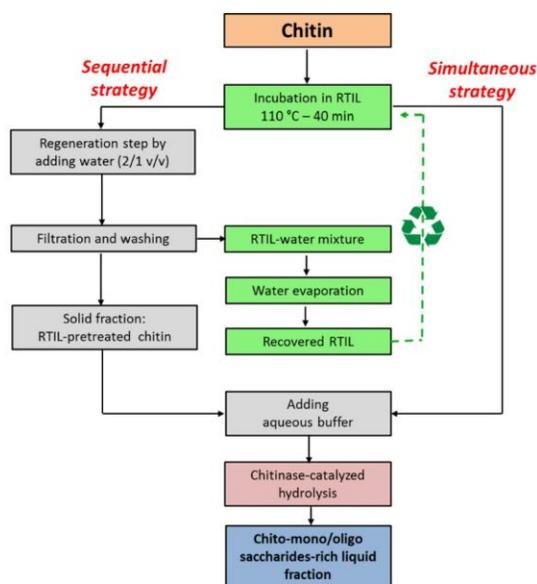
21 An efficient conversion of chitin, second most abundant renewable polymer on Earth, into *N*-
22 acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose, using room temperature ionic liquids (RTILs) and
23 commercially available chitinases is described for the first time. The sequential strategy consists in the use
24 of RTIL to pretreat chitin in mild conditions in a first step before enzymatic hydrolysis. [C₂mim][OAc] (1-
25 ethyl-3-methyl imidazolium) pretreatment provides an efficient production of *N*-acetylglucosamine (185.0
26 ± 4.0 mg / g chitin) or *N,N'*-diacetylchitobiose (667.60 ± 20.71 mg / g chitin) catalyzed by chitinase from
27 *Trichoderma viride* or *Streptomyces griseus*, respectively. Thorough investigation of structural changes of
28 chitin induced by RTIL pretreatment suggested an increase in enzymes accessibility to the chitin substrate.
29 Alternatively, an one-pot enzymatic hydrolysis of chitin in [C₂mim][OAc]-aqueous medium constitutes a
30 promising simultaneous route to generate selectively *N*-acetylglucosamine or *N,N'*-diacetylchitobiose by
31 decreasing the required [C₂mim][OAc] amount and the number of steps. Finally, the combination of the
32 two chitinases from *T. viride* and *S. griseus* was shown to be very relevant to considerably increase the
33 production of *N*-acetylglucosamine up to 760.0 ± 0.1 mg / g chitin.

34

35 Introduction

36 Chitin is mainly extracted from crabbing and shrimping industries wastes and has become of great interest
37 thanks to its excellent chemical, biological and physical properties.¹⁻³ This natural biopolymer is composed
38 of (1 → 4) linked 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl units and represents the most abundant
39 polysaccharide after cellulose which can be easily purified by subsequent removal of the proteins and
40 dissolution of calcium carbonate. Production of mono/oligosaccharides with biological properties from
41 chitin biomass constitutes a promising valorization way within the transition to a future bioeconomy,^{2, 4}
42 where chitin is recently referred as shell biorefinery. For instance, the monomer *N*-acetylglucosamine
43 exhibits interesting antitumoral and antimicrobial properties,⁵ is considered as a promising platform
44 molecule for osteoarthritis drug development⁶ and can be also used as a fermentable sugar for the direct
45 microbial production of biofuel.⁷ In the same way, the dimer *N,N'*-diacetylchitobiose represents a highly
46 valuable chito-oligosaccharide possessing complementary physiological activities compare to *N*-
47 acetylglucosamine and is therefore an attractive platform molecule for the production of bioactive
48 oligomers.^{8, 9} In this context, the development of cost-effective and sustainable processes, which follows
49 the current environmental requirements, is essential. Enzymatic hydrolysis of chitin catalyzed by chitinases
50 is a recognized route for generating chito-mono/oligosaccharides such as *N*-acetylglucosamine, *N,N'*-
51 diacetylchitobiose or larger chito-oligomers.¹⁰⁻¹³ In opposite to chemical route, advantages of this
52 biocatalytic strategy are the use of mild conditions (low temperature process, buffered aqueous medium),
53 the specificity of reactions and thus, the decrease in by-products generation.^{4, 14, 15} However, enzymatic
54 activity is constrained by the complex supramolecular structure of chitin, in a similar manner as other
55 recalcitrant polysaccharides, such as cellulose.^{16, 17} Indeed, depending on its sources and microfibrils
56 arrangement, chitin occurs in three different crystalline allomorphs: α-chitin, by far the most abundant, β-
57 chitin or γ-chitin.^{18, 19} Pretreatment, consisting in an incubation step, by analogy to the biochemical pathway
58 on lignocellulosic biomass constitutes thus a key preliminary step to affect the supramolecular structure of
59 biopolymers such as chitin, in order to achieve an efficient bioconversion into mono/oligomers as widely
60 described for cellulosic biomass.^{17, 20} A large panel of innovative pretreatments such as mechanochemical
61 grinding, treatment with sub- or super-critical fluids, ultrasonication or steam explosion can be applied to
62 chitin for improving enzymatic production of chito-mono/oligosaccharides.^{8, 21-24} To our knowledge, room
63 temperature ionic liquid (RTIL)-pretreatment has never been applied on chitin, in order to improve
64 enzymatic digestibility. Several studies involving both chitin and imidazolium-based RTILs are reported in
65 the literature. Among these investigations, two main objectives were reflected: (i) RTILs can be considered
66 as alternative solvents to extract chitin fibers with high purity and high molecular weight from crustacean
67 waste²⁵⁻²⁷ and (ii) RTIL-pretreatments can be also applied on extracted chitin for facilitating chemical and

68 physical modifications, to form hydrogels, films or reversible sorbent for CO₂. More recently, Aspral *et al.*
69 demonstrated beneficial impact of some imidazolium-based RTIL on chitin deacetylase activity.^{3, 28-35}
70 In this context, we selected in the present work two imidazolium-based RTILs: 1-ethyl-3-
71 methylimidazolium acetate, [C₂mim][OAc] and 1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate,
72 [C₂mim][MeO(H)PO₂] to implement RTIL-pretreatments of chitin prior to enzymatic route. Structures and
73 physicochemical properties of these two RTILs were reported in the ESI Table S1. It has been increasingly
74 recognized for cellulosic polymer, that the pretreatment with these two RTILs improves enzymatic
75 saccharification.³⁶⁻⁴² In addition their short alkyl chain length (shorter than 4 carbons) confers a low
76 toxicity.⁴³⁻⁴⁶ Furthermore, recent studies focusing on various lignocellulosic biomasses demonstrated the
77 feasibility of these two RTILs to be recycled and reused without loss of pretreatment efficiency.^{37, 39, 47}
78 In addition, it has been shown a compatibility between cellulolytic enzymes and [C₂mim][OAc] or
79 [C₂mim][MeO(H)PO₂] in some range of concentration which enable the implementation of simultaneous
80 pretreatment and enzymatic saccharification in one pot process.^{40, 48} It is worth mentioning that such
81 innovative process, using simultaneous strategy for chitinase-catalyzed degradation of chitin has never been
82 previously reported in the literature.
83 Herein, we describe a sequential and simultaneous strategy for converting chitin into chito-
84 mono/oligosaccharides by using RTILs and chitinases (Flowchart 1). The impact of RTIL-incubation was
85 studied by following both the enzymatic performance and the selectivity, in relation with structural
86 properties of untreated and pretreated chitin fibers. Moreover, the performance of *in situ* chitinase-catalyzed
87 hydrolysis of chitin in RTIL-aqueous media was investigated and compared to those of sequential strategy.
88 Finally, impact of chitinases combinations in both sequential or simultaneous strategies and their effect on
89 selectivity and performances was discussed.
90



91

92 Flowchart 1. Sequential and simultaneous strategies for the biocatalytic conversion of chitin.

93

94 Results and discussion

95 The two selected chitinases from *Trichoderma viride* or *Streptomyces griseus* were chosen for their ability
 96 to produce selectively *N*-acetylglucosamine or *N,N'*-diacetylchitobiose in aqueous media, respectively.^{8,21}
 97 These enzymes (E.C.3.2.2.14) are glycosyl hydrolases which act in processive manner in order to hydrolyze
 98 β -1,4 glycosidic bonds of the chitin chains.^{49,50} These enzyme mixtures are composed of (i) endochitinases
 99 (E.C. 3.2.1.14) which act randomly in internal regions of chitin and generate *N,N'*-diacetylchitobiose and
 100 soluble low molecular mass oligomer of *N*-acetylglucosamine such as chitotriose, and chitotetraose; (ii)
 101 chitobiosidases (E.C. 3.2.1.29) which hydrolyze non-reducing chains extremities of chitin microfibrils,
 102 releasing *N,N'*-diacetylchitobiose; and β -1,4-glucosaminidases (E.C. 3.2.1.30) which cleaves oligomeric
 103 products of endochitinases and chitobiosidases into monomers of *N*-acetylglucosamine.⁵⁰

104

105 Sequential RTIL-pretreatment of chitin and enzymatic hydrolysis

106

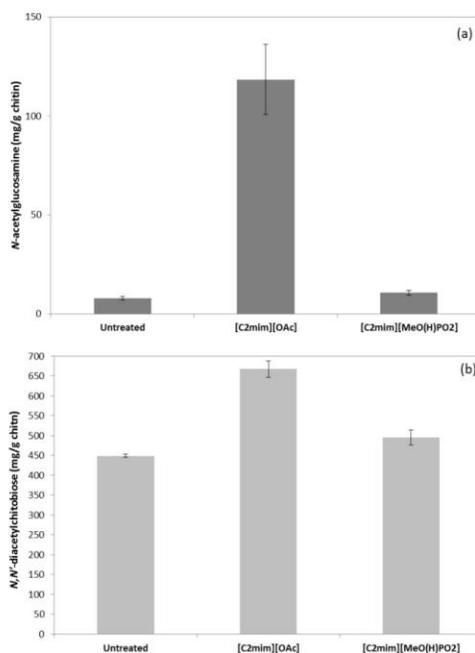
107 The impact of [C₂mim][OAc] or [C₂mim][MeO(H)PO₂] pretreatments of chitin on enzymatic production
 108 of chito-mono/oligosaccharides was investigated. The yield of chito-mono/oligosaccharides obtained at 24
 109 h after enzymatic hydrolysis catalyzed by either chitinase from *T. viride* or *S. griseus* are reported in Fig.

110 1. No hydrolysis product was detected in the media without enzyme or with enzyme after thermal
111 deactivation.

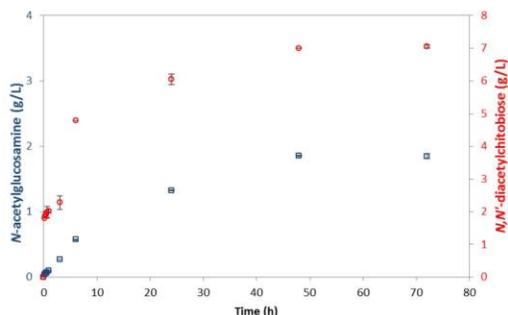
112 First of all, analyses of each hydrolysate showed a difference of enzymatic selectivity particularly marked
113 between the two chitinases, probably due to distinct endochitinases / chitobiosidases / β -1,4-
114 glucosaminidases composition of each commercially available enzyme preparations. Indeed, hydrolysates
115 obtained with the chitinase from *T. viride* contained mainly the monomer of *N*-acetylglucosamine with a
116 low residual amount of the dimer *N,N'*-diacetylchitobiose (< 4 mg / g chitin), while chitinase from *S. griseus*
117 led to a hydrolysis medium enriched in *N,N'*-diacetylchitobiose with a very low concentration of *N*-
118 acetylglucosamine (< 1 mg / g chitin). These results are in agreement with previous studies.^{8,21} For chitinase
119 from *T. viride* (Fig. 1a), enzymatic degradation of untreated chitin led to a *N*-acetylglucosamine yield of
120 7.89 ± 0.90 mg / g chitin. [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreatment did not improve enzymatic degradation into
121 *N*-acetylglucosamine as illustrated by a yield of 10.74 ± 1.40 mg / g chitin. This result suggested that
122 [C₂mim][MeO(H)PO₂] was not a suitable RTIL to facilitate subsequent enzymatic degradation of chitin
123 contrary to previously demonstrated for other polysaccharide (e.g. α -cellulose).⁴¹ Interestingly,
124 [C₂mim][OAc]-pretreatment led to a clear improvement of enzymatic conversion of chitin into *N*-
125 acetylglucosamine with a yield increased by a factor of 15 (118.38 ± 17.59 mg / g chitin) compared to
126 untreated chitin. [C₂mim][OAc] was thus demonstrated as an appropriate solvent to efficiently pretreat
127 chitin in order to improve its enzymatic degradation into monomer. The time profile of *N*-
128 acetylglucosamine concentrations during the *T. viride* chitinase-catalyzed hydrolysis of [C₂mim][OAc]-
129 pretreated chitin is presented in Fig. 2. Kinetic performances were characterized by an apparent initial rate
130 of 2.75 ± 0.08 mg.L⁻¹.min⁻¹ and a final yield of *N*-acetylglucosamine of 185.0 ± 4.0 mg / g chitin obtained
131 after 48 h, a required duration to achieve thermodynamic equilibrium in this reaction system.

132 Concerning selective production of *N,N'*-diacetylchitobiose by chitinase from *S. griseus* (Fig. 1b), the yield
133 obtained for untreated chitin was significantly higher than the one of *N*-acetylglucosamine described above
134 (448.64 ± 3.56 mg / g chitin). [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin did not lead to higher performances.
135 Although improvement of enzymatic degradation after [C₂mim][OAc]-pretreatment was less pronounced
136 with this enzyme, a significant increase in *N,N'*-diacetylchitobiose yield by a factor 1.5 was observed
137 (667.60 ± 20.71 mg / g chitin). Representative HPLC chromatograms of supernatant of hydrolysate together
138 with the corresponding standard were presented in the ESI (Fig. S1a) confirming the selectivity of the
139 enzymatic hydrolysis. Quantitative monitoring of *N,N'*-diacetylchitobiose production during the *S. griseus*
140 chitinase-catalyzed hydrolysis of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin is presented in Fig. 2. Apparent initial
141 rate of production was estimated to be 101.1 ± 3.4 mg.L⁻¹.min⁻¹ with a final yield of 705.0 ± 5.0 mg / g
142 chitin obtained at 48 h. As presented in Table 1 (entry 7) competitive yield of *N,N'*-diacetylchitobiose could
143 be selectively achieved in using [C₂mim][OAc] and this chitinase in comparison with relevant results

144 obtained by enzymatic hydrolysis after supercritical water, mechanochemical grinding or chemical
145 pretreatments.^{8, 21, 51, 52}
146 Finally, contrary to [C₂mim][MeO(H)PO₂], [C₂mim][OAc] was demonstrated particularly suitable to
147 efficiently pretreat chitin in mild conditions prior to an efficient and selective enzymatic production of *N*-
148 acetylglucosamine or *N,N'*-diacetylchitobiose. Constitutive anionic moiety of RTIL may thus influence the
149 efficiency of the pretreatment of chitin and subsequent enzymatic degradation. As already suggested in
150 previous studies, Kamlet-Taft parameters of RTILs constitute pertinent indicators of either hydrogen-bond
151 basicity (β) or hydrogen-bond acidity (α) of the RTILs.⁵³ More precisely difference between β and α
152 reflecting the net basicity can be used to estimate the ability of a RTIL to solvate recalcitrant biopolymers.
153 We suggest that the net basicity of 0.48 for [C₂mim][MeO(H)PO₂] would not be sufficient to efficiently
154 solvate and disorganize chitin fibers during the pretreatment contrary to [C₂mim][OAc] with a net basicity
155 of 0.64. Structural disruption induced by the pretreatment will be discussed in the following section and
156 will be related to the subsequent enzymatic performances.
157



158
159 Figure 1. *N*-acetylglucosamine or *N,N'*-diacetylchitobiose yield (mg / g chitin) at 24 h of enzymatic
160 hydrolysis of chitin, with or without RTIL-pretreatments, catalyzed by the respective chitinase from *T.*
161 *viride* (a) or *S. griseus* (b).



162

163 Figure 2. Kinetic profiles of *N*-acetylglucosamine production during hydrolysis of [C₂mim][OAc]-pretreated
 164 chitin catalyzed by the chitinase from *T. viride* (blue square) and *N,N'*-diacetylchitobiose production during
 165 hydrolysis of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin catalyzed by the chitinase from *S. griseus* (red circle).

166

167 Table 1. Relevant yields and selectivity of enzymatic strategies producing chito-mono/oligosaccharides
 168 from literature data compared with the present study.

Entry	Source	Chitin properties	Pretreatment	Enzyme	Reaction medium	Chito-mono/oligosaccharides yield ^a (mg / g chitin)		Reference
						<i>N</i> -acetylglucosamine	<i>N,N'</i> -diacetylchitobiose	
1	Crab	α -chitin	Supercritical water	Chitinase from <i>Streptomyces griseus</i>	Aqueous buffer	< 50	370	8
2	Crab	α -chitin	Mechanochemical grinding	Chitinase from <i>Streptomyces griseus</i>	Aqueous buffer	38	380	21
3	Na ^b	Highly purified chitin	DMSO + LiCl	Chitinase from <i>Vibrio furnissii</i>	Aqueous buffer	22	415	52
4	Crab	α -chitin	Phosphoric acid	Chitinase from <i>Aeromonas sp.</i>	Aqueous buffer	628	< 5	58
5	Crab	α -chitin	Hydrochloric acid	Chitinase from <i>Aeromonas sp.</i>	Aqueous buffer	420	< 5	59
6	Shrimp shell	α -chitin	None	Chitinase from <i>Streptomyces griseus</i>	Aqueous buffer	< 1	449	Present study
7	Shrimp shell	α -chitin	[C ₂ mim][OAc]	Chitinase from <i>Streptomyces griseus</i>	Aqueous buffer	< 1	705	Present study
8	Shrimp shell	α -chitin	Simultaneous pretreatment and <i>Streptomyces griseus</i> chitinase-catalyzed hydrolysis in diluted [C ₂ mim][OAc] (10 % v/v)-aqueous medium			< 1	574	Present study
9	Shrimp shell	α -chitin	[C ₂ mim][OAc]	Combination of chitinase from <i>Streptomyces griseus</i> then chitinase from <i>Trichoderma viride</i>	Aqueous buffer	760	< 4	Present study

169

170 ^a Converted yield. ^b Not documented.

171

172 Impact of sequential RTIL-pretreatment on structural and morphological properties of chitin

173 SEM micrographs of untreated chitin (Fig. 3 and see also ESI Fig. S2) displayed large particles ranging
 174 from several tens to several hundred of micrometers. At higher magnification, fiber-like structure of chitin
 175 can also be observed together with an entangled structure, according to previous SEM analyses of native
 176 chitin.⁵⁴ These structural features were also noticed in the SEM micrographs of the [C₂mim][MeO(H)PO₂]-
 177 pretreated chitin (Fig. 3, see also ESI Fig. S3) suggesting that [C₂mim][MeO(H)PO₂] did not affect the
 178 structure of chitin. This could explain the similar performances of enzymatic degradation obtained for both
 179 [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin and untreated chitin. On the contrary, [C₂mim][OAc]-pretreatment

180 caused dramatic morphological changes in the chitin polymer where large particles were not observed
181 anymore in favor of unrolled and more expanded structure with separated sheets (Fig. 3, see also ESI Fig.
182 S4).

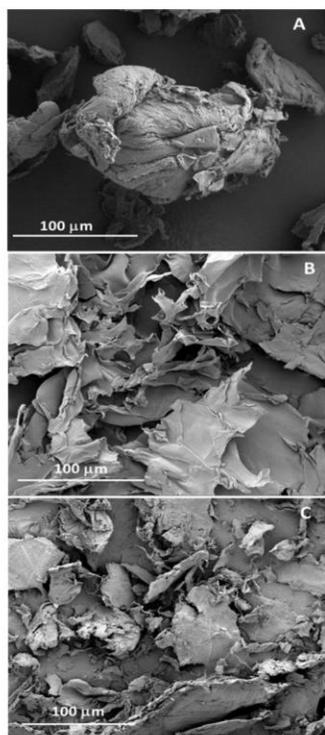
183 In addition, the fiber organization seemed to be less defined. It could be noticed that the two RTILs tested
184 did not seem to induce changes similar to those described for chitin regenerated from chloride ionic liquids.

185 ²⁹

186 Intra-crystalline disruptions caused by [C₂mim][OAc] have been also pointed out, thanks to the X-ray
187 powder diffraction (XDR) analysis (Fig. 4). From the diffractograms and using the amorphous subtraction
188 region method,⁵⁵ crystallinity index (CrI) have been calculated and found to be 75, 50 and 74% for
189 respectively the untreated chitin, [C₂mim][OAc]-pretreated chitin and [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated
190 chitin.

191 The decrease of CrI for [C₂mim][OAc]-pretreated chitin would be consistent with the above SEM
192 observations. Chitin fibers, after pretreatment with this RTIL, would be more accessible to chitinase due to
193 the breakdown of the intermolecular and intramolecular hydrogen bonds network²⁸ and conversely for
194 [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin.

195 Untreated chitin and RTIL-pretreated chitins were also subjected to solid-state CP-MAS ¹³C NMR and
196 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (see ESI Figs. S5 to S8). As expected the degree of
197 acetylation (DA), defined as the average number of *N*-acetyl-D-glucosamine units per 100 monomers and
198 expressed as a percentage, was evaluated by solid-state ¹³C NMR. Whatever the RTIL used for
199 pretreatment, degrees of acetylation were not affected. Values ranged from 87 to 94% (See ESI, Figs. S5
200 to S7).



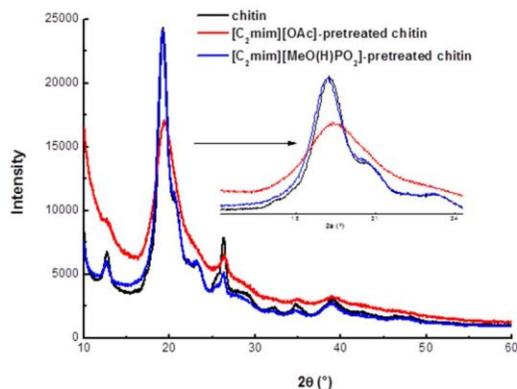
201

202 Figure 3. SEM images of untreated chitin (A), [C₂mim][OAc]-pretreated chitin (B) and
203 [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin (C).

204

205 Fig. S8 into ESI illustrates the FT-IR spectra collected within the range 4000-500 cm⁻¹ directly from the
206 untreated and RTIL-pretreated chitin powders and using ATR technique. Spectra were very similar, 3 peaks
207 at around 1660, 1624 and 1555 cm⁻¹ were observed, corresponding to the alfa-form of chitin.

208 Structural investigation suggested that significant improvement of enzymatic degradation of chitin into
209 chito-mono/oligosaccharides could be related to structural changes confirmed by a crystallinity index
210 decrease after [C₂mim][OAc]-pretreatment.



211
 212 Figure 4. Diffractograms of untreated chitin (black line), [C₂mim][OAc]-pretreated chitin (red line) and
 213 [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin (blue line).

214

215 **Simultaneous pretreatment and enzymatic hydrolysis of chitin in [C₂mim][OAc]-aqueous media**

216

217 In view of diminishing the number of steps and reducing the amount of RTIL, we investigated the feasibility
 218 of simultaneous RTIL-pretreatment together with the enzymatic hydrolysis (see Flowchart 1). One-pot
 219 enzymatic hydrolyses of chitin catalyzed by either chitinase from *T. viride* or *S. griseus* in [C₂mim][OAc]-
 220 aqueous medium were carried out with various [C₂mim][OAc] concentrations. To our knowledge, the
 221 implementation of chitinases in these non-conventional media was never reported in the literature. Yields
 222 of chito-mono/oligosaccharides obtained after 24 h were presented in Fig. 5. Firstly, analyses of
 223 hydrolysates showed that the presence of RTIL in aqueous media did not modulate the strong selectivity of
 224 each enzyme. Similarly to the sequential strategy, chitinase from *T. viride* generated mainly *N*-
 225 acetylglucosamine and the main product obtained with chitinase from *S. griseus* was *N,N'*-
 226 diacetylchitobiose. With the chitinase from *T. viride* (Fig. 5a), the best yield of *N*-acetylglucosamine are
 227 shown at 5% v/v of RTIL (77.26 ± 2.34 mg / g chitin *versus* 7.89 ± 0.90 in the net aqueous medium,
 228 displaying an increase by a factor 9.8). At 10% v/v of [C₂mim][OAc], activity of chitinase from *T. viride*
 229 was slightly decreased but remained close to the highest value. From 20% v/v of [C₂mim][OAc], important
 230 decrease of yields were observed. This loss of performances could be due to chitinase deactivation induced
 231 by a larger amount of RTIL as suggested in previous studies for cellulolytic enzymes.^{40, 56} At 30% v/v, *N*-
 232 acetylglucosamine yields became similar to those obtained without RTIL. From 40% v/v no *N*-
 233 acetylglucosamine was detected in the medium suggesting a total deactivation of chitinase. The higher
 234 performance obtained with 5% v/v of [C₂mim][OAc] was inferior to those of sequential route (118.38 ±

235 17.59 mg / g chitin) and may suggest that the simultaneous strategy for *N*-acetylglucosamine production
236 was not the most suitable pathway.

237 Chitinase from *S. griseus* compatibility with [C₂mim][OAc] is illustrated by higher yields of *N,N'*-
238 diacetylchitobiose in presence of 5 and 10% v/v of RTIL in the reaction medium than net aqueous buffer
239 (Fig. 5b). For 20% v/v of RTIL, yield of *N,N'*-diacetylchitobiose was always strictly superior to those
240 obtained in the net aqueous medium. From 30% v/v of RTIL enzymatic activity was severely affected until
241 total deactivation above 40% v/v of RTIL. Highest performances obtained with this enzyme were inferior
242 to those obtained by sequential strategy (573.72 ± 5.99 versus 667.60 ± 20.71 mg / g chitin, respectively)
243 but remained also satisfactory in comparison with literature data (Table 1, entry 8).

244 These results demonstrated for the first time the activity of the two distinct chitinases from *T. viride* and *S.*
245 *griseus* with [C₂mim][OAc] in aqueous media. From 5 to 20% v/v of RTIL, the achieved yields were always
246 superior to those obtained without RTIL. The increase in yield could be due to a compromise between
247 beneficial effect of structural disorganization of chitin, leading to better accessibility, and detrimental effect
248 of chitinase denaturation as described for cellulolytic enzymes in a similar reaction media.⁴⁰ We
249 demonstrated thus that 5% v/v of RTIL led to the highest performances to produce efficiently and
250 selectively *N*-acetylglucosamine or *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin in minimizing considerably the
251 required RTIL amount (RTIL /chitin ratio: 5 mL / g vs 50 mL / g) and the number of steps required for the
252 sequential strategy.

253

254 **Impact of chitinases combinations on enzymatic hydrolysis of chitin**

255

256 We proposed herein to investigate the influence of mixing both commercial chitinases preparations on
257 selectivity and performances of the sequential and simultaneous strategies. Enzymatic hydrolyses of
258 untreated or [C₂mim][OAc]-pretreated chitin were implemented in aqueous buffer by mixing the two
259 chitinases from *T. viride* and *S. griseus*, introduced either together for 24 h of reaction (abbreviated by
260 Tv+Sg) or in two subsequent steps (abbreviated by Tv►Sg or Sg►Tv), the second enzyme being added
261 after 24h of the first one. Same approach was applied to untreated chitin in diluted [C₂mim][OAc]-aqueous
262 (5% v/v) reaction system, RTIL concentration for which higher yields were obtained. Schematic overall
263 procedure is described in Fig.6. The yield of *N*-acetylglucosamine obtained for the different conditions
264 described above is depicted in Fig. 7. The selectivity resulted from mixing both chitinases was mainly
265 oriented toward the production of monosaccharide *N*-acetylglucosamine with residual *N,N'*-
266 diacetylchitobiose yield inferior to 4 mg / g chitin, whatever the tested combinations (Tv+Sg, Tv►Sg or
267 Sg►Tv), nor substrate (untreated or pretreated) or reaction medium (net aqueous buffer or with 5% v/v of
268 RTIL).

269 This selectivity, particularly for Tv►Sg combination, may suggest a potential product inhibition of
270 constitutive chitobiosidases from *S. griseus* by the high concentration of *N*-acetylglucosamine generated by
271 the chitinase from *T. viride*.⁵⁷

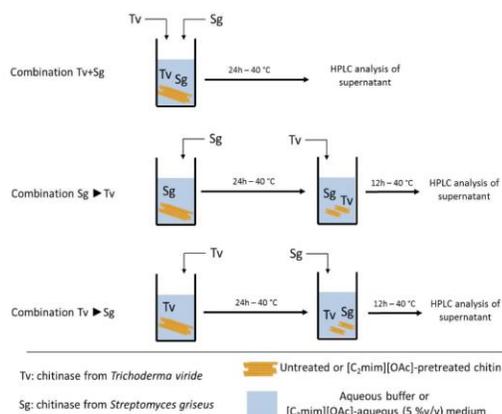
272 Concerning the untreated chitin (Fig. 7a), the three combinations of chitinases led to *N*-acetylglucosamine
273 yields strictly superior to those obtained with the single chitinase from *T. viride* (7.89 ± 0.90 mg / g chitin)
274 and near or even superior to those obtained with the sequential strategy including RTIL-pretreatment
275 (118.38 ± 17.59 mg / g chitin).

276 These enzyme combination methods were then applied to [C₂mim][OAc]-pretreated chitin (Fig. 7b). For
277 the three enzymes combinations tested, the yields were significantly improved by an average factor of 4.5
278 in comparison with results obtained for untreated chitin (see Fig. 7a). This improvement was consistent
279 with our previous explanations connecting structural changes of chitin induced by the [C₂mim][OAc]-
280 pretreatment to the better accessibility to chitinases. In comparison with literature data^{58, 59} (Table 1, entry
281 9), the Sg►Tv combination applied to [C₂mim][OAc]-pretreated chitin led to best yield and constituted a
282 very competitive production method of *N*-acetylglucosamine (760.0 ± 0.1 mg / g chitin). Representative
283 HPLC chromatograms of supernatant of hydrolysate together with the corresponding standard were
284 presented in the ESI (Fig. S1b).

285 This promising result suggested that the Sg►Tv combination would provide a beneficial synergy between
286 the two enzymes preparations. Based on literature data,^{49, 50} we suggested that the constitutive
287 chitobiosidases from *S. griseus* chitinase would firstly catalyze the degradation of chitin into *N,N'*-
288 diacetylchitobiose dimer during the first 24 h. In a second time, the supplementation in chitinase from *T.*
289 *viride* and particularly its constitutive β -1,4-glucosaminidases would allow the conversion of the large
290 amount of *N,N'*-diacetylchitobiose into *N*-acetylglucosamine.

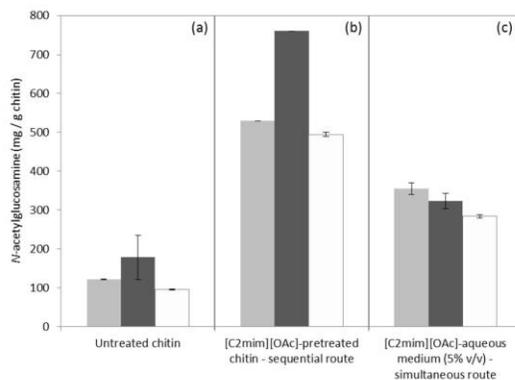
291 Finally, chitinases combinations were tested for the simultaneous strategy in diluted [C₂mim][OAc]-
292 aqueous (5% v/v) medium (Fig. 7 c). Overall, the performances were significantly higher than those
293 obtained in the net aqueous buffer for the similar enzymes combinations (compare to Fig. 7a). Therefore,
294 we have shown that the simultaneous strategy with the three chitinase combinations led to better yields for
295 the production of *N*-acetylglucosamine (between 284 and 355 mg / g chitin) in comparison with
296 performances obtained with the single chitinase from *T. viride* in similar non-conventional medium (77.26
297 ± 2.33 mg / g chitin).

298
299
300
301
302



303
304
305
306

Figure 6. Schematic overall procedure for investigating the impact of chitinases combinations on enzymatic hydrolysis of chitin.



307
308
309
310
311
312
313
314
315

Figure 7. *N*-acetylglucosamine yields obtained by enzymatic hydrolysis of chitin in aqueous buffer without (a) or with [C₂mim][OAc]-pretreatment (b) and by *in situ* enzymatic hydrolysis in diluted [C₂mim][OAc]-aqueous medium (5% v/v) (c). These reactions were catalyzed by the equimass mixture of chitinases from *T. viride* and *S. griseus* for 24 h (light grey bars), the chitinase from *S. griseus* for 24 h then supplemented by the chitinase from *T. viride* for 12h (dark grey bars) and the chitinase from *T. viride* for 24h then supplemented by the chitinase from *S. griseus* for 12h (white bars).

316 **Experimental**

317 **Chemicals and enzymes**

318 Mineral acids and bases were used in their highest concentration commercially available, from Sigma-
319 Aldrich (Steinheim, Germany). Chitin from shrimp shells, chitinase from *Trichoderma viride* and chitinase
320 from *Streptomyces griseus* were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) with specific activity \geq
321 600 U/g solid and \geq 200 U/g solid, respectively. One unit will liberate 1.0 mg of *N*-acetyl-D-glucosamine
322 from chitin per hour at pH 6.0 at 25 °C in a 2 hour assay. 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate
323 ([C₂mim][OAc], > 98%) and 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([C₂mim][MeO(H)PO₂], > 98%) were
324 purchased from Solvionic SA (Verniolle, France). *N*-acetylglucosamine purchased from Sigma–Aldrich
325 (Germany) and *N,N'*-diacetylchitobiose from Elicityl, (France).

326

327 **Instruments**

328 Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine the microstructure of untreated and pretreated
329 chitins. A small amount of dried samples (powder) was placed on double-sided carbon tape adhered to
330 aluminum SEM stubs. They were then coated with a 20-nm layer of gold and examined using a Quanta
331 200 FEG scanning electron microscope (FEI Co., USA). The micrographs were obtained with a secondary
332 electron detector at an accelerating voltage of 5 or 2 kV and saved as TIFF files. Infrared spectra were
333 obtained by using a Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometer (IRaffinity-1S, Shimadzu) and ATR
334 method with a germanium prism (MIRacle 10, Shimadzu). X-Ray Powder Diffraction patterns (XRPD) were
335 acquired using a Bruker D4 Endeavor diffractometer equipped with a Cu anti-cathode (K α radiation,
336 operating at 40 kV–40 mA). Patterns were collected in the 2 θ range of 10–60° with a step size of 0.03° and
337 using a low background silicon holder (Bruker AXS, C79298A3244B261). Crystallinity indexes (Crl) were
338 calculated from the XDR diffractograms using the amorphous subtraction region method.⁵⁵ Solid-state
339 ¹³C NMR spectra were obtained with 4 mm CP-MAS probe operating at 125.7452 MHz on a Bruker DRX
340 500 at room temperature. The spinning rate was 5 kHz with 2 ms contact times and 5 s delay between
341 scans (2048 scans). DA were calculated from the intensity of *N*-acetyl carbon atom divided by the
342 summation intensities of carbon atoms of the D-glucopyranosyl ring.⁶⁰ Liquid chromatography high
343 performance Dionex Ultimate 3000 (Thermo scientific, Sunnyvale, CA, USA) consisting of an automatic
344 sample changer, a pump and a detector type refractometer (RefractoMax 520), the column was a
345 HyperRez XP Carbohydrate H⁺ (300 x 7.7 mm) equipped with a pre-column, kept at 75 °C. The isocratic
346 mode is used, with ultra-pure water as mobile phase; flow rate was 0.6 ml/min. The retention times of *N*-

347 acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose were 14.6 min (\pm 0.31%) and 12.0 min (\pm 0.18%),
348 respectively. Quantification was based on calibration curves established using standard *N*-
349 acetylglucosamine and *N, N'*-diacetylchitobiose.

350 Mass spectral data of each hydrolysis product were acquired on a WATERS Micromass™ Q-TOFF
351 spectrometer to confirm selective production of *N*-acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose (see ESI
352 Figs. S9-10).

353

354 **Sequential RTIL-pretreatment of chitin**

355 Chitin (2% w/v) was added to 10 mL of each RTIL, and incubated in an oil bath at 110 °C with stirring for
356 40 min. This combination of biomass loading, temperature and incubation time was selected according
357 literature data about RTIL-pretreatment of (ligno)cellulosique polymers.^{37, 39, 41} After incubation, chitin
358 solubilization was not achieved according to the solubility test presented in the ESI (Fig. S11). Each chitin
359 suspension was cooled in an ice bath. The pretreated chitin was precipitated by adding 20 mL of ultra-pure
360 water (deionized water with a resistivity of 18.3 M Ω cm, Barnsted Easy Pure RF) to the mixture (v/v) with
361 vigorous stirring for 30 min in order to increase the polarity of the medium. After a centrifugation step
362 (10,733 g, 20 min, 4 °C with an Allegra 64R Beckman Coulter Rotor: F0850), the supernatant containing
363 RTIL and water was kept for future recycling. The chitin powder was collected by vacuum filtration
364 thoroughly and washed with ultra-pure water. The resulting solid was then poured into ultra-pure water,
365 sonicated for 5 minutes and collected again by vacuum filtration. This step was repeated 5 times before
366 freeze drying the product. This regeneration step was undertaken to prevent eventually chitinase
367 deactivation by high RTIL concentrations in the reaction media as finely described in a previous study for
368 other hydrolases.⁴⁰

369

370 **Enzymatic hydrolysis of untreated and pretreated chitins**

371 The procedure of implementation was adapted from literature data.^{8, 21} Chitinase-catalyzed hydrolyses of
372 the different chitin substrates (untreated or RTIL-pretreated) were carried out in stirred flasks. In a typical
373 hydrolysis reaction, 10 mg of chitin or pretreated chitins were added to 0.9 mL of phosphate buffer (10 mM,
374 pH 6.0) and incubated for 30 min (40 °C; 1000 rpm). After this pre-incubation step, hydrolysis was initiated
375 by addition of 100 μ L of 1 mg/mL chitinase preparation. The final concentrations of chitin and enzyme in
376 the reaction medium (1 mL) were 1% w/v and 0.1 mg/mL, respectively. Enzymatic reaction was stopped
377 by incubating at 90 °C for 20 min to deactivate the enzyme. Control experiments with enzyme after thermal
378 deactivation and without were also carried out. For the kinetic study, various flasks containing the same
379 concentration of chitin and enzyme were prepared and incubated in the same conditions as described before.

380 At different times, the reaction media were withdrawn in order to determine the reaction progress.
381 Supernatant was diluted in ultra-pure water and filtered (0.2 μm) prior to analysis by high performance
382 liquid chromatography (HPLC). The conversion yields into chito-mono/oligosaccharides were expressed
383 as mean values with standard deviations (\pm) in mg of chito-mono/oligosaccharides obtained per gram of
384 chitin (mg / g chitin). Apparent initial rates of reactions were calculated by derivation of a second-order
385 polynomial approximation of the concentration profile, built on the experimental data obtained during the
386 first hour of the reaction (Matlab 6.5, 2002, MathWorks, USA).

387 **Simultaneous RTIL-pretreatment and enzymatic hydrolysis of chitin**

388 Chitin was suspended in various $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ volumes in stirred flasks; the whole incubated at 110 $^\circ\text{C}$
389 (thermostated oil bath) under vigorous stirring for 40 min, and then cooled down in an ice bath. Following
390 incubation, phosphate buffer (10 mM, pH 6.0; qsp 900 μl) was added in order to mimic a regeneration step
391 (40 $^\circ\text{C}$, 30 min in Eppendorf Thermomixer 5436) and enzymatic hydrolysis was directly initiated by
392 addition of 0.1 mL of 1 mg/mL chitinase preparation. Final concentrations of substrates and RTIL were 1%
393 (w/v) and displayed in a range from 0 to 100% (v/v), respectively. Enzymatic reaction was stopped by
394 incubating at 90 $^\circ\text{C}$ for 20 min to deactivate enzyme. Control experiments with enzyme after thermal
395 deactivation and without enzyme were also carried out. Supernatant was diluted in ultra-pure water and
396 filtered (0.2 μm) prior to analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). The conversion
397 yields into chito-mono/oligosaccharides were expressed as mean values with standard deviations (\pm) in mg
398 of chito-mono/oligosaccharides obtained per gram of chitin (mg / g chitin).

399

400 **Conclusion**

401 $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ combined to chitinases from *T. viride* or *S. griseus* were demonstrated for the first time to
402 be suitable for the two proposed routes: sequential or simultaneous bioconversion of chitin into chito-
403 mono/oligosaccharides. The sequential strategy led to a selective and very efficient production of *N*-
404 acetylglucosamine or *N,N'*-diacetylchitobiose -rich hydrolysates, nearly free of residual RTIL. This could
405 facilitate purification of chito-mono/oligosaccharides from reaction media and constitutes therefore a
406 promising process for the production of platform molecules. Like for lignocellulosic biorefinery, the
407 sequence of the steps could allow to recover of RTIL in a next cycle of pretreatment. Enzymatic
408 performances were proved to be due to structural changes of chitin polymer induced by RTIL either as a
409 pretreatment or a co-solvent for biocatalytic systems. Indeed, simultaneous pathway revealed to be an
410 efficient one pot process in considerably minimizing $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ amount. Finally, the combination of
411 the two respective chitinases from *T. viride* and *S. griseus* was showed a promising way to considerably

412 increase the production of *N*-acetylglucosamine both by sequential and simultaneous strategies. Studies
413 combining others RTIL and chitinases would allow us to foresee the modulation of the selectivity within
414 our strategies toward larger chito-oligosaccharides.

415 **Acknowledgements**

416 We would also thank Dominique Cailleu (NMR) and Loic Dupont (SEM) for technical and analytical support.
417 Gaël Huet, Master 2 student was funded by the Conseil Régional des Hauts-de-France.

418 **References**

- 419 1 I. Younes and M. Rinaudo, *Marine Drugs*, 2015, 13, 1133.
- 420 2 S. Islam, M. A. R. Bhuiyan and M. N. Islam, *J. Polym. Environ.*, 2016, 1-13.
- 421 3 S. S. Silva, J. F. Mano and R. L. Reis, *Green Chem.*, 2017, 19, 1208-1220.
- 422 4 K. Li, R. Xing, S. Liu and P. Li, *Carbohydr. Polym.*, 2016, 139, 178-190.
- 423 5 S.-L. Wang, H.-T. Lin, T.-W. Liang, Y.-J. Chen, Y.-H. Yen and S.-P. Guo, *Bioresour. Technol.*,
424 2008, 99, 4386-4393.
- 425 6 T. Cao, Y. Li, L. Jiang, L. Yuan, L. Dong, Y. Li and S. Yin, *Carbohydr. Res.*, 2016, 433, 73-79.
- 426 7 K. Inokuma, M. Takano and K. Hoshino, *Biochem. Eng. J.*, 2013, 72, 24-32.
- 427 8 M. Osada, C. Miura, Y. S. Nakagawa, M. Kaihara, M. Nikaido and K. Totani, *Carbohydr. Polym.*,
428 2012, 88, 308-312.
- 429 9 T. Usui, H. Matsui and K. Isobe, *Carbohydr. Res.*, 1990, 203, 65-77.
- 430 10 C.-L. Liu, C.-Y. Lan, C.-C. Fu and R.-S. Juang, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014, 69, 59-63.
- 431 11 Y. M. Lv, P. Laborda, K. Huang, Z. P. Cai, M. Wang, A. M. Lu, C. Doherty, L. Liu, S. L. Flitsch and
432 J. Voglmeir, *Green Chem.*, 2017.
- 433 12 J. M. van Munster, P. Sanders, G. A. ten Kate, L. Dijkhuizen and M. J. E. C. van der Maarel,
434 *Carbohydr. Res.*, 2015, 407, 73-78.
- 435 13 Q. Yan and S. S. Fong, *Bioresour. Bioprocess.*, 2015, 2, 31.
- 436 14 N. Kazami, M. Sakaguchi, D. Mizutani, T. Masuda, S. Wakita, F. Oyama, M. Kawakita and Y.
437 Sugahara, *Carbohydr. Polym.*, 2015, 132, 304-310.
- 438 15 A. Einbu and K. M. Vårum, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 1870-1875.
- 439 16 S. Kuusk, M. Sørli and P. Väljamäe, *J. Biol. Chem.*, 2015, 290, 11678-11691.
- 440 17 X. Chen, Y. Gao, L. Wang, H. Chen and N. Yan, *ChemPlusChem*, 2015, 80, 1565-1572.
- 441 18 M. Rhazi, J. Desbrières, A. Tolaimate, A. Alagui and P. Vottero, *Polym. Int.*, 2000, 49, 337-344.

- 442 19 V. Zargar, M. Asghari and A. Dashti, *ChemBioEng Reviews*, 2015, 2, 204-226.
- 443 20 K. Karimi and M. J. Taherzadeh, *Bioresour. Technol.*, 2016, 203, 348-356.
- 444 21 Y. S. Nakagawa, Y. Oyama, N. Kon, M. Nikaido, K. Tanno, J. Kogawa, S. Inomata, A. Masui, A.
445 Yamamura, M. Kawaguchi, Y. Matahira and K. Totani, *Carbohydr. Polym.*, 2011, 83, 1843-
446 1849.
- 447 22 G. Villa-Lerma, H. González-Márquez, M. Gimeno, A. López-Luna, E. Bárzana and K. Shirai,
448 *Bioresour. Technol.*, 2013, 146, 794-798.
- 449 23 G. Villa-Lerma, H. González-Márquez, M. Gimeno, S. Trombotto, L. David, S. Ifuku and K.
450 Shirai, *Bioresour. Technol.*, 2016, 209, 180-186.
- 451 24 R. A. A. Muzzarelli, *Marine Drugs*, 2011, 9, 1510-1533.
- 452 25 Y. Qin, X. Lu, N. Sun and R. D. Rogers, *Green Chem.*, 2010, 12, 968-971.
- 453 26 J. L. Shamshina, P. S. Barber, G. Gurau, C. S. Griggs and R. D. Rogers, *ACS Sustainable Chem.*
454 *& Eng.*, 2016, 4, 6072-6081.
- 455 27 T. Setoguchi, T. Kato, K. Yamamoto and J.-i. Kadokawa, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, 50, 861-
456 864.
- 457 28 M. Jaworska Małgorzata, T. Kozlecki and A. Gorak, in *J. Polym. Eng.*, 2012, vol. 32, p. 67.
- 458 29 M. M. Jaworska and A. Gorak, *Mater. Lett.*, 2016, 164, 341-343.
- 459 30 X. Shen, J. L. Shamshina, P. Berton, J. Bandomir, H. Wang, G. Gurau and R. D. Rogers, *ACS*
460 *Sustainable Chem. Eng.*, 2016, 4, 471-480.
- 461 31 W.-T. Wang, J. Zhu, X.-L. Wang, Y. Huang and Y.-Z. Wang, *J. Macromolec. Science, Part B*,
462 2010, 49, 528-541.
- 463 32 H. Xie, S. Zhang and S. Li, *Green Chem.*, 2006, 8, 630-633.
- 464 33 I. Aspras, M. Kamińska, K. Karzyński, M. Kawka and M. Jaworska Małgorzata, *Chem. Process*
465 *Eng.*, 2016, vol. 37, p. 77.
- 466 34 Y. Wu, T. Sasaki, S. Irie and K. Sakurai, *Polym.*, 2008, 49, 2321-2327.
- 467 35 S. S. Silva, A. R. C. Duarte, A. P. Carvalho, J. F. Mano and R. L. Reis, *Acta Biomaterialia*, 2011,
468 7, 1166-1172.
- 469 36 A. A. Elgharbawy, M. Z. Alam, M. Moniruzzaman and M. Goto, *Biochem. Eng. J.*, 2016, 109,
470 252-267.
- 471 37 T. Auxenfans, S. Buchoux, K. Djellab, C. Avondo, E. Husson and C. Sarazin, *Carbohydr. Polym.*,
472 2012, 90, 805-813.
- 473 38 T. Auxenfans, S. Buchoux, E. Husson and C. Sarazin, *Biomass Bioenergy*, 2014, 62, 82-92.

474 39 T. Auxenfans, S. Buchoux, D. Larcher, G. Husson, E. Husson and C. Sarazin, *Energy Conv.*
475 *Management*, 2014, 88, 1094-1103.

476 40 T. Auxenfans, E. Husson and C. Sarazin, *Biochem. Eng. J.*, 2017, 117, Part A, 77-86.

477 41 E. Husson, S. Buchoux, C. Avondo, D. Cailleu, K. Djellab, I. Gosselin, O. Wattraint and C.
478 Sarazin, *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 7335-7342.

479 42 N. Mehmood, E. Husson, C. Jacquard, S. Wewetzer, J. Buchs, C. Sarazin and I. Gosselin,
480 *Biotechnol. Biofuels*, 2015, 8, 17.

481 43 Y. Fukaya, K. Hayashi, M. Wada and H. Ohno, *Green Chem.*, 2008, 10, 44-46.

482 44 A. Brandt, J. Grasvik, J. P. Hallett and T. Welton, *Green Chem.*, 2013, 15, 550-583.

483 45 K. S. Egorova and V. P. Ananikov, *ChemSuschem*, 2014, 7, 336-360.

484 46 A. Garcia-Lorenzo, E. Tojo, J. Tojo, M. Teixeira, F. J. Rodriguez-Berrocal, M. P. Gonzalez and V.
485 S. Martinez-Zorzano, *Green Chem.*, 2008, 10, 508-516.

486 47 K. Shill, S. Padmanabhan, Q. Xin, J. M. Prausnitz, D. S. Clark and H. W. Blanch, *Biotechnol.*
487 *Bioeng.*, 2011, 108, 511-520.

488 48 P. Engel, S. Krull, B. Seiferheld and A. C. Spiess, *Bioresour. Technol.*, 2012, 115, 27-34.

489 49 S. B. Chavan and M. V. Deshpande, *Biotechnol. Progr.*, 2013, 29, 833-846.

490 50 R. Hamid, M. Khan, M. Ahmad, M. Ahmad, M. Abdin, J. Musarrat and S. Javed, *Journal of*
491 *Pharmacy And Bioallied Sciences*, 2013, 5, 21-29.

492 51 F. M. Kerton, Y. Liu, K. W. Omari and K. Hawboldt, *Green Chem.*, 2013, 15, 860-871.

493 52 J. H. Yoon, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 37, 663-668.

494 53 M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud and R. W. Taft, in *Progress in Physical Organic Chemistry*, John
495 Wiley & Sons, Inc., 2007, pp. 485-630.

496 54 G. Cárdenas, G. Cabrera, E. Taboada and S. P. Miranda, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2004, 93, 1876-
497 1885.

498 55 L. Michael, *Research and Reviews: J Chem.*, 2014, 3, 7-14.

499 56 N. Kamiya, Y. Matsushita, M. Hanaki, K. Nakashima, M. Narita, M. Goto and H. Takahashi,
500 *Biotechnol. Lett.*, 2008, 30, 1037-1040.

501 57 J.-K. Chen, C.-R. Shen and C.-L. Liu, *Marine Drugs*, 2010, 8, 2493-2516.

502 58 K. Jamialahmadi, J. Behravan, M. Fathi, M. Najafi, T. Yazdi, A. Shahverdi and M. Faramarzi,
503 *Biotechnol.*, 2011, 10, 292-297.

504 59 J. H. Kuk, W. J. Jung, G. H. Jo, Y. C. Kim, K. Y. Kim and R. D. Park, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,
505 2005, 68, 384-389.

506 60 M. R. Kasai, *J. Agric. Food. Chem.*, 2009, 57, 1667-1676.
507

Supplementary Information

Effect of room temperature ionic liquids on selective biocatalytic hydrolysis of chitin *via* sequential or simultaneous strategies

E. Husson,^a C. Hadad,^{b,c} G. Huet,^{a,b,c} S. Laclef,^{b,c} D. Lesur,^{b,c} V. Lambertyn,^a A. Jamali,^{c,d} S. Gottis,^{e,c} C. Sarazin,^a A. Nguyen Van Nhien,^{b,c*}

a. Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire, FRE CNRS 3580, Université de Picardie Jules Verne - UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex 1, France.

b. Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - UFR des Sciences – 80039 cedex Amiens, France.

c. Institut de Chimie de Picardie, FR CNRS 3085, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France

d. Plateforme de Microscopie Electronique - Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint-Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

e. Laboratoire de Réactivité et de Chimie des Solides, UMR CNRS 7314 - Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

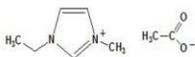
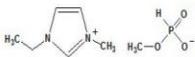
*Corresponding author: albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

Table of contents

1. Selected room temperature ionic liquids	p.2
2. Characteristic HPLC chromatograms	p.3
3. SEM micrographs	p.4
4. Solid-state ¹³ C NMR	p.6
5. Infra-Red spectra	p.8
6. Mass spectra of isolated hydrolysis products	p.9
7. Solubility test of chitin in room temperature ionic liquids	p.10
8. Best experimental procedure to efficiently produce <i>N</i> -acetylglucosamine	p.11
9. Best experimental procedure to efficiently produce <i>N,N'</i> -diacetylchitobiose	p.11

1. Selected room temperature ionic liquids

Table S1. Chemical structure and corresponding physico-chemical properties of the two distinct room temperature imidazolium-based ionic liquids used in this study ^a.

Ionic Liquid	Structure	Abbreviation	Molar mass (g.mol ⁻¹)	Melting Point	Density	Viscosity (cP at 25°C)	Kamlet-Taft parameters at 25°C		
							α	β	π^*
1-ethyl-3-methylimidazolium acetate		[C ₂ mim][OAc]	170.22	< -20°C	1.03	93	0.47 ^b	1.11 ^b	1.04 ^b
1-ethyl-3-methylimidazolium methylphosphonate		[C ₂ mim][MeO(H)PO ₂]	206.18	ND	ND	107	0.52 ^c	1.00 ^c	1.06 ^c

^a Data from Solvionic SA (Verniole, France) index; ^b From C. Froschauer, M. Hummel, M. Iakovlev, A. Roselli, H. Schottenberger, and H. Sixta, *Biomacromolecules* 2013, 14: 1741-1750; ^c From Y. Fukaya, K. Hayashi, M. Wada and H. Ohno, *Green Chem.*, 2008, 10: 44-46. ND: not determined.

2. Characteristic HPLC chromatograms

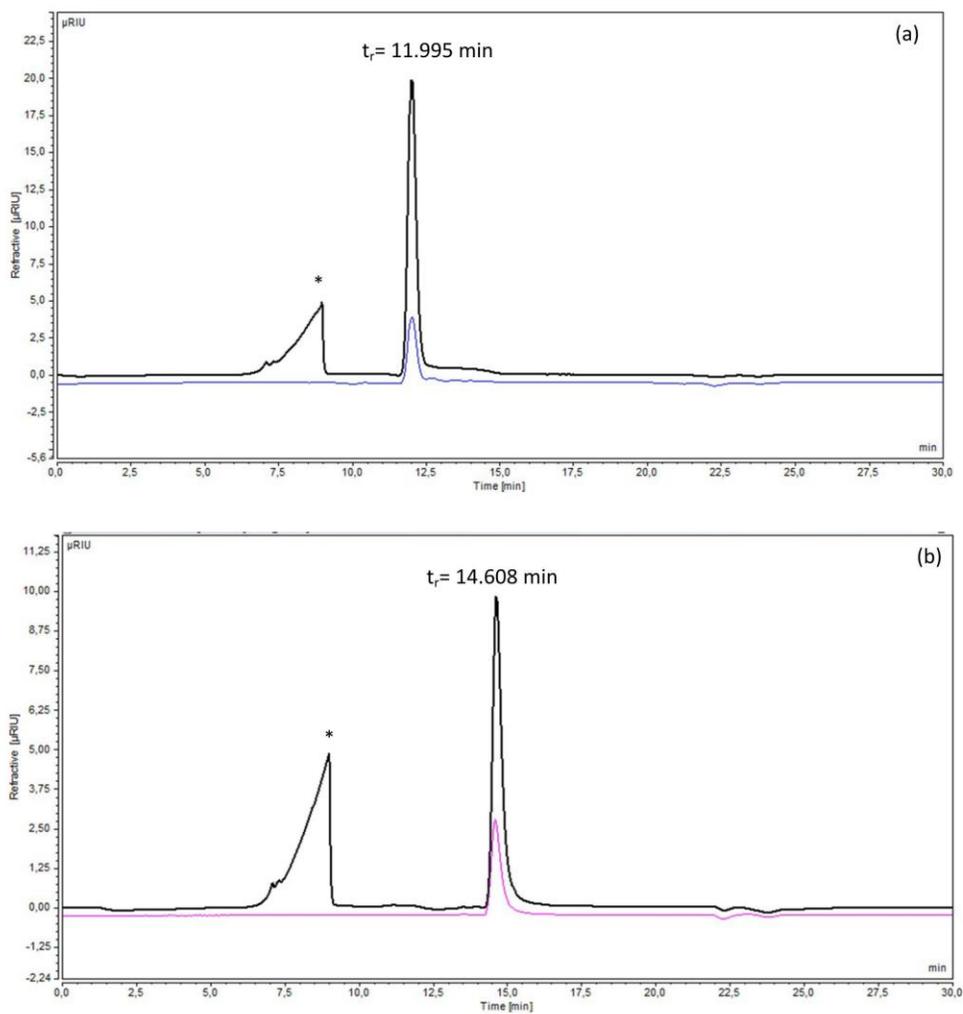


Figure S1. Characteristic HPLC chromatograms of: (a) standard *N,N'*-diacetylchitobiose (blue line) and supernatant of hydrolysate (black line) obtained by enzymatic hydrolysis of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin in aqueous buffer catalyzed by the chitinase from *S. griseus* for 24h and (b) standard *N*-acetylglucosamine (pink line) and supernatant of hydrolysate (black line) obtained by enzymatic hydrolysis of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin in aqueous buffer. This reaction was catalyzed by the chitinase from *S. griseus* for 24h then supplemented by the chitinase from *T. viride* for 12h. *identified as enzymes preparation and aqueous buffer.

3. SEM micrographs

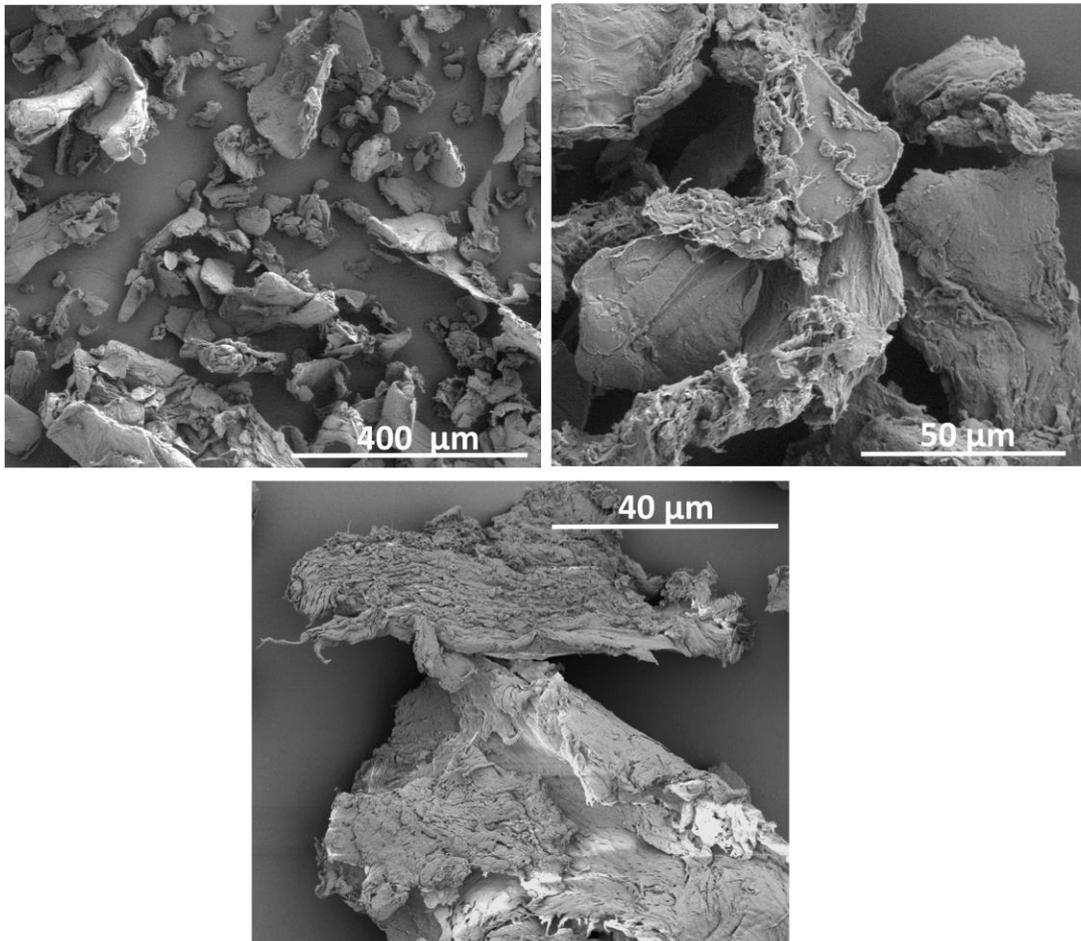


Figure S2. SEM images of untreated chitin.

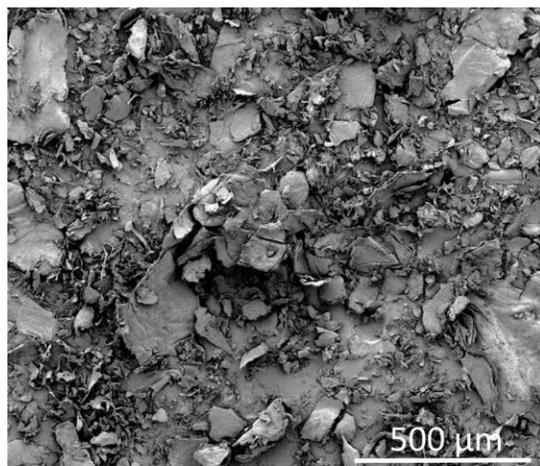


Figure S3. SEM images of [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin.

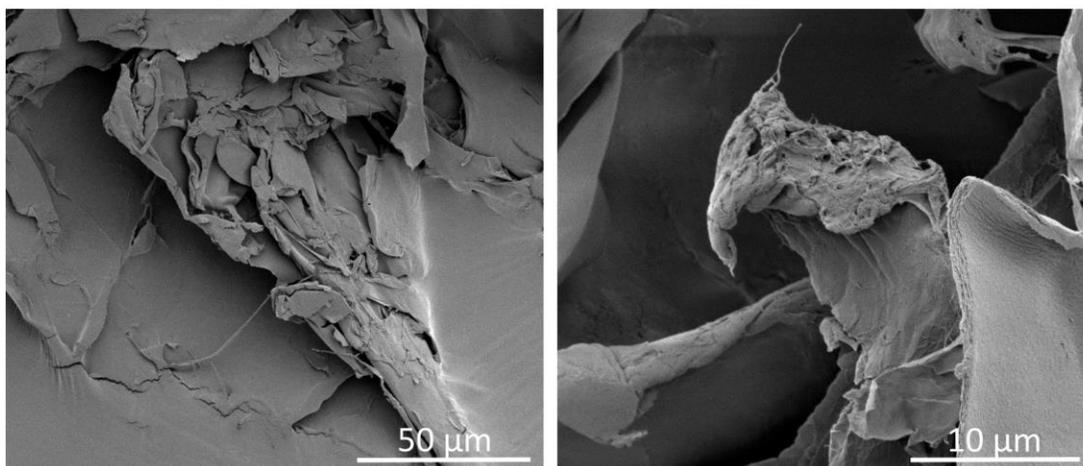


Figure S4. SEM images of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin.

4. Solid-state ^{13}C NMR

Solid-state ^{13}C NMR spectra were obtained with 4 mm CP-MAS probe operating at 125.7452 MHz on a Bruker DRX 500 at 25 °C. The spinning rate was 5 kHz with 2 ms contact times and 5 s delay between scans (2048 scans). The degree of acetylation (DA) corresponds to the ratio of integrated methyl peak area to the sum of integrated carbons peaks. The chemical shifts were externally referred by setting the carbonyl resonance of glycine to 176.03 ppm.

Ref: Kasai, M. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1667-1676. Younes, I.; Rinaudo, M. *Mar. Drugs* 2015, 13, 1133-1174. Heux, L.; Brugnerotto, J.; Desbrière, J.; Versali, M.-F.; Rinaudo, M. *Biomacromolecules* 2000, 1, 746-751. Duarte, M. L.; Ferreira, M. C.; Marvao, M. R.; Rocha, J. *Int. J. Biol. Macromolec.* 2001, 28, 359-363.

CP-MAS ^{13}C NMR (25 °C, 125 MHz): δ_{C} 173.8 (C=O), 104.1 (C1), 83.0 (C4), 75.7 (C5), 73.3 (C3), 60.8 (C6), 55.2 (C2), 22.8 (CH₃).

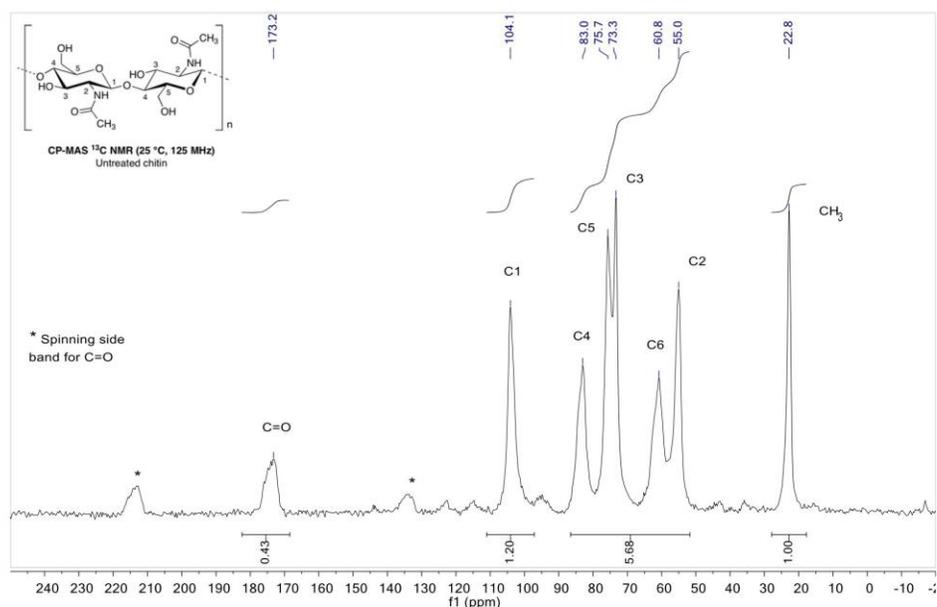


Figure S5. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of untreated chitin (DA = 87%).

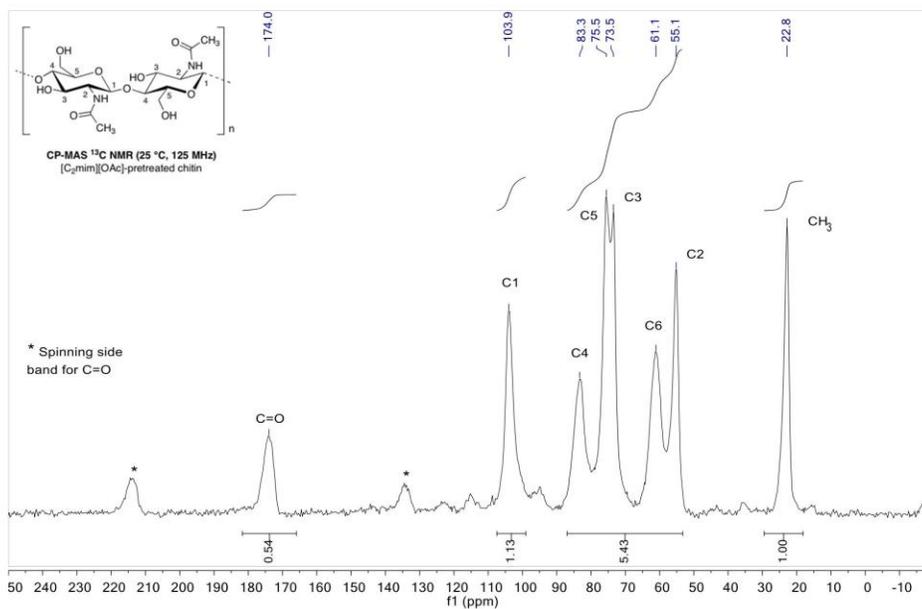


Figure S6. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin (DA = 91%).

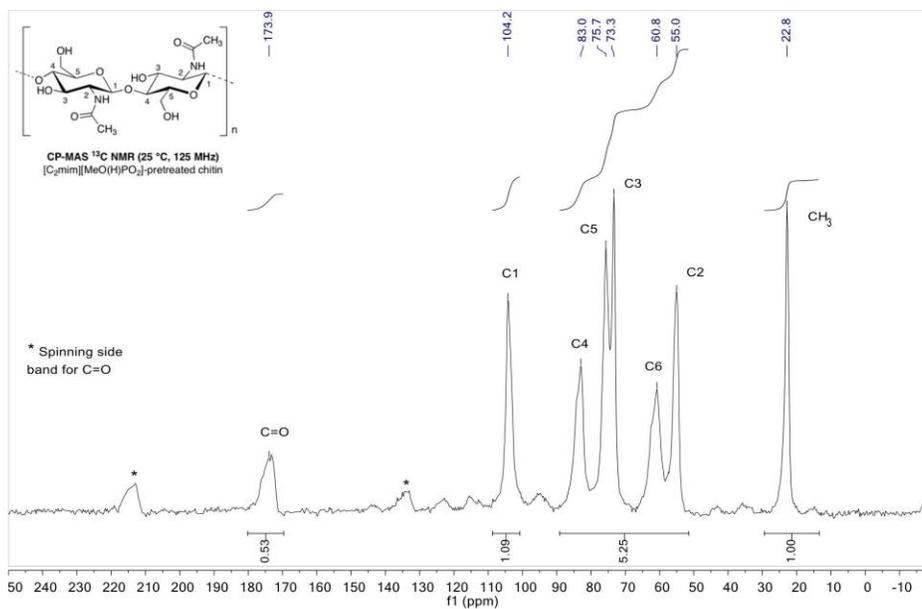


Figure S7. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin (DA = 94%).

5. Infra-Red spectra

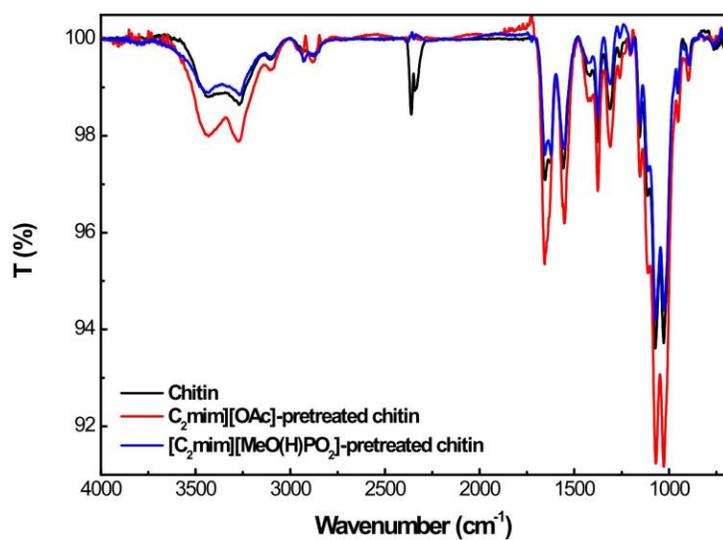


Figure S8. IR spectra of untreated chitin (black line), [C₂mim][OAc]-pretreated chitin (red line) and [C₂mim][MeO(H)PO₂]-pretreated chitin (blue line).

6. Mass spectra of isolated hydrolysis products

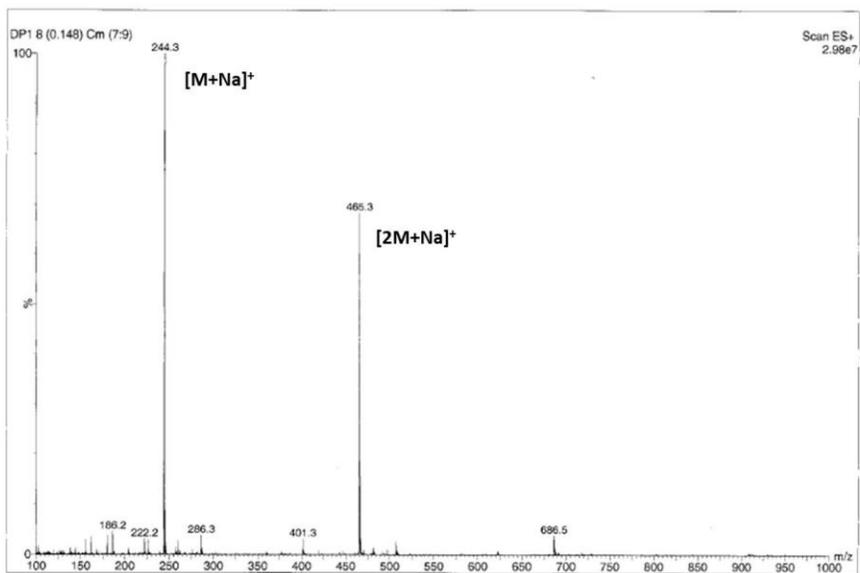


Figure S9. ESI-MS spectrum of the isolated *N*-acetylglucosamine.

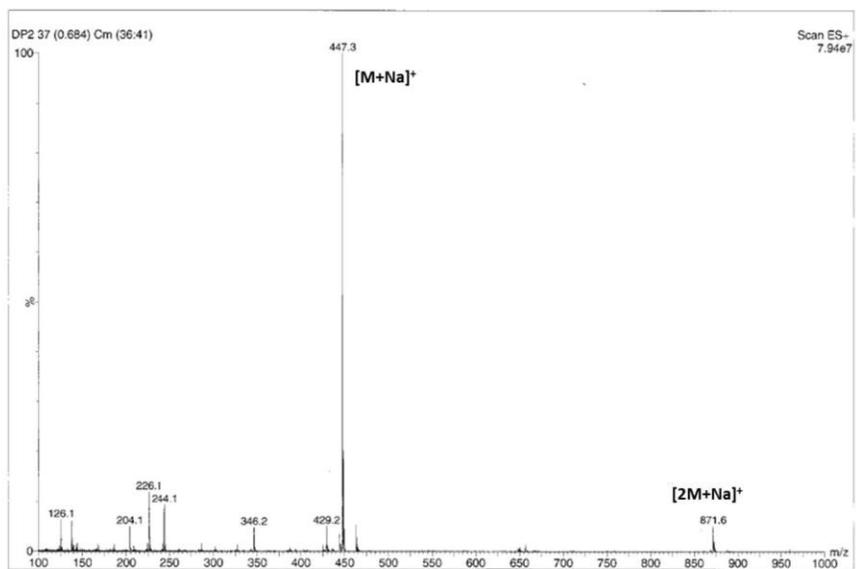


Figure S10. ESI-MS spectrum of the isolated *N,N'*-diacetylchitobiose

7. Solubility test of chitin in room temperature ionic liquids

The experimental procedure used for this solubility test was adapted from the one proposed by Fukaya et al about dissolution studies of recalcitrant polysaccharide in RTIL.

Suspensions of commercial chitin (0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 1.5 and 2.0 % w/v) were incubated in $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ and $[\text{C}_2\text{mim}][\text{MeO}(\text{H})\text{PO}_2]$ at 110 °C for 40 min under vigorous stirring. The highest concentration leading to a clear solution was evaluated as the maximal solubility value. In $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$, clear solutions were observed for 0.05 % and 0.1 % w/v of chitin whereas no clear solution was recorded for $[\text{C}_2\text{mim}][\text{MeO}(\text{H})\text{PO}_2]$ as depicted above.

Ref: Y. Fukaya, K. Hayashi, M. Wada and H. Ohno, Green Chem., 2008, 10, 44-46.

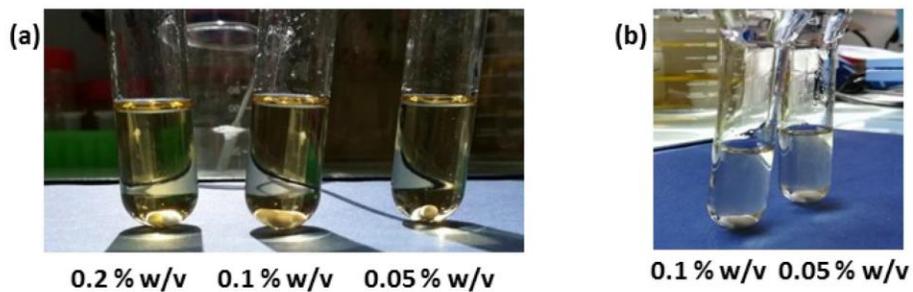


Figure S11. Solubilization test of chitin in $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ (a) and $[\text{C}_2\text{mim}][\text{MeO}(\text{H})\text{PO}_2]$ (b) at 110 °C for 40 min.

8. Best experimental procedure to efficiently produce *N*-acetylglucosamine

Chitin (2% w/v) was added to 10 mL of [C₂mim][OAc], and incubated in an oil bath at 110 °C with stirring for 40 min. After incubation, each chitin suspension was cooled in an ice bath. The pretreated chitin was precipitated by adding 20 mL of ultra-pure water (deionized water with a resistivity of 18.3 MΩ cm, Barnsted Easy Pure RF) to the mixture (v/v) with vigorous stirring for 30 min in order to increase the polarity of the medium. After a centrifugation step (10,733 g, 20 min, 4 °C with an Allegra 64R Beckman Coulter Rotor: F0850), the supernatant containing [C₂mim][OAc] and water was kept for future recycling. The pretreated chitin powder was collected by vacuum filtration thoroughly and washed with ultra-pure water. The resulting solid was then poured into ultra-pure water, sonicated for 5 minutes and collected again by vacuum filtration. This step was repeated 5 times before freeze drying the product. 10 mg of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin were added to 0.9 mL of phosphate buffer (10 mM, pH 6.0) and incubated for 30 min (40 °C; 1000 rpm). After this pre-incubation step, hydrolysis was initiated by addition of 100 μL of 1 mg/mL chitinase from *S. griseus* preparation. After 24 h of reaction, the second chitinase from *T. viride* was added to the first one. After 12 h, enzymatic reaction was stopped by incubating at 90 °C for 20 min to deactivate both enzymes. Supernatant was diluted in ultra-pure water and filtered (0.2 μm) prior to analysis by HPLC. The conversion yield into *N*-acetylglucosamine was 760.0 ± 0.1 mg / g chitin.

9. Best experimental procedure to efficiently produce *N,N'*-diacetylchitobiose

Chitin (2% w/v) was added to 10 mL of [C₂mim][OAc], and incubated in an oil bath at 110 °C with stirring for 40 min. After incubation, each chitin suspension was cooled in an ice bath. The pretreated chitin was precipitated by adding 20 mL of ultra-pure water (deionized water with a resistivity of 18.3 MΩ cm, Barnsted Easy Pure RF) to the mixture (v/v) with vigorous stirring for 30 min in order to increase the polarity of the medium. After a centrifugation step (10,733 g, 20 min, 4 °C with an Allegra 64R Beckman Coulter Rotor: F0850), the supernatant containing [C₂mim][OAc] and water was kept for future recycling. The pretreated chitin powder was collected by vacuum filtration thoroughly and washed with ultra-pure water. The resulting solid was then poured into ultra-pure water, sonicated for 5 minutes and collected again by vacuum filtration. This step was repeated 5 times before freeze drying the product. 10 mg of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin were added to 0.9 mL of phosphate buffer (10 mM, pH 6.0) and incubated for 30 min (40 °C; 1000 rpm). After this pre-incubation step, hydrolysis was initiated by addition of 100 μL of 1 mg/mL chitinase from *S. griseus* preparation. After 48 h of reaction, enzymatic reaction was stopped by incubating at 90 °C for 20 min to deactivate the enzyme. Supernatant was diluted in ultra-pure water and filtered (0.2 μm) prior to analysis by HPLC. The conversion yield into *N,N'*-diacetylchitobiose was 705.0 ± 5.0 mg / g.

Article 2

1 **Straightforward Extraction and Selective Bioconversion of**
2 **High Purity Chitin from *Bombyx eri* Larva: Toward an**
3 **Integrated Insect Biorefinery**

4
5 Gael Huet,^a Caroline Hadad,^a Eric Husson,^b Sylvain Laclef,^a Virginie Lambertyn,^b Monica
6 Araya Farias,^b Arash Jamali,^c Matthieu Courty,^d Ranim Alayoubi,^b Isabelle Gosselin,^b
7 Catherine Sarazin^b and Albert Nguyen Van Nhien^{*a}

8
9 ^a Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Université
10 de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - UFR des Sciences – 80039 Amiens cedex, France.

11 ^b Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire, UMR CNRS 7025, Université de Picardie Jules Verne -
12 UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

13 ^c Plateforme de Microscopie Electronique – Université de Picardie Jules Verne, HUB de l’Energie, 33
14 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

15 ^d Laboratoire de Réactivité et Chimie des Solides, UMR CNRS 7314, Université de Picardie Jules Verne,
16 HUB de l’Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

17 *E-mail : albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

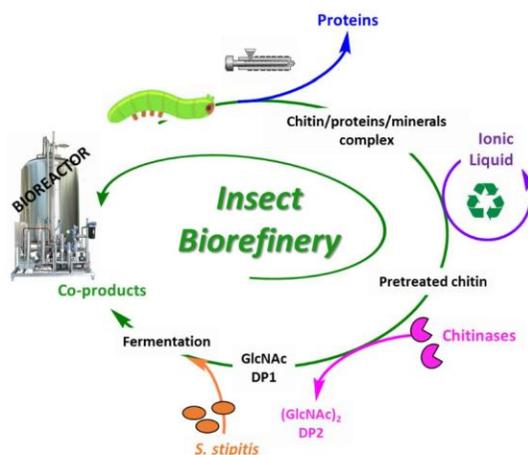
18
19 **ABSTRACT**

20
21 Chitins of different purity grades (45%, 89.7% and 93.3%) were efficiently extracted from *Bombyx eri*
22 larva and fully physico-chemically characterized. Compared to commercially available and extracted α -
23 chitin from shrimp shell, the collected data showed that insect chitins had similar characteristics in terms
24 of crystallographic structures (α -chitin), thermal stability and degree of acetylation (>87%). The major
25 differences lay in the crystallinity indexes (66% vs 75% for shrimp chitin) and in the morphological
26 structures. Furthermore, low ash contents were determined for the insect chitins (1.90% vs 21.73% for
27 shrimp chitin), making this chitin extraction and purification easier, which is highly valuable for an
28 industrial application. Indeed, after only one step (deproteinization), the obtained chitin from *Bombyx*
29 *eri* showed higher purity grade than the one extracted from shrimp shells under the same conditions.
30 Insect chitins were then subjected to room temperature ionic liquid (RTIL) pretreatment prior to
31 enzymatic degradation and presented a higher enzymatic digestibility compared to commercial one
32 whatever their purity grade and would be thus a more relevant source for the selective production of *N*-
33 acetyl-D-glucosamine (899.2 mg/g of **chitin-2 steps** vs 760 mg/g of **chitin com**). Moreover, for the first

34 time, the fermentescibility of chitin hydrolysates was demonstrated with *Scheffersomyces stipitis* used
35 as ethanologenic microorganism.

36

37 **GRAPHICAL ABSTRACT**



38

39 **KEYWORDS**

40 Chitin, insect biorefinery, room temperature ionic liquid, enzymatic digestibility, fermentescibility.

41

42 **INTRODUCTION**

43

44 Insects are a valuable protein source directly available for human and animal feed and thus a very
45 promising alternative or a complement to feed the growing world population. In that way, Food and
46 Agriculture Organization of the United Nations and particularly European Community authorized
47 recently the use of insects as animal biomass for food and feed (i.e. farm fish) and therefore promoted
48 the breeding of insects as a new source of proteins (Henry, Gasco, Piccolo & Fountoulaki, 2015; van
49 Huis, 2013). Indeed, insects are consumed and are part of the diets of at least 2 billion people with more
50 than 1900 insect species reported and used as human food (FAO/WUR, 2012; van Huis et al, 2013) in
51 particularly in Southeast Asia and the Pacific, sub-Saharan Africa, and Latin America (Hanboonsong,
52 Jamjanya & Durst, 2013). From an industrial point of view, the “insect biorefinery” is not anymore at
53 its early stage and can be divided into three business subjects: proteins, lipids, which could be used
54 directly for the agribusiness, and the by-product chitin, which is until now poorly exploited in industry
55 contrary to chitosan. In addition, it has been demonstrated that insects provide a very promising
56 alternative to other livestock. They can be farmed using less resources (land, water, energy, and feed)
57 than livestock while providing more protein and contributing less to climate change due to generating
58 lower greenhouse gas emissions and lower levels of pollutants (ammonia, methane) (Gahukar, 2016;

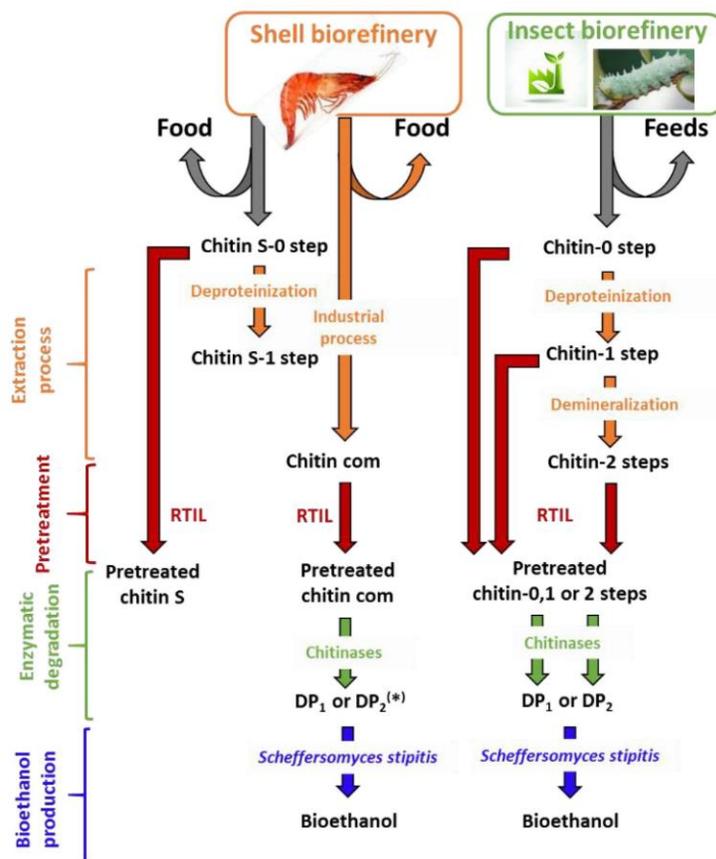
59 van Huis, 2013, van Huis et al, 2013). Another important feature remains in the production control and
60 homogeneity on farms compared to seasonal dependence of seafood making it possible to satisfy the
61 traceability criterion for food/feed applications as well as medical application for insect chitin
62 derivatives for example.

63 Nowadays, the market demand for chitin is more important than the supply chain mainly coming from
64 the seafood waste. It is important to underline that chitin from insects contains lower amount of calcium
65 carbonate (<6%) compared to crustaceans (30-50%), and as a consequence, it can be more easily
66 extracted resulting in a more environmentally friendly process. In addition, higher degrees of
67 polymerization (DP) of the polymer are preserved with different and sometimes improved mechanical,
68 gelling, biological and flexibility properties (Díaz-Rojas et al., 2006; Finke, 2007). In the last five years,
69 a number of publications have been dedicated to the extraction of chitin as well as the subsequent
70 transformations into bioproducts or biomaterials from different species of insects and different parts of
71 their body (Kaya et al., 2014, 2015a, b, 2017; Liu et al., 2012; Marei et al., 2016; Rumpold &
72 Schlüter, 2013; Sajomsang & Gonil, 2010).

73 Despite excellent properties such as biocompatibility, biodegradability, adsorption and chelating ability
74 (Rinaudo, 2006; Younes & Rinaudo, 2015), chitin has been underutilized mainly due to the cost of the
75 extraction process and the poor solubility in most organic and aqueous solvents. However, chitin can be
76 converted into *N*-acetyl-D-glucosamine (DP₁) or *N,N'*-diacetylchitobiose (DP₂), providing a very
77 promising application of chitin for mono- or chitooligosaccharides (COS) production. In addition to
78 their interesting antitumoral and antimicrobial properties, *N*-acetyl-D-glucosamine and *N,N'*-
79 diacetylchitobiose are also considered as promising platform molecules for osteoarthritis treatment, drug
80 development and for the production of bioactive oligomers (Cao et al., 2016; Wang et al., 2008). It is
81 worth to point out that *N*-acetyl-D-glucosamine can also be used as a carbon source by few fermentative
82 microorganisms (Álvarez-Añorve, Calcagno & Plumbridge, 2005; Evvyernie et al., 2001; Inokuma,
83 Takano & Hoshino, 2013; Kumar, Jamaluddin, Natarajan, Kaur & Datta, 2000). Recently, we have
84 demonstrated the proof of concept to produce selectively DP₁ and DP₂ with very competitive yields from
85 commercial shrimp chitin in sequential or simultaneous strategies, including room temperature ionic
86 liquid (RTIL) and commercial chitinases (Husson et al., 2017). Some RTILs are also considered as
87 alternative solvents to extract chitin fibers (Qin, Lu, Sun & Rogers, 2010; Kato, Yamamoto &
88 Kadokawa, 2012; Shamshina, Barber, Gurau, Griggs & Rogers, 2016;) or for chitin extraction to
89 facilitate chemical and physical modifications, to form hydrogel/film or reversible sorbent for CO₂
90 (Aspras, Kamińska, Karzyński, Kawka & Jaworska, 2016; Jaworska, Kozlecki & Gorak, 2012;
91 Jaworska & Gorak, 2016; Silva, Duarte, Carvalho, Mano & Reis, 2011; Silva, Mano & Reis, 2017; Shen
92 et al., 2016; Wang, Zhu, Wang, Huang & Wang, 2010; Wu, Sasaki, Irie, & Sakurai, 2008; Xie, Zhang
93 & Li, 2006).

94 In the first part of this study, we focused on the chitin extraction with different purity degree from an
95 original insect chitin source, the *Bombyx eri*, as described in the Chart 1, used intensively in India for

96 the production of silk and for nutrition as the moth is an edible insect. Moreover, the protein content of
 97 *Bombyx eri* larva (unpublished data) clearly indicated that amino acid compositions are suitable for
 98 food/feed applications with >96% digestibility following the Boisen method. Because of the apparent
 99 homogenous larva cuticle, we believed that this insect is a suitable candidate for chitin extraction
 100 (Chaudhari et al., 2011; Kaya et al., 2014, 2015a, b, 2017; Liu et al., 2012; Marei et al., 2016; Rumpold
 101 & Schlüter, 2013; Sajomsang & Gonil, 2010; Vincent & Wegst, 2004). The chemical composition
 102 together with the morphological structure were compared to the commercially available chitin and to
 103 the extracted chitins from shrimp under the same conditions with the aim to highlight the particularities
 104 of chitin from the insect source. In order to have a complete comparison of this renewable bioresource
 105 with those of previous work, we continued with the study on the RTIL pretreatment of insect chitins
 106 before their enzymatic degradation. Finally, the chito-oligosaccharide hydrolysates generated were used
 107 as fermentation substrates by the yeast strain *Scheffersomyces stipitis* to illustrate the feasibility of
 108 ethanol production.



109
 110

Chart 1 Extracted chitins from *Bombyx eri* larva and shrimp shells sources (*Husson et al., 2017).

111

112 2. MATERIALS AND METHODS

113

114 2.1 Chitin sources

115

116 Two animal sources have been used for this study: (a) a commercially available chitin from shrimp
117 shells supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) so-called **chitin com**, or shrimp shells from
118 the local market of Amiens (France) so called **chitin S**; (b) extracted chitins from *Bombyx eri* larva
119 supplied by LepidUP company so-called **chitin** (Amiens, France).

120

121 2.2 Chemicals, enzymes and strain

122

123 Mineral acids and bases were used in their highest concentration commercially available, from Sigma-
124 Aldrich (Steinheim, Germany). Kjeldahl catalyst (Cu) (9% CuSO₄·5 H₂O) was supplied by Applichem
125 panreac ITW reagents. Tashirol indicator was made before use by mixing a solution of red methyl and
126 green bromocresol with boric acid from Carlo Erba reagent. Chitinase from *Trichoderma viride* and
127 chitinase from *Streptomyces griseus* were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) with
128 specific activity ≥ 600 U/g solid and ≥ 200 U/g solid, respectively. One unit will liberate 1.0 mg of *N*-
129 acetyl-D-glucosamine from chitin per hour at pH 6.0 at 25 °C in a 2 hours assay. 1-ethyl-3-
130 methylimidazolium acetate ([C₂mim][OAc], > 98%) was purchased from Solvionic SA (Verniolle,
131 France). *N*-acetylglucosamine purchased from Sigma–Aldrich (Germany) and *N,N'*-diacetylchitobiose
132 from Elicityl, (France). The strain used in this study was *Scheffersomyces stipitis* CLIB 187 from the
133 Institut Pasteur collection.

134

135 2.3 Instrumental analysis

136

137 Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine the microstructure of untreated and
138 pretreated chitins. A small amount of dried samples (powder or flakes) was placed on double-sided
139 carbon tape adhered to aluminum SEM stubs. They were then coated with a 20-nm layer of gold and
140 examined using a Quanta 200 FEG scanning electron microscope (FEI Co., USA). The micrographs
141 were obtained with a secondary electron detector at an accelerating voltage of 5 or 2 kV and saved as
142 TIFF files. Infrared spectra were obtained by using a Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometer
143 (IRaffinity-1S, Shimadzu) and ATR method with a germanium prism (MIRacle 10, Shimadzu). X-Ray
144 Powder Diffraction patterns (XRPD) were acquired using a Bruker D4 Endeavor diffractometer
145 equipped with a Cu anti-cathode (K α radiation, operating at 40 kV–40 mA). Patterns were collected in
146 the 2 θ range of 10–60° with a step size of 0.03° and using a low background silicon holder (Bruker
147 AXS, C79298A3244B261). The experimental conditions used for the measurement did not allow us to

148 observe correctly the band below 10° . Crystallinity index (CrI) were calculated from the XDR
149 diffractograms using the amorphous subtraction region method (Ioelevich, 2014). Solid-state CP-MAS
150 ^{13}C NMR spectra were obtained at 125 MHz using a 500 MHz Bruker Avance spectrometer. The
151 spinning rate was 5 kHz with 2 ms contact times and 5 s delay between scans (2048 scans). DAs were
152 calculated from the intensity of N-acetyl carbon atom divided by the summation intensities of carbon
153 atoms of the D-glucopyranosyl ring (Heux, Brugnerotto, Desbrière, Versali, & Rinaudo, 2000; Duarte,
154 Ferreira, Marvao & Rocha, 2002; Kasaai, 2009). TGA was recorded on a Netzsch STA 449C Jupiter
155 thermal analyser instrument equipped with a differential analysis microbalance coupled with a QMS
156 403 Aëolos mass spectrometer with a stainless steel capillary and a Secondary Electron Multiplier (SEV)
157 detector (Channeltron). The counting time for the mass spectrometer was 20 ms per (m/z) value
158 (scanning width: m/z = 10-150 amu) with a resting time of 1 s. The samples (approximately 20 mg of
159 each compound) were heated in an alumina crucible under argon, by equilibrating at 25 °C, and
160 following a ramp at 5 K/min up to 800 °C and an isotherm under air atmosphere for 30 minutes (Flow
161 rate: 50mL/min). Kjeldahl digestion was made in a Büchi digestion unit K-435 and the distillation with
162 a Büchi distillation Unit B-324. Liquid chromatography high performance Dionex Ultimate 3000
163 (Thermo scientific, Sunnyvale, CA, USA) consisting of an automatic sample changer, a pump and a
164 detector type refractometer (RefractoMax 520), the column was a HyperRez XP Carbohydrate H+ (300
165 x 7.7 mm) equipped with a pre-column, kept at 75 °C. The isocratic mode is used, with ultra-pure water
166 as mobile phase; flow rate was 0.6 ml/min. The retention time of *N*-acetylglucosamine was 14.6 min (\pm
167 0.31%) and *N,N'*-diacetylchitobiose was 12.0 min (\pm 0.18%). Quantification was based on calibration
168 curves established using standard *N*-acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose.

169

170 *2.4 Extraction of chitin from insect and shrimp sources*

171

172 *Bombyx eri* larvae were sacrificed by freezing overnight. The insects were then boiled into water for 2
173 min. After filtration, cooling and removal of water, the insects were passed through an extrusion
174 apparatus to separate unpurified chitin and the viscous liquid containing mainly the proteins and the
175 lipids. The residue was washed several times with water followed by ethanol and acetone and dried
176 under vacuum to obtain unpurified chitin so-called **chitin-0 step**. The deproteinization step was
177 performed on the unpurified chitin-0 step by adding a NaOH aqueous solution (1 M) and heating at 80
178 °C for 24 h under stirring. After cooling down the dispersion, the solid was filtered, washed thoroughly
179 with water MQ until neutral pH followed by ethanol and acetone and dried under vacuum to give the
180 deproteinized **chitin-1 step**. The resulting solid was then poured into an HCl aqueous solution 1 M for
181 35 min at 80 °C. After this time, the solid was filtered, washed with water MQ until neutral pH, ethanol
182 and acetone and dried under vacuum to give the partially demineralized **chitin-2 steps**. **Chitin-0 step**,
183 **chitin-1 step** and **chitin-2 steps** were obtained with a yield of 3.3%, 31.1% and 73.2% respectively.
184 Shrimp shells from local market were separated manually by removing the meat and the head part of

185 shrimp. The raw shell was washed several times with water followed by ethanol and acetone and dried
186 under vacuum to obtain unpurified chitin so-called **chitin S-0 step**. **Chitin S-1 step** was obtained in a
187 similar way than **chitin-1 step**. **Chitin S-0 step** and **chitin S-1 step** were obtained with a yield of 51.0%
188 and 17.1% respectively.

189

190 ***2.5 Nitrogen content using Kjeldahl method***

191

192 Nitrogen contents of the chitin samples before and after [C₂mim][OAc]-pretreatment were determined
193 using the Kjeldahl method adapted from the literature (Kirk, 1950). In brief, 100 mg of chitin was
194 dissolved in 10mL of concentrated sulfuric acid in presence of Kjeldahl catalyst (9% CuSO₄.5H₂O).
195 After heating at high temperature (>350 °C) until the solution became transparent without white smoke,
196 the solution was cooled at room temperature. 70 mL of distilled water and 70mL of a solution of NaOH
197 40% (w/w) were added and distilled. The distillate was trapped in a 30 mL of Tashiro indicator solution
198 and finally titrated with a solution of HCl 0.1 M until the solution became violet. Chitin and protein
199 contents were obtained using the methodology described by Diaz-Rojas et al. (2006) described in the
200 supplementary data.

201

202 ***2.6 RTIL-pretreatment of chitin***

203

204 Chitin (2% w/v) was added to 10 mL of RTIL, and incubated in an oil bath at 110 °C with stirring for
205 40 min. This combination of biomass loading, temperature and incubation time was selected according
206 literature data about RTIL-pretreatment of (ligno)cellulosic polymers (Auxenfans et al., 2012a, b, 2014).
207 Each chitin suspension was cooled in an ice bath. The pretreated chitin was precipitated by adding 20
208 mL of ultra-pure water (deionized water with a resistivity of 18.3 MΩ cm, Barnsted Easy Pure RF) to
209 the mixture (v/v) with vigorous stirring for 30 min in order to increase the polarity of the medium. After
210 a centrifugation step (10.733 g, 20 min, 4 °C with an Allegra 64R Beckman Coulter Rotor: F0850), the
211 supernatant containing RTIL and water was kept for future recycling. The chitin powder was collected
212 by vacuum filtration thoroughly and washed with ultra-pure water. The resulting solid was then poured
213 into ultra-pure water, sonicated for 5 min and collected again by vacuum filtration. This step was
214 repeated 5 times before freeze drying the product. This regeneration step was undertaken to prevent
215 eventually chitinase deactivation by high RTIL concentrations in the reaction media as finely described
216 in a previous study for other hydrolases (Auxenfans, Husson, & Sarazin, 2017).

217

218 ***2.7 Enzymatic hydrolysis***

219

220 The procedure of implementation was adapted from literature data (Auxenfans et al., 2012a, b, 2014).
221 Chitinase-catalyzed hydrolyses of the different chitin substrates (untreated or RTIL-pretreated) were

222 carried out in stirred flasks. In a typical hydrolysis reaction, 10 mg of chitin or pretreated chitins were
223 added to 0.9 mL of phosphate buffer (10 mM, pH 6.0) and incubated for 30 min (40 °C; 1000 rpm).
224 After this pre-incubation step, hydrolysis was initiated by addition of 100 µL of 1 mg/mL chitinase
225 preparation. The final concentrations of chitin and enzyme in the reaction medium (1 mL) were 1% w/v
226 and 0.1 mg/mL, respectively. Enzymatic reaction was stopped by incubating at 90 °C for 20 min to
227 deactivate the enzyme. Control experiments with enzyme after thermal deactivation and without were
228 also carried out. Supernatant was diluted in ultra-pure water and filtered (0.2 µm) prior to analysis by
229 high performance liquid chromatography (HPLC). The conversion yields into chito-
230 mono/oligosaccharides were expressed as mean values with standard deviations (±) in mg of chito-
231 mono/oligosaccharides obtained per gram of chitin (mg / g chitin).

232

233 ***2.8 Yeast fermentation***

234

235 The growth medium was the yeast-malt (YM) medium: yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone
236 3 g/L, pH 4.8, containing no ethanologenic source (Mehmood et al., 2015). The YM medium was
237 supplemented with GlcNAc commercial substrate at 20 g/L and sterilized at 121 °C for 20 min. For
238 yeast fermentations on chitin hydrolysates, the YM medium components were added to the supernatant
239 issued from enzymatic reactions in quantity necessary to reach the final YM concentrations described
240 above, i.e. yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 3 g/L, pH 4.8, and then the whole medium
241 was sterilized at 121 °C for 20 min. All the fermentations were conducted in Erlenmeyer flasks with
242 cotton plugs at 30°C and 150 rpm after inoculation of a mid-log phase preculture of *S. stipitis* cells. The
243 yeast growth was routinely followed by measuring optical density at 600 nm (OD_{600nm}) values. The
244 biomass was determined as cell dry weight (g/L) after filtration through dried and pre-weighed
245 membrane filter with 0.22-µm pore size (Millipore, Ireland) with subsequent washing in physiological
246 water. The samples were freeze dried and weighted. All the experiments were realized at least twice.
247 Substrates and ethanol concentrations were determined by high performance liquid chromatography
248 (HPLC) Dionex Ultimate 3000 as described above. The theoretical maximum ethanol yield on GlcNAc
249 is 0.417 g of ethanol per gram of substrate (Inokuma, Hasunuma, & Kondo, 2016; Inokuma, Matsuda,
250 Sasaki, & Hasunuma, 2018).

251

252 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

253

254 ***3.1 Insect chitin versus Shrimp chitin***

255

256 ***3.1.1 Extraction process, composition and purity***

257 Chitin is always present as a protein/CaCO₃/chitin complex in the shells of crustaceans and insects. The
258 calcium carbonate deposits provide the rigidity (Rinaudo, 2006) on the structure. Thus, to obtain purified

259 chitin, or in other word, to eliminate the two other major constituents (proteins and CaCO₃),
260 deproteinization by alkali treatment and a demineralization by acidic treatment, are the two steps
261 classically used. It is noteworthy that demineralization is generally performed using HCl (a costly
262 process, causing environmental problems i.e. harmful effluent wastewater) and results in the degradation
263 of the native chitin, such as depolymerization (Foster & Webber, 1961; Percot, Viton & Domard, 2003).
264 The lower amount of CaCO₃ present into the insect exoskeleton (<6%), compared to the one of the
265 crustaceans (30-50%), is of great importance to preserve the physicochemical properties of chitin during
266 the extraction process (Finke, 2013; Finke, 2007; Kaya et al., 2017). Therefore, we decided to extract
267 three types of chitin from *Bombyx eri* larva source, with different purity grades **chitin-0 step**, **-1 step**
268 and **-2steps** respectively. The first one, so called **chitin-0 step** was obtained by separating the solid (raw
269 chitin) and the juice (lipids and proteins) with an extruder. After washing with water, ethanol and
270 acetone, the resulting protein/CaCO₃/chitin complex was therefore obtained. **Chitin-1 step** was then
271 obtained by deproteinization step from the **chitin-0 step** and the corresponding **chitin-2 steps** by
272 demineralization of the **chitin-1 step** (see material and method part). For comparison, chitins from
273 shrimp sources were obtained under the same extraction conditions and deproteinization step to get the
274 **chitin S-0 step** and **chitin S-1 step**, respectively (Chart 1).

275 We first determined the composition of our extracted chitins and so their purity. Indeed, the nitrogen
276 contents of the commercial and extracted chitins were measured and calculated using the Kjeldahl
277 method (Kirk, 1950) (Table 1). As expected, the nitrogen contents of the extracted chitins from insect
278 source decreased consistently after deproteinization step, from 10.30 to 6.03%, thereby confirming the
279 effectiveness of the alkali treatment. After acid treatment, no change was noticed (6.03%). By comparing
280 the values obtained for the **chitin S-0 step** and the **chitin S-1 step**, 9.23 and 2.91% respectively, same
281 conclusions could be drawn.

282 Using the methodology described by Diaz-Rojas et al. (2006) and assuming that crustacean and insect
283 shells are mainly composed only of chitin, proteins, minerals, lipids and water, we can estimate the
284 percentages of chitin and protein for each sample, Q and P respectively (Table 1) and then, the purity of
285 our extracted chitins. The procedure and equations used for this purpose are described in the supporting
286 information and Table S1. First, the values obtained for the **chitin-0 step** (45.8%) and the **chitin S-0**
287 **step** (49.7%) meant that the percentage of total proteins was slightly higher in the case of the shrimp
288 source. In addition, one important information, which could be highlighted from this study, was the
289 larger ratio of chitin in the crude insect skeleton (**chitin-0 step**, 45.0%) compared to the one of shrimp
290 (**chitin S-0 step**, 19.3%). This was mainly due to the lower mineral content (1.90% vs 21.73%)
291 determined by thermogravimetric analysis under air at 800 °C and described in the following part. In
292 addition, after only one step of extraction (deproteinization step), the purity of the **chitin-1 step** was
293 well above the one of the **chitin S-1 step** (89.7 vs 65%). The two extraction steps performed on the
294 insect skeleton resulted in a chitin with a slightly lower degree of purity than the commercial one (93.3%
295 vs 98.8%). We also assumed that the deproteinization step removed some minerals, which explained the

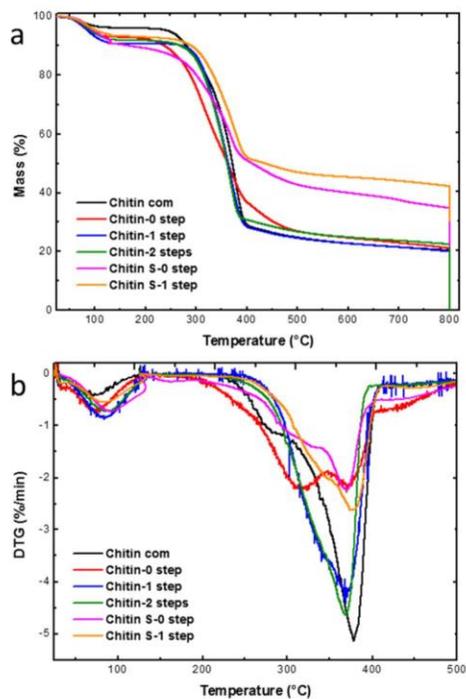
296 values of 0.75 and 30.31% found for the **chitin-1 step** and **chitin S-1 step** respectively. In the case of
297 samples containing a large amount of minerals, such as the **chitin S-1 step**, the protein content found
298 using this method was not reliable. Then, the percentage of chitin in this sample has been therefore over-
299 evaluated since we have only considered the presence of minerals, water and lipids.

300 To sum up, the low mineral contents found in the extracted chitins from *Bombyx eri* larva source (<
301 2%), regardless to the purity grade is of great importance. Indeed, it would firstly facilitate the extraction
302 process in terms of cost, time saving and waste water and secondly, higher degrees of polymerization
303 (DP) of the polymer should be preserved as already mentioned previously.

304

305 **3.1.2. Thermal stability and structural characterizations**

306 Significant information concerning these complexes may be obtained by TGA and differential thermal
307 analysis: (i) The first mass loss (<10 %) is observed below 100 °C for all samples which corresponded
308 to the water content. (ii) By comparing the DTG_{max} (Fig. 1b, Table 1) of the commercial and extracted
309 chitins ranging from 369 to 378 °C, we can conclude that there is no significant thermal stability
310 difference between shrimp and insect sources. (iii) The effectiveness of the deproteinization step under
311 the same conditions, independently from the chitin sources can be also noticed. In fact, when alkali
312 treatment was done on insect or shrimp sources to obtain the **chitin-1 step** or the **chitin S-1 step** (Fig
313 1b), we observed a clear disappearance of the derivative corresponding to the proteins (from 200 °C to
314 250 °C). These observations were validated by the results obtained after Kjeldahl analysis (Table 1)
315 (Kirk, 1950). (iv) The last issue of particular importance is the percentage of impurities depending on
316 the sources. These percentages of impurities (mainly minerals) were determined by thermogravimetric
317 analysis at 800 °C under air atmosphere and are reported in Table 1. As expected, values were notably
318 lower for the extracted chitins from insect sources even without a demineralization step (Table 1). Under
319 the same experimental conditions, percentages of impurities were found to be 21.7 and 30.3 % for **chitin**
320 **S-0 step** and **chitin S-1 step** versus 1.90 and 0.75 % for **chitin-0** and **-1 step**, respectively.



321
 322 Fig. 1 Thermogravimetric (a) and differential thermal analysis (b) of the commercially available and extracted
 323 chitins from shrimp and insect sources under argon atmosphere from 50 to 800 °C following by an isotherm at 800
 324 °C under air for 30 minutes.

325

326

327

328 Table 1.

329 Characterization data of the commercially available and extracted chitins from *Bombyx eri* larva and shrimp shells
 330 sources.

331

Chitin	CrI ^a (%)	DA ^b (%)	DTG ^c (°C)	Nitrogen content ^d (N, %)	H ₂ O ^e (%)	Ash content ^e (%)	Protein ^e (P, %)	Chitin purity ^e (Q, %)
Extracted chitins								
from <i>Bombyx eri</i> larva								
Chitin -0 step	41	ND	370	10.3	7.02	1.90	45.8	45.0
Chitin-1 step	61	ND	369	6.03	9.16	0.75	0.4	89.7
Chitin-2 steps	66	93	369	6.03	7.92	0.32	0	93.3
from shrimp shells								
Chitin S-0 step	ND	ND	370	9.23	9.23	21.73	49.7	19.3
Chitin S-1 step	42	100	375	2.91	6.53	30.31	ND	<65% ^f
Commercially available chitin from shrimp shells								
Chitin com	75 ^f	87 ^f	378	6.26	3.84	0	0	98.9

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

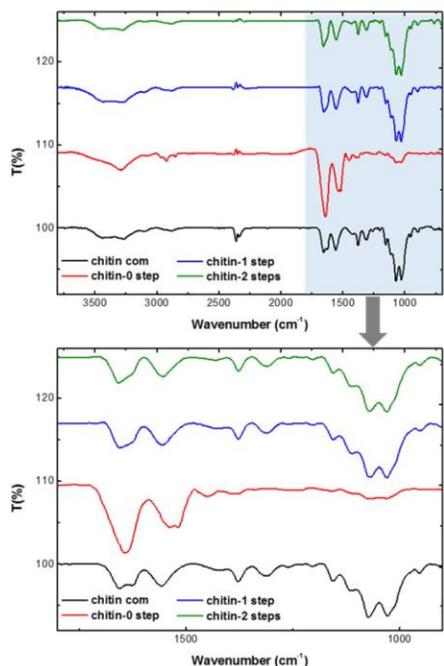
346

347

348

(a) calculated using XRD diffractograms and the amorphous subtraction region method; (b) evaluated by solid-state CP-MAS ¹³C NMR; (c) determined using thermogravimetric analysis under nitrogen atmosphere from 50 to 800 °C following by an isotherm at 800 °C under air for 30 minutes; (d) evaluated using the Kjeldahl method; (e) evaluated using the methodology described by Diaz-Rojas et al. (2006) ; (f) Husson et al., 2017; ND: Not determined.

ATR-FTIR is the most widely used technique for the determination of the crystallographic structure of chitin. Indeed, the amide I band of the α -chitin should have 2 peaks at around 1650 cm⁻¹ corresponding to inter- and intra-molecular hydrogen bonding (Rinaudo, 2006; Younes & Rinaudo, 2015). ATR-FTIR spectra of extracted chitins and commercial one is represented in Fig. 2 and in the SI Fig. S1-S6. The infrared spectrum of **chitin-0 step** showed barely intense band at around 1050 cm⁻¹ characteristic of the carbon skeleton of chitin compared to commercial chitin. This is due to the presence of a large amount of proteins represented by one intense amide band at around 1640 cm⁻¹ (same observation was noticed for the **chitin S-0 step**, fig. S5, SI), whereas the IR spectra of the **chitin-1** and **-2 steps** displayed 2 bands at 1630 and 1655 cm⁻¹ respectively. These two characteristic bands were also present in the IR spectra of the commercial chitin and represent the crystalline α form.



349
350

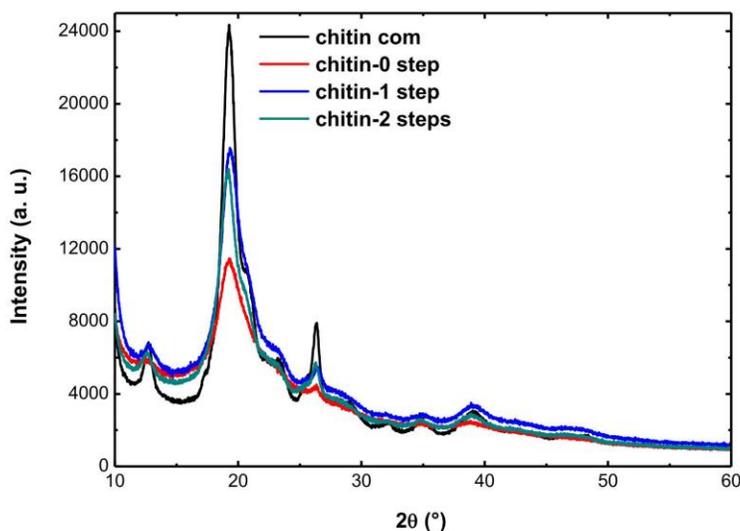
351 Fig. 2 Top: ATR-FTIR spectra of **chitin com** (black line), extracted **chitin-0 step** (red line), **chitin-1 step** (blue
352 line) and **chitin-2 steps** (green line). Bottom: Zoom of the 1800-700 cm^{-1} range.

353

354 α -crystallographic structure has been also confirmed by solid state ^{13}C NMR since the C_3 and C_5 signals
355 at around 75 and 73 ppm respectively in the extracted chitins from insect are separated which is not the
356 case in the crystalline β -form (Fig. S10, S12 and S14 in the SI) (Cortizo, Berghoff & Alessandrini, 2008;
357 Jang, Kong, Jeong, Lee & Nah, 2003). Solid state ^{13}C NMR is one of the most accurate to determine the
358 degree of acetylation (DA) in chitin. In the insect cuticle, chitin is always covalently bound to catechol
359 and scerotin-like proteins (Majtán et al., 2007), and due to the overlapping of the methyl signal and
360 signals coming from the catechol molecule, we were unable to calculate the DA of **chitin 0-step** and
361 **chitin 1-step** (See the SI Fig. S10 and S12). For the extracted **chitin 2-steps** and **chitin S 1-step** the DA
362 were found to be respectively 93 and 100% (See the SI Fig. S14 and S16) close to the 87% value of the
363 commercial chitin (Fig. S7, in the SI).

364 It is well known that chitin possess crystalline and amorphous regions where the crystallinity is due to
365 an inter- and intra-molecular hydrogen-bonding network. These crystallinity indexes (CrI) were
366 calculated on the basis of X-ray diffractograms shown on Figure 3. **Chitin 2-steps** showed similar X-
367 ray pattern (obtained in the 2θ range of $10\text{-}60^\circ$) to the one of commercial chitin with four characteristic

368 crystalline reflections at 19.3 (strongest one), 20.8, 23.3 and 26.4°. The CrI was found to be significantly
369 higher for the **chitin com**, 75% versus 61% and 66% for the **chitin-1** and **-2 steps** respectively. Broad
370 signals were obtained in the case of the **chitin 0-step** confirming that further purification is necessary
371 such as the removal of proteins (same observation was noted for the **chitin S-0 step**, Fig. S18, SI) (Paul
372 et al., 2015).
373

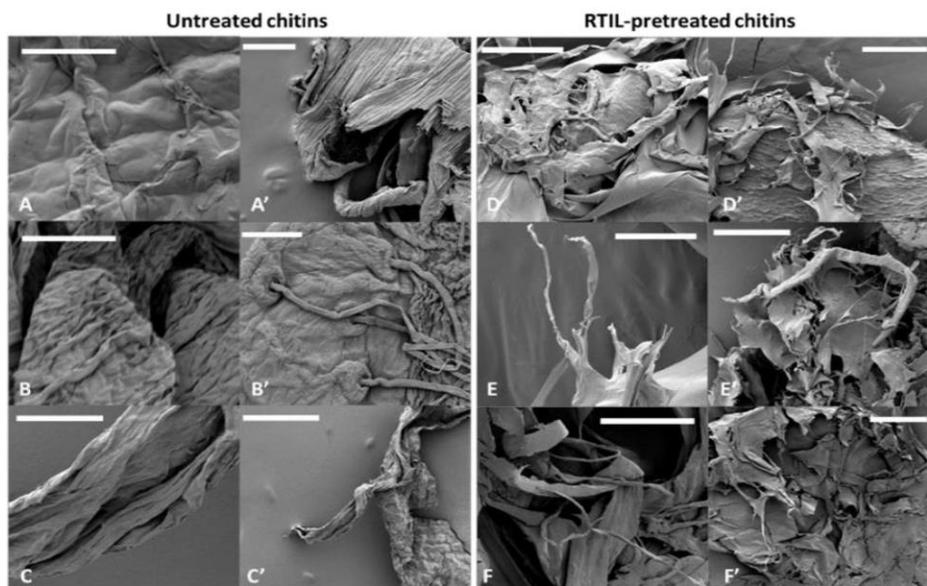


374
375 Fig. 3 Diffractograms of **chitin com** (black line), **chitin-0 step** (red line), **chitin-1 step** (blue line) and
376 **chitin-2 steps** (green line).

377
378 In summary, in our study which are supported by ¹³C CP-MAS NMR, XRD, FT-IR and TGA
379 measurements we can conclude that extracted chitin from insect present the same crystalline allomorph
380 (α -form) but lower crystallinity index (61% for the **chitin-1step** vs 75% for the commercially available
381 chitin). Indeed, since strong acidic hydrolysis can be employed to remove amorphous regions and isolate
382 crystalline regions (Pereira, Muniz, & Hsieh, 2014), we assume that this difference in crystallinity
383 indexes is related to higher DP for the **chitin-1 step**. This could also explain the slightly lower DTG_{max}
384 (369% for the **chitin-1step** vs 378% for the commercially available chitin) since crystalline regions are
385 thermodynamically more stable than amorphous regions.

386
387 Finally, SEM images of extracted chitins from insect source are represented in Fig. 4. The morphology
388 of the extracted **chitin S-0** or **-1 step** from shrimp (see SEM images Fig. S23 and S24, SI) showed
389 nanofibers and pores together in agreement with the literature (El Knidri, 2017; Ifuku, Shervani &

390 Saimoto, 2013). The extracted chitins from insect, however, presented a smooth surface morphology
 391 where pores were not detected (Fig. 4, A-C).
 392



393
 394
 395 Fig. 4 SEM images of **chitin-0 step** (A and A') and **[C₂mim][OAc]-pretreated chitin-0 step** (D and
 396 D'); **chitin-1 step** (B and B') and **[C₂mim][OAc]-pretreated chitin-1 step** (E and E'); and **chitin-2**
 397 **steps** (C and C') and **[C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps** (F and F'). Pretreatment: 40 minutes at
 398 110°C. Bars represent 20 μm (A-F) and 100 μm (A'-F').

399

400

401 *3.2 Ionic Liquid Pretreatment of chitins from Bombyx eri larva and effects on the morphological* 402 *structure and the composition*

403

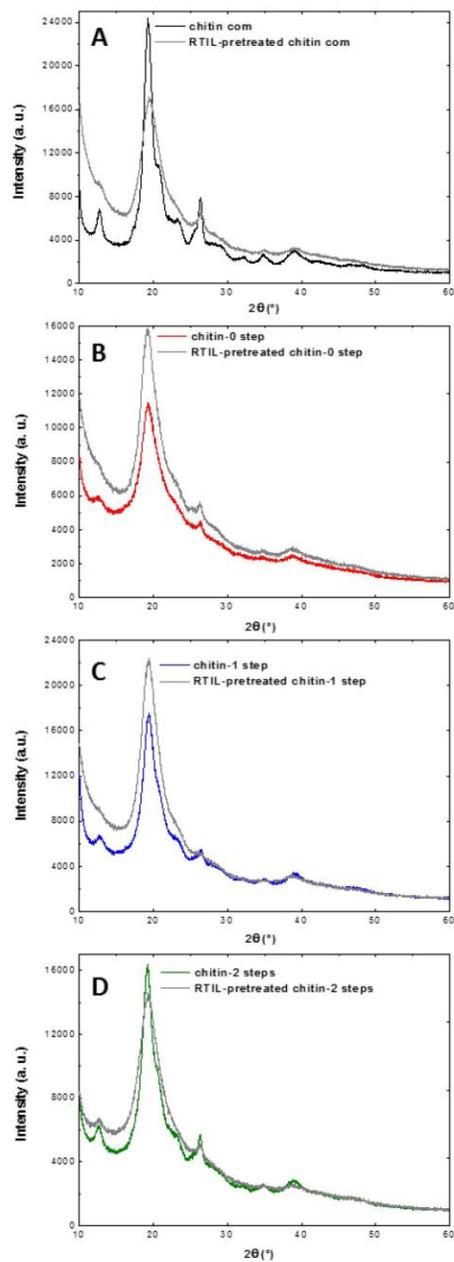
404 Chitin is a polymer even more difficult to dissolve than cellulose in most solvents. Pretreatment
 405 consisting in solubilizing chitin into ionic liquids can overcome this weak solubility and hence increase
 406 the chitin process ability by creating new materials (sponges, films, microspheres, and aerogels) or to
 407 enhance efficiency of subsequent saccharification process. From 2002 with the work proposed on
 408 cellulose by Swatloski et al. RTILs have been intensively used as potential solvents for some
 409 polysaccharides, vegetal biomasses (lignocellulosic biomass) (van Osch et al., 2017; Yoo & Ragauskas,
 410 2017; Zhang, Hu, & Lee, 2017) and more recently animal biomass (Husson et al., 2017; Silva, Mano &
 411 Reis, 2017, Shen et al., 2016). Keeping in mind large-scale applications, the ecotoxicity as well as

412 biodegradability are key criterions in selecting the IL for this study. It is well-known that 1-ethyl-3-
413 methylimidazolium acetate [C₂mim][OAc] is considered as reasonably non-toxic and non-corrosive
414 compared to 1-butyl-3-methylimidazolium chloride or 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride (Liu,
415 Wang, Buyondo, Wang & Garver, 2012). Moreover, the feasibility of scale-up with this ionic liquid (IL)
416 was demonstrated on lignocellulosic biomass deconstruction pointing out as well challenges still
417 existing prior to pilot scale demonstration (Liang et al., 2018). Previous studies also reported that the
418 dissolution of chitin in ILs depends on different factors including: (i) DA and MW: LMW chitins are
419 more soluble in IL; (ii) the crystallinity *i.e.* β -chitin has a parallel arrangement with weak intermolecular
420 forces leading to higher reactivity and affinity for solvent compared to α -chitin; (iii) the nature of the
421 cation of the ILs: a short alkyl chain on the IL enhance the solubility of chitin; and (iv) the nature of the
422 anion of the IL since chitin requires a more basic anion such as acetate due to the increased number of
423 hydrogen bond donors and acceptors compared to cellulose (Remsing, Swatloski, Rogers, & Moyna,
424 2006; Wang, Zhu, Wang, Huang, & Wang 2010; Barber, Griggs, Bonner, & Rogers, 2013; Kadokawa,
425 2015 ; Jaworska, Górak, & Zdunek, 2017).

426 Therefore, extracted chitins (**chitin-0**, **-1** and **-2 steps**) were pretreated under mild conditions with
427 [C₂mim][OAc] as previously described (Husson et al., 2017). The effect of RTIL pretreatment on chitin
428 structures were investigated, characterized (Table 2 and SI) and correlated with the data obtained in the
429 enzymatic hydrolysis part.

430 SEM observation revealed a significant effect of RTIL-pretreatment on morphology and microstructure
431 of all the extracted chitins. Such pretreatment created delaminated structures, detached thin sheets and,
432 occasionally, separated microfibrils, from a denser and smoother untreated chitin material (Fig. 4, A-C
433 vs D-F).

434 The α -chitin structure remained for the pretreated **chitin-1** and **-2 steps** as shown in the FT-IR spectra
435 (SI, Fig. S2 C/D) with the presence of the amine I and II bands before and after pretreatment, in
436 agreement with our previous work (Husson et al, 2017). X-ray diffraction was also used to follow the
437 change of chitin crystalline structure after pretreatment. For untreated and pretreated samples, the 19.3°
438 (strongest one) and 26.4 °peak positions remains essentially the same. However, crystallinity of
439 regenerated **chitin-1** and **-2 steps** decreased if RTIL pretreatments were applied, (Fig. 6 and Table 2).
440 These changes in crystallinity could be caused either by disruption of the crystal structure itself or
441 changes in particle structure (surface corrugation) connected with defects in crystal structure of particles
442 (Jaworska & Górak, Zdunek, 2017).



443
 444 Fig. 6 Diffractograms of untreated and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin com (A), of untreated and
 445 [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-0 step (B), of untreated and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-1
 446 step (C) and of untreated and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps (D).
 447

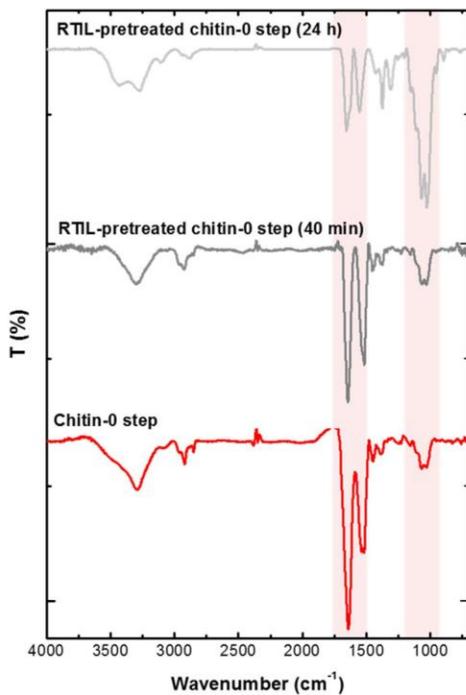
448

449

450 The decrease of CrI would be consistent with the above SEM observations. In addition, DAs were not
451 affected by the pretreatment (see SI, fig. S8, S11, S13 and S15). On the contrary, a significant decrease
452 in the DTG_{max} after RTIL-pretreatment was observed for the **chitin com** and the extracted **chitin-1** and
453 **2 steps** (Fig. 5 and Table 1) indicating the depolymerization of the polymer or a change from crystalline
454 to amorphous form as observed for lignocellulosic biomass.

455 In addition, we assume that RTIL-pretreatment for 40 minutes led to a higher chitin purity since, in all
456 cases, the disappearance of the band corresponding to the proteins was observed by TGA analysis (Fig.
457 1). This observation was confirmed with the loss of the band corresponding to the proteins at around
458 1640 cm^{-1} in the IR spectra especially in the case of the pretreated **chitin-0 step** (Fig. 5B). From that
459 perspective and with the aim of determining the nitrogen content in the extracted chitins, **chitin-0**, **-1**
460 and **-2 steps** but also **chitin S-0 step** were pretreated for 24h following the procedure described
461 previously. After 24 h of RTIL-pretreatment, chitin solubility increased suggesting that RTIL disrupted
462 intra-chain bonds improving solubility and the removal of some residual proteins.

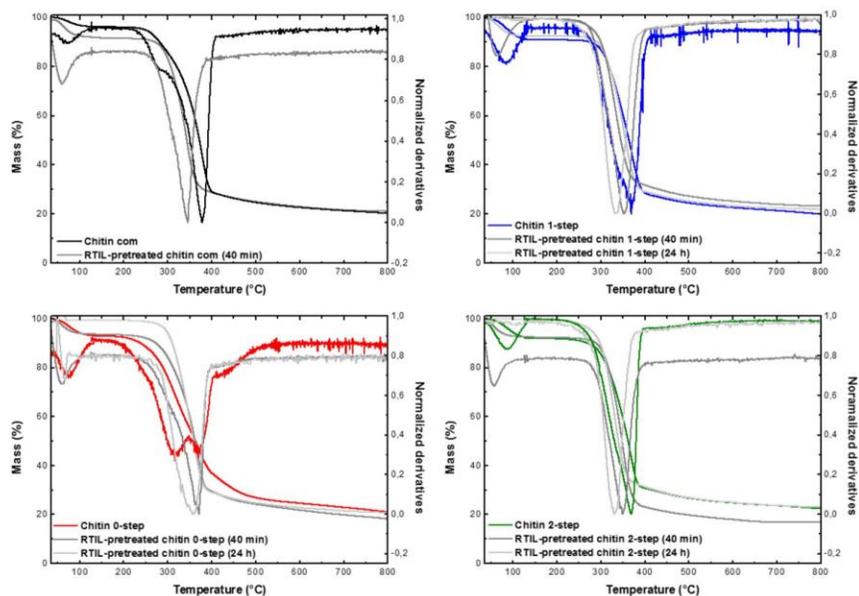
463



464

465 Fig. 7 ATR-FTIR spectra of untreated and [C₂mim][OAc]-pretreated **chitin-0 step** for 40 minutes and
466 24h.

467



468

469 Fig. 5 Thermogravimetric and differential thermal analysis of untreated and [C₂mim][OAc]-pretreated
 470 chitin com (A), chitin-0 step (B), chitin-1 step (C) and chitin-2 steps (D), under argon atmosphere.

471

472 Decreases of the CRIs, calculated from the X-ray diffractograms, were observed in the case of the **chitin-**
 473 **1** and **-2 steps** after 24 h of pretreatment (Table 1, see also SI Fig. S21 and S22). Depolymerization of
 474 the polymer and/or change from crystalline to amorphous form were also confirmed with the decrease
 475 of the DTG_{max}. The DTG_{max} values obtained after 24h of pretreatment were significantly lower than
 476 those obtained after 40 minutes (Table 2, Fig. 5 and see also the SI, Fig. S29, S31-S33). These
 477 observations are consistent with the SEM micrographs, where thin layers of chitin were obtained (see
 478 the SI, Fig. S25-28).

479 The RTIL-pretreatment purification of the **chitin-0 step** has been also highlighted thanks to the
 480 determination of the nitrogen content (See SI, Table S1). Indeed, after 40 minutes and 24 h of RTIL-
 481 pretreatment of the extracted **chitin-0 step**, this percentage decreased from 10.3 to 9.2 and 7.5%
 482 respectively. More recently, it was noticed after the 24 h RTIL-pretreatment of the **chitin S-0 step**, the
 483 nitrogen content dropped from 9.23 to 5.76%. These data were consistent with the IR spectra of the
 484 pretreated chitins depicted in Figure 7. In agreement with literature data, the [C₂mim][OAc] was not
 485 only a good solvent to pretreat chitin but could also remove proteins as well as minerals residues (Qin,
 486 Lu, Sun, & Rogers, 2010).

487

488

489 Table 2. Characterization data of the untreated and RTIL-pretreated chitins.

Chitin	CrI ^a (%)	DA ^b (%)	N content ^c (%)	Ash content ^d (%)	DTG _{max} ^d (°C)
Extracted chitins from <i>Bombyx eri</i> larva					
Chitin-0 step	41	ND	10.3	1.90	370
RTIL-pretreated Chitin-0 step (40min)	38	100	9.2	0.36	371
RTIL-pretreated Chitin-0 step (24h)	63	ND	7.5	0.57	354
Chitin-1 step	61	ND	6.03	0.75	369
RTIL-pretreated Chitin-1 step (40min)	46	93	ND	<0.25	352
RTIL-pretreated Chitin-1 step (24h)	41	ND	5.85	<0.25	331
Chitin-2 steps	66	93	6.03	0.32	369
RTIL-pretreated Chitin-2 steps (40min)	42	95	ND	1.03	349
RTIL-pretreated Chitin-2 steps (24h)	34	ND	ND	ND	330
Extracted chitins from shrimp shells					
Chitin S-0 step	ND	ND	9.23	21.73	370
RTIL-pretreated Chitin S-0 steps (24h)	58	ND	5.79	14.87	358
Chitin S-1 step	42	100	2.91	30.31	375
Commercially available chitin from shrimp shells					
Chitin com	75 ^g	87 ^g	6.26	<0.25	378
Purified chitin com	82	92	6.11	ND	382
RTIL-pretreated Chitin com (40min)	50 ^g	91 ^g	ND	0.26	347

490

491 (a) calculated using XRD diffractograms and the amorphous subtraction region method; (b) evaluated by solid-state CP-MAS
492 ¹³C NMR; (c) evaluated using the Kjeldahl method; (d) determined using thermogravimetric analysis under nitrogen
493 atmosphere from 50 to 800 °C following by an isotherm at 800 °C under air for 30 minutes; (g) Husson et al., 2017; ND : Not
494 determined.

495

496 3.3 Enzymatic hydrolysis of chitins: impact of [C₂mim][OAc]-pretreatment.

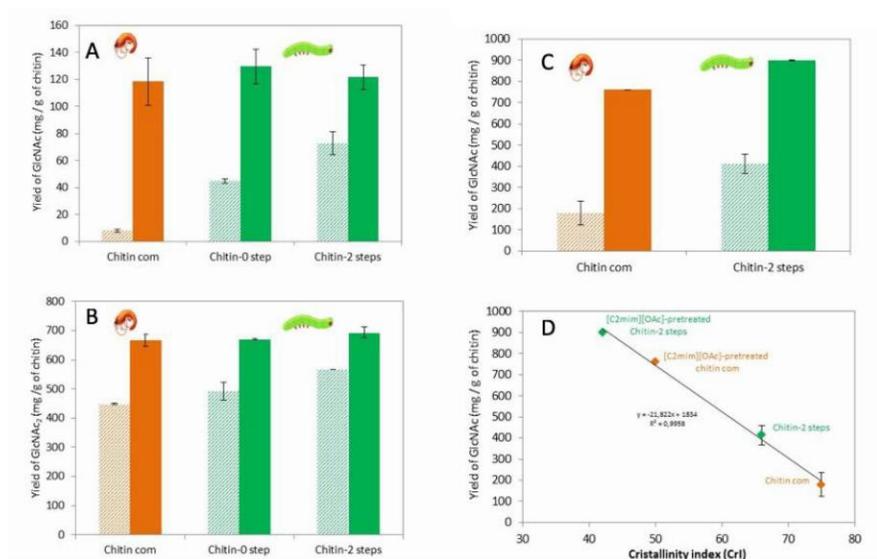
497

498 In this part, we propose to investigate the enzymatic hydrolysis of the chitins extracted from *Bombyx eri*
499 larva (**chitin-0 step** and **chitin-2 steps**) at different purity grades and the impact of [C₂mim][OAc]-
500 pretreatment on the performances. For this, the pathway consisting in the chitinase-catalyzed hydrolysis
501 of [C₂mim][OAc]-pretreated chitins in an aqueous medium was selected. Indeed, we demonstrated
502 recently the relevance of this route in the case of commercially available chitin from shrimp (**chitin**
503 **com**) (Husson et al, 2017).

504 Hydrolysates obtained with the chitinase from *Trichoderma viride* contained mainly the *N*-
505 acetylglucosamine monomer while chitinase from *Streptomyces griseus* led to a hydrolysate enriched in
506 *N,N'*-diacetylchitobiose dimer (HPLC chromatograms obtain after enzymatic hydrolysis and ¹H/¹³C
507 NMR characterization of *N*-acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose are presented into the
508 supplementary material, Figs. 34 to 39). This selectivity was maintained whatever the purity of chitins
509 and the implementation of [C₂mim][OAc]-pretreatment. An opposite result was recently reported by
510 Berton et al. (2018) who suggested that the selectivity of the chitinase from *S. griseus* could be
511 influenced by the purity grade of chitin (Berton, Shamshina, Ostadjoo, King & Rogers, 2018). In this
512 context, we thus suggested that the source of chitin would be also a potential influencing parameter.

513

514



515

516

517 Fig. 8 (A) *N*-Acetylglucosamine or (B) *N,N'*-diacetylchitobiose yield (mg per g of chitin) at 24 h of
 518 enzymatic hydrolysis of chitins, before (stripped bars) and after (full bars) RTIL-pretreatments,
 519 catalyzed by the respective chitinase from *T. viride* (top) or *S. griseus* (bottom); (C) *N*-
 520 Acetylglucosamine yields obtained by the enzymatic hydrolysis of extracted and commercial chitins in
 521 aqueous buffer before (stripped bars) and after (full bars) [C₂mim][OAc]-pretreatment (these reactions
 522 were catalyzed by the chitinase from *S. griseus* for 24 h then supplemented with the chitinase from *T.*
 523 *viride* for 12 h) and (D) correlation of *N*-acetylglucosamine yields and initial CrI of chitins before
 524 enzymatic hydrolysis.

525

526 Concerning the chitinase from *T. viride*, the data reported in the Figure 8 (A) clearly showed that the
 527 untreated chitins (**chitin-0 step** and **chitin-2 steps**), regardless their purity, exhibited a higher enzymatic
 528 digestibility (44.8 and 72.9 mg/g, respectively) than **chitin com** (7.9 mg/g). After [C₂mim][OAc]-
 529 pretreatment, enzymatic hydrolysis was significantly improved and the yields obtained for the three
 530 distinct substrates were similar (123 mg/g in average). Likewise, Figure 8 (B) showed that hydrolyses
 531 of untreated chitins catalyzed by the chitinase from *S. griseus* led to yields of GlcNAc₂ superior to 400
 532 mg/g whatever the sources and the purity grade. It could be noticed that insect chitins present again a
 533 better digestibility with this enzyme in comparison to **chitin com**. After [C₂mim][OAc]-pretreatment,
 534 an increase of the performances by a factor 1.4 was observed and very competitive yields of GlcNAc₂
 535 can be achieved for the three chitins. Interestingly, the yield obtained for **chitin com** (667.8 mg/g) was
 536 similar to those obtained for the **chitin-0 step** (669.5 mg/g).

21

537 Then, the combination of the two chitinases in two subsequent hydrolysis steps were applied to **chitin-**
538 **2 steps** and **chitin com** before and after [C₂mim][OAc]-pretreatment (Fig. 8C). The untreated **chitin-2**
539 **steps** exhibited again a higher digestibility (413.3 mg/g) than the untreated **chitin com** (179.1 mg/g).
540 After [C₂mim][OAc]-pretreatment, the production of GlcNAc from the **chitin-2 steps** was significantly
541 improved (by a factor 2.2) and achieved a very promising value of 899.2 mg/g of chitin (vs 760 mg/g
542 for **chitin com**). Reporting yield of GlcNAc as a function of CrI (Fig. 8D) evidenced a linear relationship
543 between the structural parameter and the enzymatic digestibility suggesting that the performances of
544 enzymatic depolymerisation could be counter-balanced by the decrease of the CrI. In this way,
545 [C₂mim][OAc]-pretreatment remains thus a promising pretreatment to disrupt the highly ordered intra-
546 and inter-chain hydrogen bond network of chitin allowing also to efficiently produce COS by enzymatic
547 route.

548

549 **3.4 Fermentescibility of enzymatic hydrolysates.**

550

551 The enzymatic hydrolysates were then tested for their ability to be valorized by microbial fermentation.
552 The molecule of interest targeted here was the ethanol which could be obtained from the yeast
553 *Scheffersomyces stipitis* on GlcNAc (Inokuma, Hasunuma, & Kondo, 2016; Inokuma, Matsuda, Sasaki,
554 Hasunuma & Kondo, 2018). Thus, we experimented this strain fermentation in aerobic conditions in
555 classical shake flasks with cotton plugs in a culture medium containing no ethanologenic substrate
556 (Mehmood et al., 2015, 2018) supplemented either with commercial GlcNAc or with the enzymatic
557 hydrolysates of [C₂mim][OAc]-pretreated chitins from shrimp shells or *Bombyx eri* larva. *S. stipitis*
558 could grow and consume totally the substrates in all the conditions tested (see SI, Fig. S40). An ethanol
559 production was observed on all the samples containing the monomer GlcNAc, whatever their origin
560 whereas no ethanol could be detected on chitin hydrolysates rich in dimer GlcNAc₂ (see Table S2, SI).
561 Without optimization of the parameters, the higher yield was obtained on commercial GlcNAc, equal to
562 0.19 g ethanol/g GlcNAc. The *S. stipitis* fermentations on chitin hydrolysates led to ethanol yields of
563 0.14 g/g for shrimp chitin and 0.09 g/g for *Bombyx eri* larva chitin, corresponding to maximum
564 theoretical yields of 32.5% and 22.3% respectively. These values are lower compared to commercial
565 substrates (44.7%), but show undeniably the feasibility of the valorization process of chitin issued from
566 shellfish or insect in ethanol. These results also imply that all the products used in the first steps of chitin
567 extraction (or co-products formed simultaneously) like deproteinization, demineralization or RTIL-
568 pretreatment were not a radical hindrance to yeast fermentation, even if a lot of work remains to
569 accomplish in order to optimize the ethanolic production. One can suppose that the fermentation process
570 could be realized with another fermentative microorganism in order to produce other molecules of
571 interest with higher added value than ethanol.

572

573 **4. CONCLUSIONS**

574 Herein, we reported for the first time the chitin extraction from a new species of insect by demonstrating
575 that *Bombyx eri* larva is a source of chitin with great potential since the skeleton contains 45% of chitin
576 versus 19.3% for the shrimp shells. Moreover, after only one step of extraction, we obtained a chitin
577 with the high purity grade of almost 90%, mainly because of the low mineral contents. In addition,
578 untreated chitins extracted from *Bombyx eri* larva, exhibit a better enzymatic digestibility in comparison
579 to the commercially available chitin from shrimp shells. After [C₂mim][OAc]-pretreatment, a very
580 competitive yields of GlcNAc can be achieved by chitinase-catalyzed hydrolysis, suggesting that
581 *Bombyx eri* larva would be thus a more relevant source of chitin for selective enzymatic production of
582 COS. Finally, our fermentation results showed for the first time that *S. stipitis* produced ethanol on
583 commercial GlcNAc in aerobic conditions, but also on enzymatic hydrolysates of chitins derived from
584 shrimp and from the new *Bombyx eri* larva insect source after a [C₂mim][OAc]-pretreatment. This is the
585 first report of a natural wild-type yeast strain producing ethanol on chitin derivatives, highlighting the
586 great potentialities of this substrate. Some further optimization would nevertheless be necessary for a
587 cost-effective production of high added value molecules in a concept of insect biorefinery. Nevertheless,
588 we believe that chitin extracted from insects can be a complementary and competitive resource for the
589 chitin market.

590

591 **ACKNOWLEDGEMENTS**

592 ANVN thanks the ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche for
593 financial support.

594

595 **References**

596 Álvarez-Añorve, L. I., Calcagno, M. L., & Plumbridge, J. (2005). Why does *Escherichia coli* grow
597 more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric
598 activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 2974-2982.

599

600 Aspras, I., Kamińska, M., Karzyński, K., Kawka, M. & Jaworska M. M. (2016). The influence of
601 selected ionic liquids on activity of chitin deacetylase. *Chemical and Process Engineering*, 37(1), 77-
602 82.

603

604 Auxenfans, T., Buchoux, S., Djellab, K., Avondo, C., Husson, E., & Sarazin, C. (2012). Carbohydrate
605 Polymers, 2012, Mild pretreatment and enzymatic saccharification of cellulose with recycled ionic
606 liquids towards one-batch process. *Carbohydrate Polymers*, 90, 805-813.

607

608 Auxenfans, T., Buchoux, S., Larcher, D., Husson, E., Husson, G., & Sarazin, C. (2014). Enzymatic
609 saccharification and structural properties of industrial wood sawdust: recycled ionic liquids
610 pretreatments. *Energy Conversion and Management*, 88, 1094-1103.
611

612 Auxenfans, T., Husson, E., & Sarazin, C. (2017). Simultaneous pretreatment and enzymatic
613 saccharification of (ligno) celluloses in aqueous-ionic liquid media: A compromise. *Biochemical
614 Engineering Journal*, 117 (Part A), 77-86.
615

616 Barber, P. S., Griggs, C. S., Bonner, J. R., & Rogers, R. D. (2013). Electrospinning of chitin nanofibers
617 directly from an ionic liquid extract of shrimp shells. *Green Chemistry*, 15, 601-607.
618

619 Berton, P., Shamshina, J. L., Ostadjoo, S., King, C. A., & Rogers, R. D. (2018). Enzymatic hydrolysis
620 of inic liquid-extracted chitin. *Carbohydrate Polymers*, 199, 228-235.
621

622 Cao, T., Li, Y., Jiang, L., Yuan, L., Dong, L., Li, Y., & Yin, S. (2016). Novel biologically active series
623 of N-acetylglucosamine derivatives for the suppressive activities on GAG release. *Carbohydrate
624 Research*, 433, 73-79.
625

626 Chaudhari, S. S., Arakane, Y., Specht, C. A., Moussian, B., Boyle, D. L., Park, Y., Kramer, K. J.,
627 Beeman, R. W., & Muthukrishnan, S. (2011). Knickkopf protein protects and organizes chitin in the
628 newly synthesized insect exoskeleton. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the United
629 States of America*, 108, 17028-17033.
630

631 Cortizo, M. S., Berghoff, C. F., & Alessandrini, J. L. (2008). Characterization of chitin from *Illex
632 argentinus* squid pen. *Carbohydrate Polymers*, 74, 10-15.
633

634 Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R. & Rocha, J. (2002). Determination of the degree of
635 acetylation of chitin materials by C-13 CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological
636 Macromolecules*, 28, 359-363.
637

638 Díaz-Rojas, E. I., Argüelles-Monal, W. M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J., &
639 Goycoolea, F. M. (2006). Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin
640 from shrimp waste. *Macromolecular Bioscience*, 6, 340-347.
641

642 EL Knidri, H., Belaabed, R., El khalfaouy, R. Laajeb, A., Addaou, A., & Lahsini, A. (2017).
643 Physicochemical characterization of chitin and chitosan croducted from Parapenaeus Longirostris
644 shrimp shell wastes. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8, 3648-3653.
645
646 Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2001). Conversion of
647 chitinous wastes to hydrogen gas by clostridium paraputrificum M-21. *Journal of Bioscience and*
648 *Bioengineering*, 91(4), 339-343.
649
650 Finke, M. D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26, 105-115.
651
652 Finke, M. D. (2013). Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biology*, 32, 27-
653 36.
654
655 Foster, A. B. & Webber, J. M. (1961) Chitin. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 15, 371-393.
656
657 Gahukar, R. T. (2006). Edible insects farming: Efficiency and impact on family livelihood, food
658 security, and environment compared with livestock and crops, Chapter 4, 85-111.
659
660 Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., & Fountoulaki, E. (2015). Review on the use of insects in the diet of
661 farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 1-22.
662
663 Hanboonsong, Y., Jamjanya, T., & Durst, P.B. (2013). Six-Legged Livestock: Edible Insect Farming,
664 Collection and Marketing in Thailand. Food and Agriculture Organization, Regional Office for Asia and
665 the Pacific, RAP publication 2013/03, Bangkok, Thailand.
666
667 Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrière, J., Versali, M. F., & Rinaudo, M. (2000). Solid state NMR for
668 determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 1, 746-751.
669
670 Husson, E., Buchoux, S., Avondo, C., Cailleu, D., Djellab, K., Gosselin, I., Wattraint, O., & Sarazin, C.
671 (2012), Enzymatic hydrolysis of ionic liquid-pretreated celluloses: Contribution of CP-MAS 13C NMR
672 and SEM. *Bioresource Technology*, 102, 7335-7342.
673
674 Husson, E., Hadad, C., Huet, G., Laclef, S., Lesur, D., Lambertyn, V., Jamali, A., Gottis, S., Sarazin C.
675 & Nguyen Van Nhien, A. (2017). The effect of room temperature ionic liquids on the selective
676 biocatalytic hydrolysis of chitin via sequential or simultaneous strategies. *Green Chemistry*, 19, 4122-
677 4133.
678

679 Ifuku, S., Shervani, Z., & Saimoto, H. (2013). Chitin nanofibers, preparations and applications. Chapter
680 from the book *Advances in Nanofibers*.
681
682 Ioelevich, M. (2014). Crystallinity and hydrophilicity of chitin and chitosan. *Research & Reviews: Journal*
683 *of Chemistry*, 3, 7-14.
684
685 Inokuma, K., Takano, M., & Hoshino, K. (2013). Direct ethanol production from *N*-acetylglucosamine
686 and chitin substrates by *Mucor* species. *Biochemical Engineering Journal*, 72, 24–32.
687
688 Inokuma, K., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2016). Ethanol production from *N*-acetyl-D-glucosamine by
689 *Scheffersomyces stipitis* strains. *AMB express*, 6, 83-90.
690
691 Inokuma, K., Matsuda, M., Sasaki, D., Hasunuma, T. & Kondo, A. (2018). Widespread effect of *N*-
692 acetyl-D-glucosamine assimilation on the metabolisms of amino acids, purines, and pyrimidines in
693 *Scheffersomyces stipitis*. *Microbial Cell Factories*, 17, 153-164.
694
695 Jang, M.-K., Kong, B.-G., Jeong, Y.-I., Lee, C. H. & Nah, J.-W. (2003). Physicochemical
696 characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer*
697 *Science Part A: Polymer Chemistry*, 42, 3423-3432.
698
699 Jaworska, M. M., Kozlecki, T., & Gorak, A. (2012). Review of the application of ionic liquids as
700 solvents for chitin. *Journal of Polymer Engineering*, 32, 67-69.
701
702 Jaworska, M. M., Górak, A. & Zdunek, J. (2017). Modification of chitin particles with ionic liquids
703 containing ethyl substituent in a cation. *Advances in Materials Science and Engineering*, 1-9.
704
705 Kadokawa, J.-I. (2015). Fabrication of nanostructured and microstructured chitin materials through
706 gelation with suitable dispersion media. *RSC Advances*, 5, 12736-12746.
707
708 Kasaai, M. (2009). Various methods for determination of the degree of *N*-acetylation of chitin and
709 chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1667.
710
711 Kaya, M., Baublys, V., Can, E., Šatkauskienė, I., Bitim, B., Tubelyte, V. & Baran, T. (2014).
712 Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*)
713 and a crustacean species (*Oniscus asellus*). *Zoomorphology*, 133, 285–293.
714

715 Kaya, M., Baublys, V., Satkauskienė, I., Akyuz, B., Bulut, E., & Tubelyte, V. (2015). First chitin
716 extraction from *Plumatella repens* (Bryozoa) with comparison to chitins of insect and fungal origin.
717 *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 126-132.
718

719 Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, Cakmak, M. Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Mentis, A., & Sezen,
720 G. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant
721 activities from Cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering*,
722 20, 168-179.
723

724 Kaya, M., Sargin, I. Sabeckis, I., Noreikaite, D., Erdonmez, D., Salaberria, A. M., Labidi, J., V. Baublys,
725 V., & Tubelyte, V. (2017). Biological, mechanical, optical and physicochemical properties of natural
726 chitin films obtained from the dorsal pronotum and the wing of cockroach. *Carbohydrate Polymers*, 163,
727 162-169.
728

729 Kirk, P. L. (1950). Kjeldahl Method for Total Nitrogen. *Analytical Chemistry*, 22, 354-358.
730

731 Kumar, M. J., Jamaluddin, M. S., Natarajan, K., Kaur, D., & Datta, A. (2000). The inducible *N*-
732 acetylglucosamine catabolic pathway gene cluster in *Candida albicans*: Discrete *N*-acetylglucosamine-
733 inducible factors interact at the promoter of NAG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
734 *of the United States of America*, 97(26), 14218-14223.
735

736 Liang, L., Yan, J., He, Q., Luong, T., Pray, T.R., Simmons, B.A., & Sun, N. (2018) Scale-up of biomass
737 conversion using 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate as the solvent. *Green Energy & Environment*, in
738 press.
739

740 Liu, S., Wang, Y., Buyondo, J. P., Wang, Y., & Garver, M. (2012). Biochemical Conversion. In P. R.
741 Stuart and M. M. El-Halwagi (Eds.), *Integrated biorefineries: design, analysis, and optimization* (1st
742 ed.).
743

744 Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C., & Yang, Q. (2012). Extraction and
745 characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky. *Molecules*, 17, 4604-4611.
746

747 Marei, N. H., El-Samie, E. A., Salah, T., Saad, G. R., & Elwahy, A. H.M. (2016). Isolation and
748 characterization of chitosan from different local insects in Egypt. *International Journal of Biological*
749 *Macromolecules*, 82, 871-877.
750

751 Majtán, J., Biliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G., & Simúth, J. (2007). Isolation and
752 characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological*
753 *Macromolecules*, 40, 237-241.

754

755 Mehmood, N., Husson, E., Jacquard, C., Wewetzer, S., Büchs, J., Sarazin, C., & Gosselin, I. (2015).
756 Impact of two ionic liquids, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate and 1-ethyl-3-methylimidazolium
757 methylphosphonate, on *Saccharomyces cerevisiae*: metabolic, physiologic, and morphological
758 investigations. *Biotechnology for Biofuels*, 8, 17-30.

759 Mehmood, N., Alayoubi, R., Husson, E., Jacquard, C., Büchs, J., Sarazin, C., & Gosselin, I. (2018).
760 *Kluyveromyces marxianus*, an attractive yeast for ethanolic fermentation in the presence of imidazolium
761 ionic liquids. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 887-902.

762

763 Paul, T., Halder, S. K., Das, A., Ghosh, K., Mandal, A., Barman, P., Das Mohapatra, P. K., Pati, B. R.,
764 & Mondal, K. C. (2015). Production of chitin and bioactive materials from Black tiger shrimp (*Penaeus*
765 *monodon*) shell waste by the treatment of bacterial protease cocktail. *3 Biotech*, 5, 483-493.

766

767 Percot, A., Viton, C., & Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells.
768 *Biomacromolecules*, 4, 12-18.

769

770 Pereira, A. G. B., & Muniz, E. C., Hsieh, Y.-L. (2014). Chitosan-sheath and chitin-core nanowhiskers.
771 *Carbohydrate Polymers*, 107, 158-166.

772

773 Qin, Y., Lu, X., Sun, N., & Rogers, R. D. (2010). Dissolution or extraction of crustacean shells using
774 ionic liquids to obtain high molecular weight purified chitin and direct production of chitin films and
775 fibers. *Green Chemistry*, 12, 968-971.

776

777 Remsing, R. C., Swatloski, R. P., Rogers, R. D., & Moyna, G. (2006). Mechanism of cellulose
778 dissolution in the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium chloride: a ¹³C and ^{35/37}Cl NMR
779 relaxation study on model systems. *Chemical Communications*, 1271-1273.

780

781 Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*,
782 31(7), 603-632.

783

784 Rumpold, B. A., & Schlüter, O. K. (2013). Potential and challenges of insects as an innovative source
785 for food and feed production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 1-11.

786

787 Sajomsang, W., & Gonil, P. (2010). Preparation and characterization of α -chitin from cicada sloughs.
788 Materials Sciences and Engineering: C, 30, 357-363.
789
790 Setoguchi, T. Kato, T., Yamamoto, K. & Kadokawa, J.-I. (2012). Facile production of chitin from crab
791 shells using ionic liquid and citric acid. International Journal of Biological Macromolecules, 50, 861-
792 864.
793
794 Shen, X., Shamshina, J. L., Berton, P., Bandomir, J., Wang, H., Gurau, G. & Rogers, R. D. (2016).
795 Comparison of hydrogels prepared with ionic-liquid-isolated vs commercial chitin and cellulose. ACS
796 Sustainable Chemistry & Engineering, 4, 471-480.
797
798 Shamshina, J. L., Barber, P. S., Gurau, G., Griggs, C. S., & Rogers, R. D. (2016). Pulping of crustacean
799 waste using ionic liquids: to extract or not to extract. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 4,
800 6072-6081.
801
802 Silva, S. S., Duarte, A. R. C., Carvalho, A. P., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2011). Green processing of
803 porous chitin structures for biomedical applications combining ionic liquids and supercritical fluid
804 technology. Acta Biomaterialia, 7, 1166-1172.
805
806 Silva, S. S., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2017). Ionic liquids in the processing and chemical modification
807 of chitin and chitosan for biomedical applications. Green Chemistry, 19, 1208-1220.
808
809 Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D., & Rogers, R. D. (2002). Dissolution of Cellulose with
810 Ionic Liquids. Journal of the American Chemical Society, 24, 4974-4975.
811
812 van Huis, A., van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P.
813 (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and agriculture organization of
814 the united nations, Rome.
815
816 van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. Annual Review of
817 Entomology, 58, 563-583.
818
819 van Osch, D. J. G. P., Kollau, L. J. B. M., van den Bruinhorst, A., Asikainen, S., Rocha, M. A. A., &
820 Kroon, M. C. (2017). Ionic liquids and deep eutectic solvents for lignocellulosic biomass fractionation.
821 Physical Chemistry Chemical Physics, 19, 2636-2665.
822

823 Vincent, J. F. V., & Wegst, U. G. K. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle.
824 *Arthropod Structure & Development*, 33, 187-199.
825
826 Wang, S.-L., Lin, H.-T., Liang, T.-W., Chen, Y.-J., Yen, Y.-H. & Guo, S.-P. (2008). Reclamation of
827 chitinous materials by bromelain for the preparation of antitumor and antifungal materials. *Bioresource*
828 *Technology*, 99, 4386-4393.
829
830 Wang, W.-T., Zhu, J., Wang, X.-L., Huang, Y., & Wang, Y.-Z. (2010). Dissolution behavior of chitin
831 in ionic liquids. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 49, 528-541.
832
833 Wu, Y., Sasaki, T., Irie, S., & Sakurai, K. (2008). Ionic liquid as useful media for dissolution,
834 derivatization, and nanomaterial processing of chitin. *Polymer*, 49, 2321-2327.
835
836 Xie, H., Zhang, S., & Li, S. (2006) Chitin and chitosan dissolved in ionic liquids as reversible sorbents
837 of CO₂. *Green Chemistry*, 8, 630-633.
838
839 Yoo, C. G., Pu, Y., & Ragauskas, A. J. (2017). Ionic liquids: Promising Green Solvents for
840 Lignocellulosic Biomass Utilization. *Current Opinion in Green Sustainable Chemistry*, 5, 5-11.
841
842 Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure,
843 properties and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174.
844
845 Zhang, Q., Hu, J., & Lee, D.-J. (2017). Pretreatment of biomass using ionic liquids: Research updates.
846 *Renewable Energy*, 111, 77-84.
847
848 FAO/WUR, 2012. Expert committee meeting: assessing the potential of insects as food and feed in
849 assuring food security. In: Vantomme, P., Mertens, E., van Huis, A., Klunder, H. (Eds.), Summary
850 Report, 23–25 January 2012, FAO, Rome.
851

Gael Huet,^a Caroline Hadad,^a Eric Husson,^b Sylvain Laclef,^a Virginie Lambertyn,^b Monica Araya Farias,^b Arash Jamali,^c Matthieu Courty,^d Ranim Alayoubi,^b Isabelle Gosselin,^b Catherine Sarazin^b and Albert Nguyen Van Nhien^{*a}

*Corresponding author: albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

Addresses

- a. Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - UFR des Sciences – 80039 Amiens cedex, France.
- b. Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire, UMR CNRS 7025, Université de Picardie Jules Verne - UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.
- c. Plateforme de Microscopie Electronique - Université de Picardie Jules Verne, HUB de l'Energie - 33 rue Saint-Leu, 80039 Amiens Cedex, France.
- d. Laboratoire de Réactivité et Chimie des Solides, UMR CNRS 7314, Université de Picardie Jules Verne - UFR des Sciences, 33 rue Saint-Leu 80039 Amiens cedex, France.

Table of contents

1. FTIR spectra
 2. Solid-state CP-MAS ¹³C NMR
 3. X-ray diffractograms
 4. SEM images
 5. Chitin purity
 6. Thermogravimetric analysis
 7. HPLC chromatograms
 8. *N*-Acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose characterizations
 9. Fermentescibility of enzymatic hydrolysate
-

1. FTIR spectra

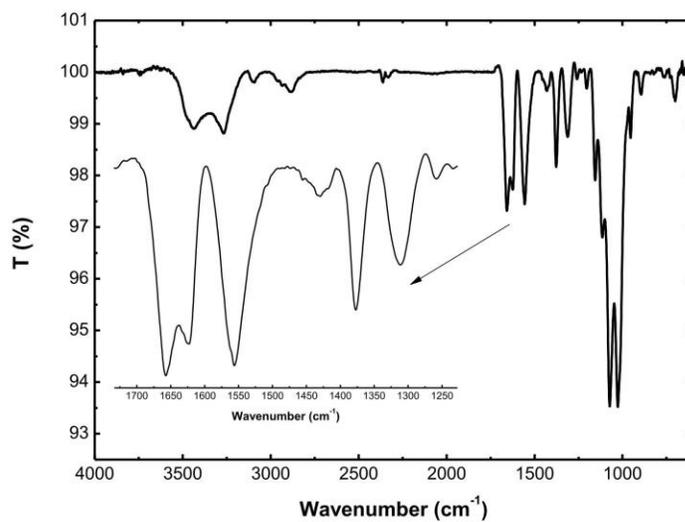


Figure S1. IR spectra of purified commercially available chitin.

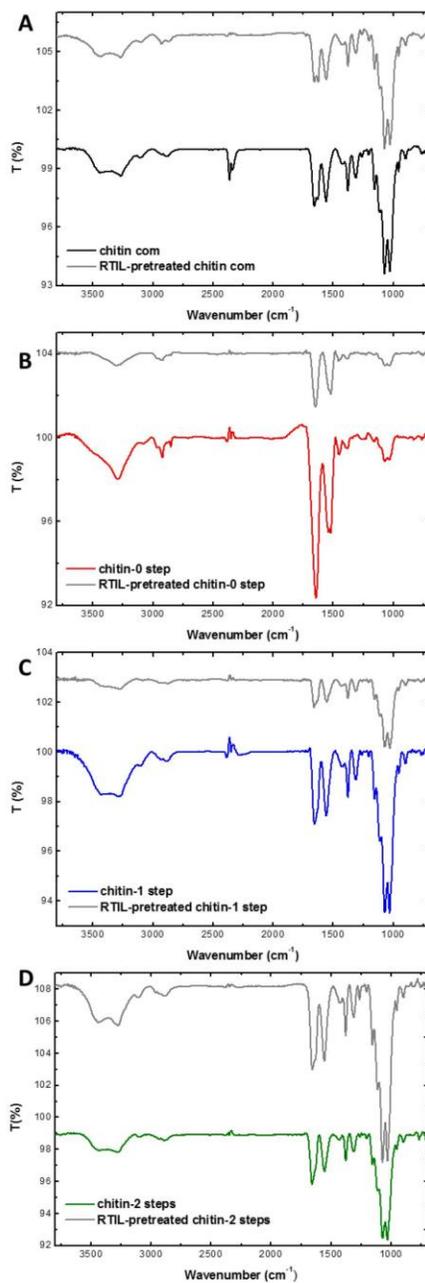


Figure S2. IR spectra of extracted commercial chitin (A) and extracted chitins from *Bombyx eri* larva source(B-D), before and after [C₂mim][OAc]-pretreatment for 40 minutes at 110°C.

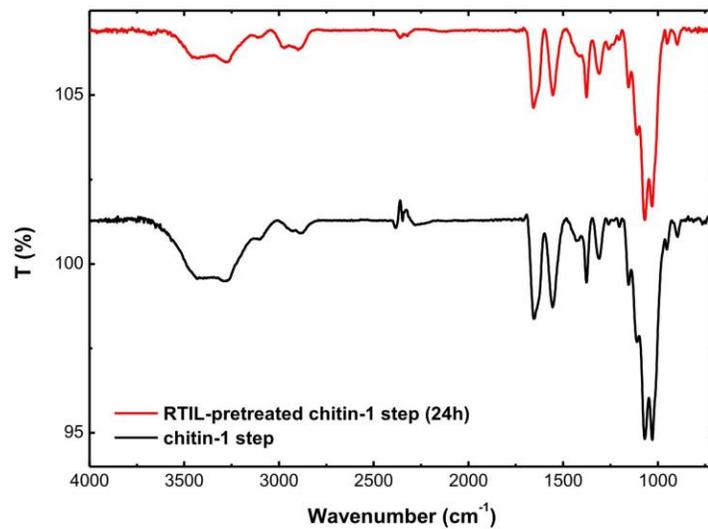


Figure S3. IR spectra of chitin-1 step and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-1 step for 24h at 110°C.

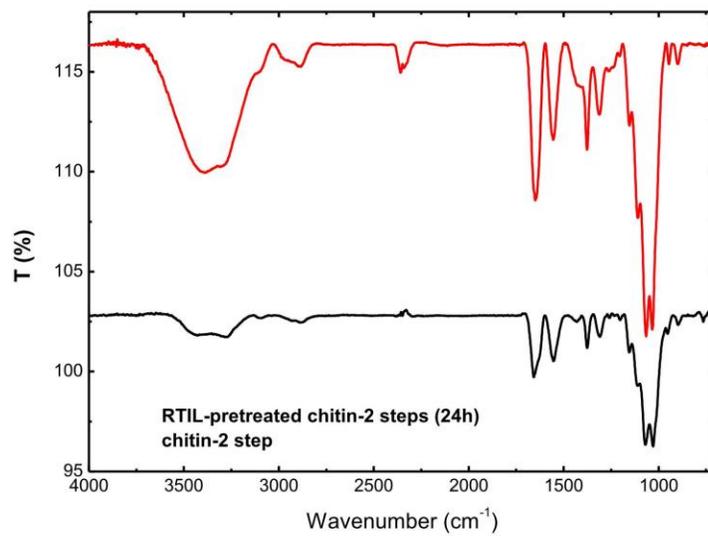


Figure S4. IR spectra of chitin-2 steps and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps for 24h at 110°C.

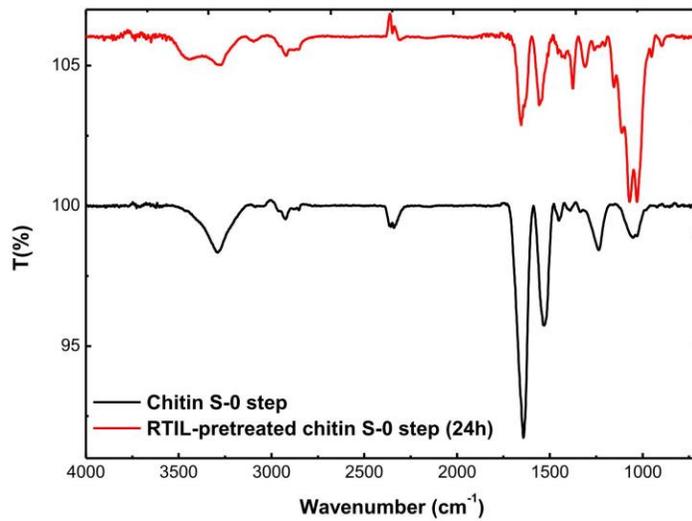


Figure S5. IR spectra of Chitin S-0 step and $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ -pretreated chitin S-0 step for 24h at 110°C .

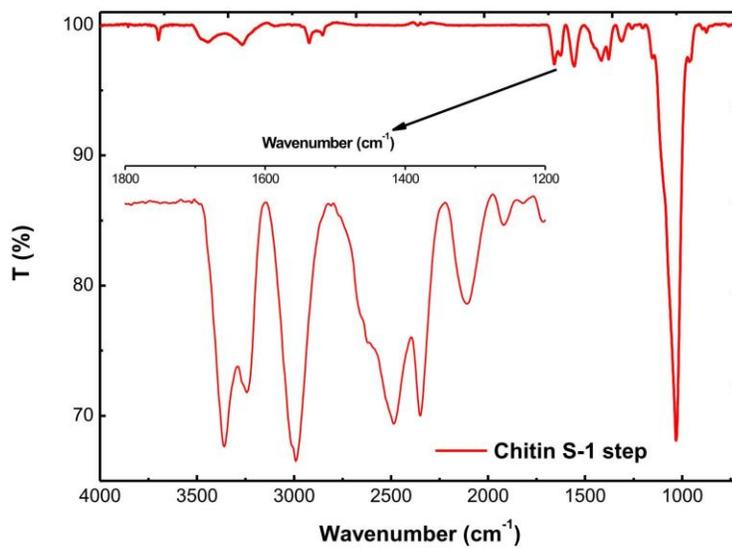


Figure S6. IR spectra of chitin S-1 step.

2. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR

Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra were obtained at 125 MHz using a 500 MHz Bruker Avance spectrometer. The spinning rate was 5 kHz with 2 ms contact times and 5 s delay between scans (2048 scans). The degree of acetylation (DA) is calculated by measuring the integral of the carbonyl or methyl group divided by the integral of all the carbon atoms in the backbone. The chemical shifts were externally referred by setting the carbonyl resonance of glycine to 176.03 ppm.¹

CP-MAS ^{13}C NMR (25 °C, 125 MHz): δ_{C} 173.8 (C=O), 104.1 (C1), 83.0 (C4), 75.7 (C5), 73.3 (C3), 60.8 (C6), 55.2 (C2), 22.8 (CH₃).

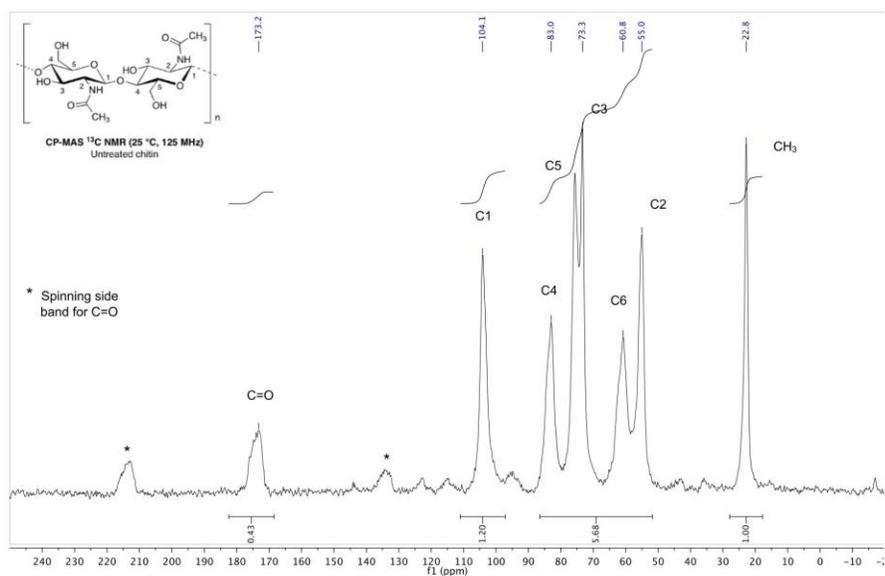


Figure S7. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of untreated chitin com (DA = 87%).

- ¹ a) Kasaai, M. (2009). Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1667.
b) Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174. c) L. Heux, J. Brugnerotto, J. Desbrière, M. F. Versali, M. Rinaudo, *Biomacromolecules*, **2000**, 1, 746.
d) Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvao, M. R. & Rocha, J. (2002). Determination of the degree of acetylation of chitin materials by C-13 CP/MAS NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 359-363.

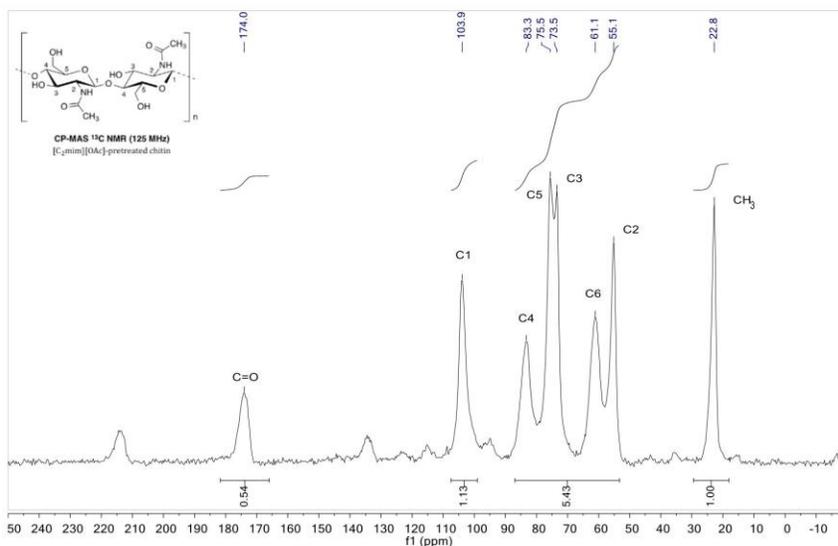


Figure S8. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin com (DA = 91%).

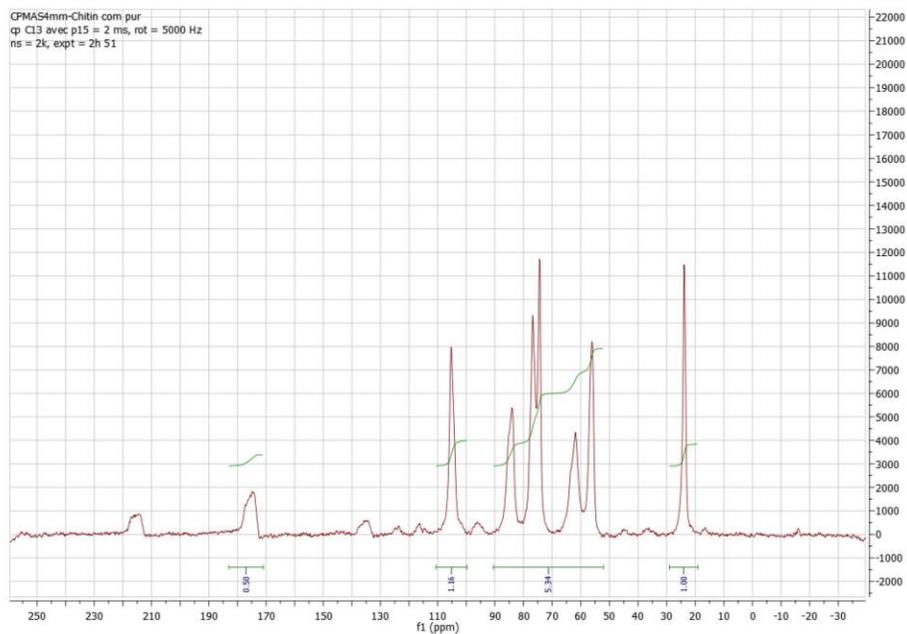


Figure S9. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of purified commercially available chitin com (DA = 92%).

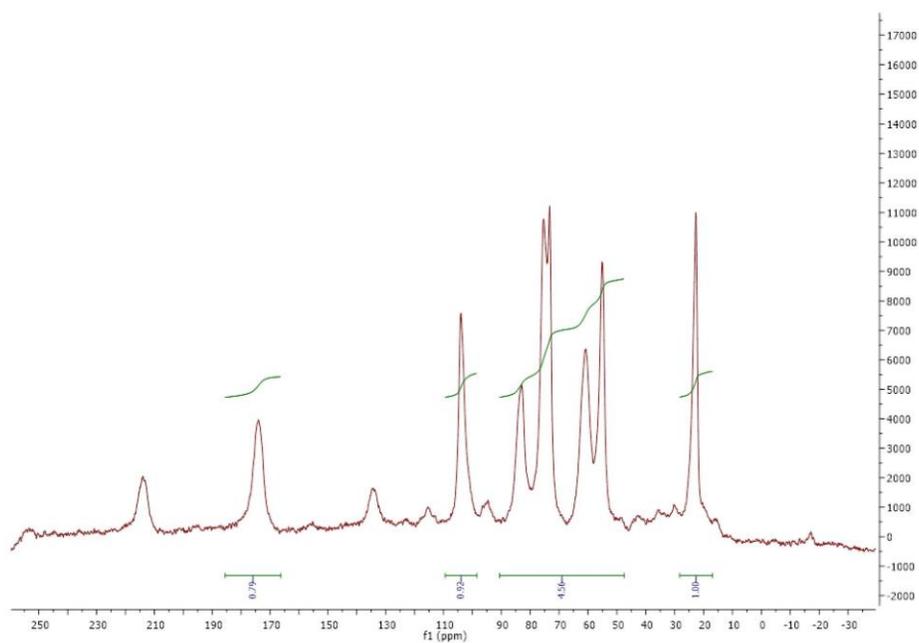


Figure S10. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of chitin-0 step (DA not determined).

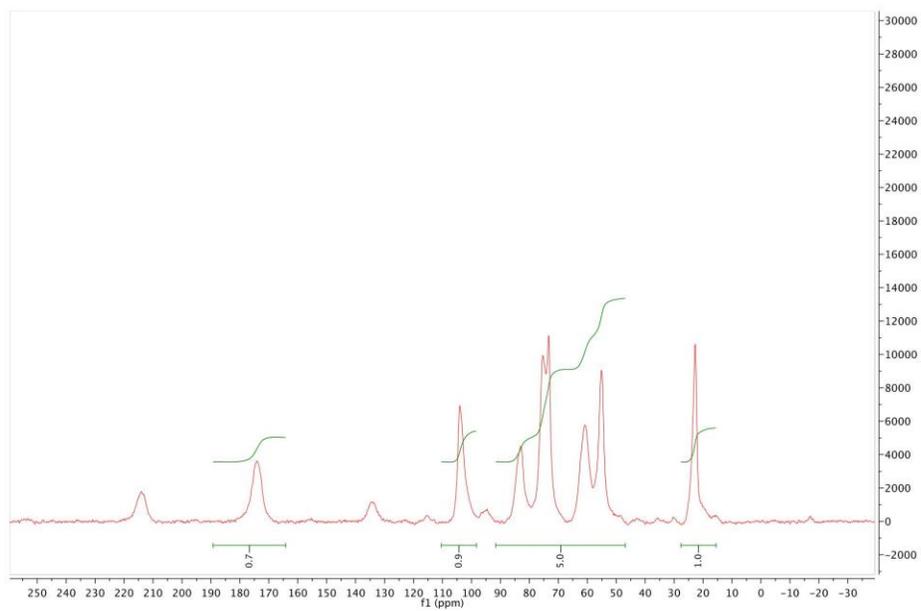


Figure S11. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ -pretreated chitin-0 step (DA not determined).

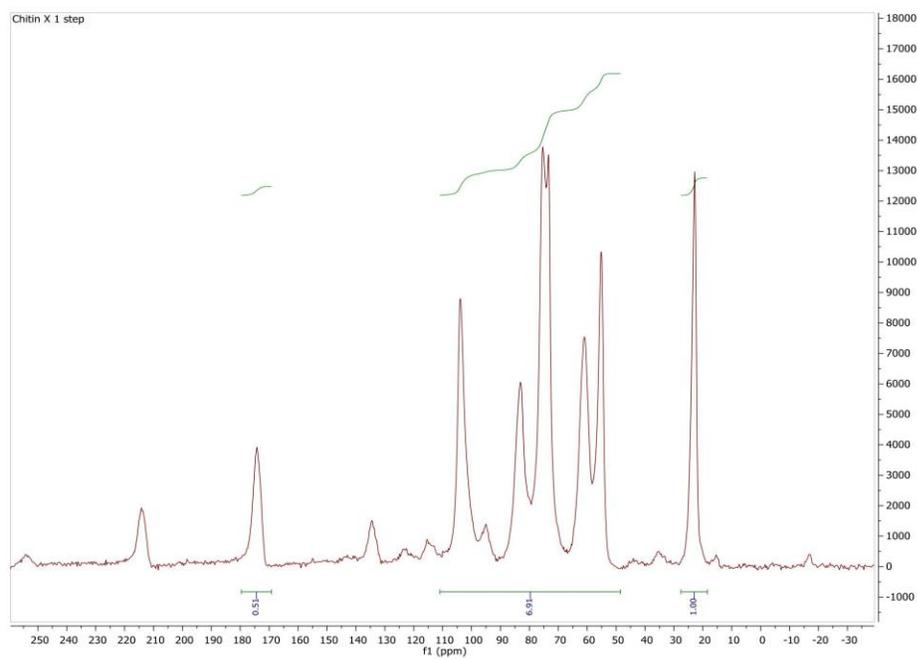


Figure S12. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of chitin-1 step (DA not determined).

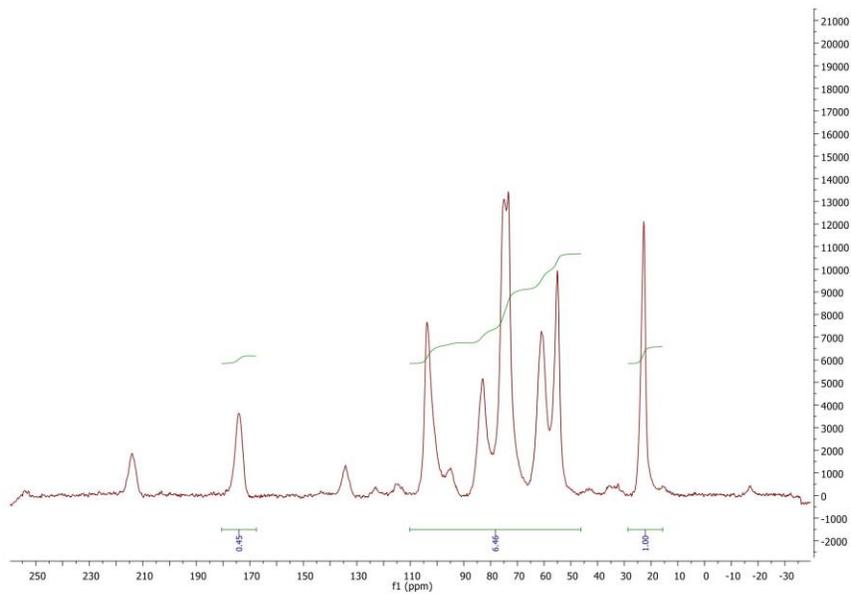


Figure S13. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ -pretreated chitin-1 step (DA = 93%).

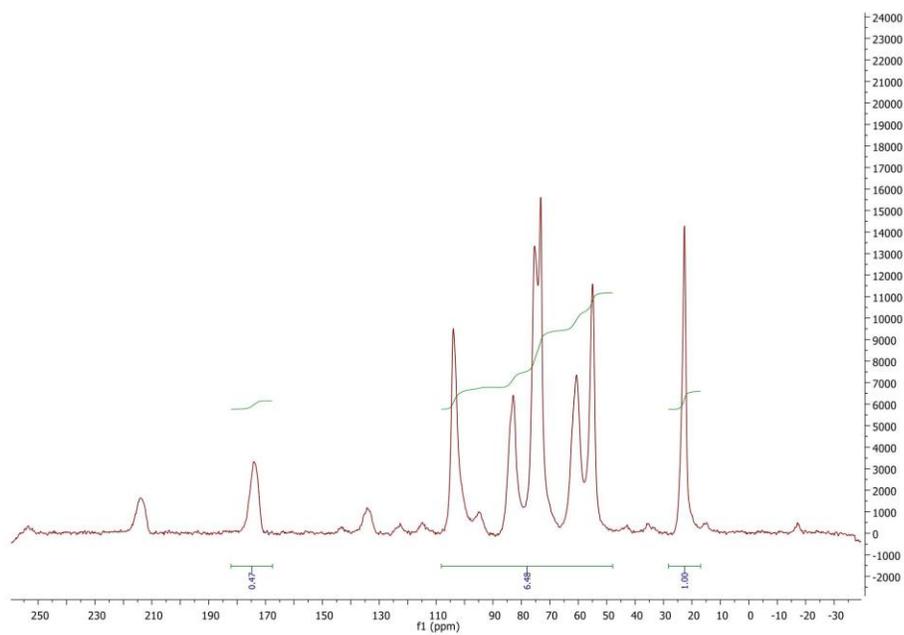


Figure S14. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of chitin-2 steps (DA = 93%).

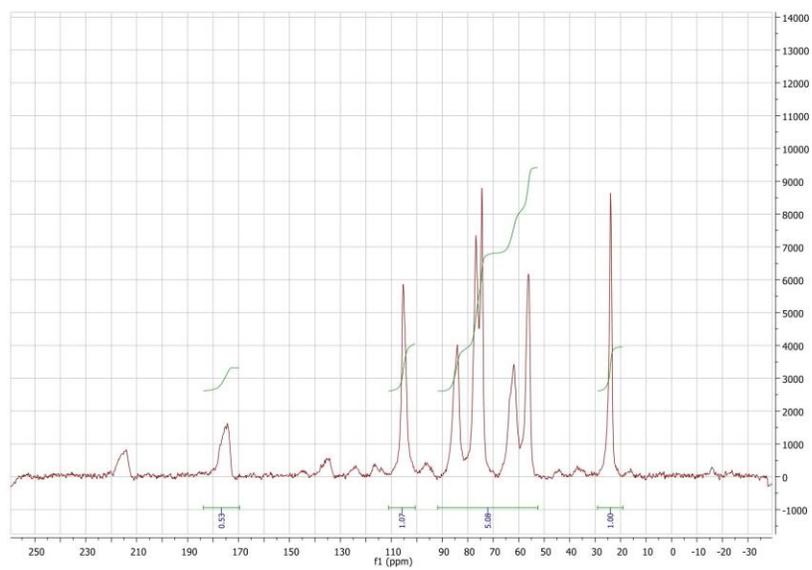


Figure S15. Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectrum of $[\text{C}_2\text{mim}][\text{OAc}]$ -pretreated chitin-2 steps (DA = 95%).

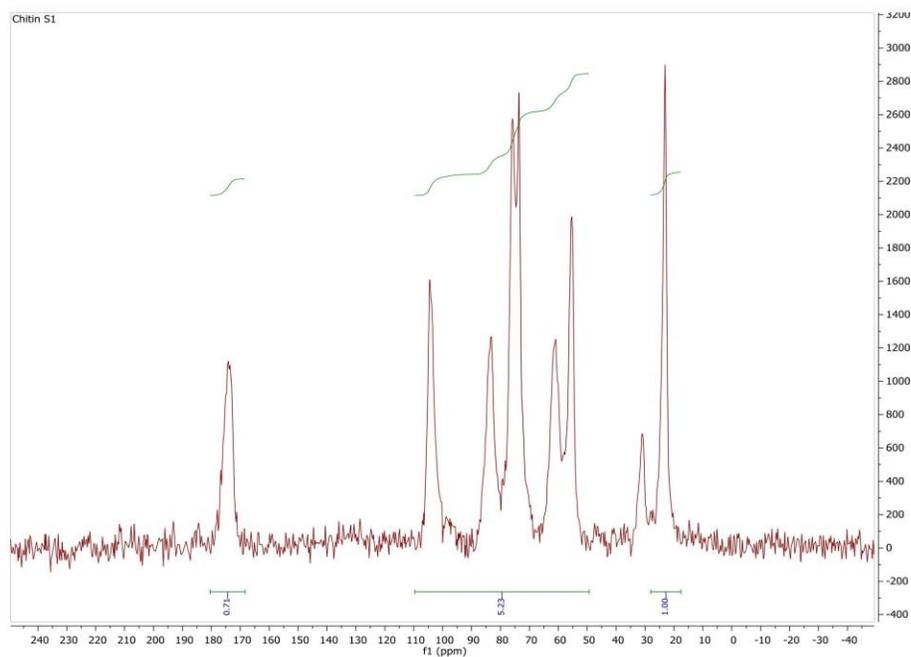


Figure S16. Solid-state CP-MAS ¹³C NMR spectrum of Chitin S-1 step (DA = 100 %).

3. X-ray diffractograms DRX of commercial and extracted chitins

The crystallinity indexes (CrI) of the commercial and extracted chitins were calculated on the basis of X-ray diffractograms using the amorphous subtraction region method and the following formula¹:

Formula 1: %Crystallinity = (total area of crystalline peaks) x 100 / (total area of all peaks)

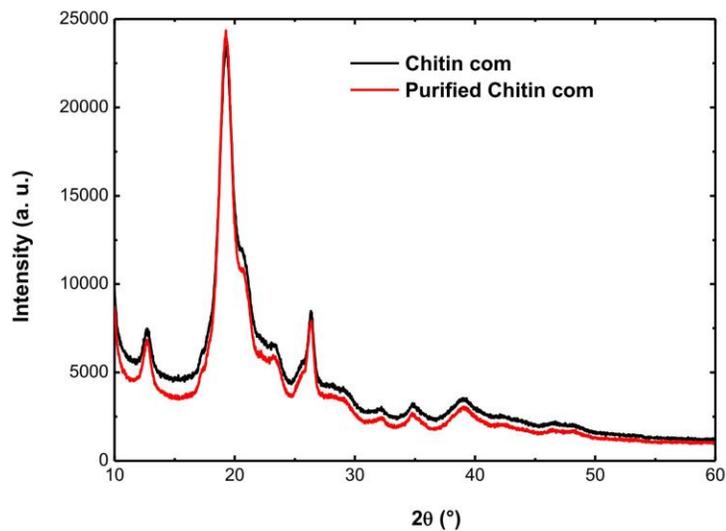


Figure S17. XRD of commercially available chitin and purified commercially available chitin.

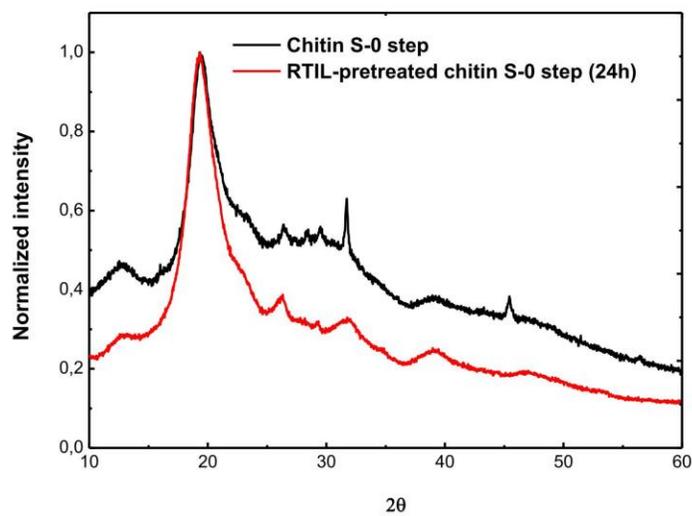


Figure S18. XRD of chitin S-0 step and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin S-0 step for 24h at 110°C.

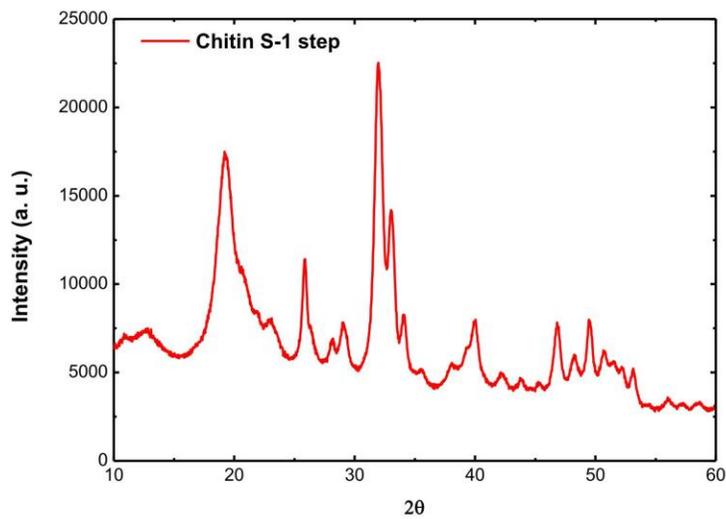


Figure S19. XRD of chitin S-1 step.

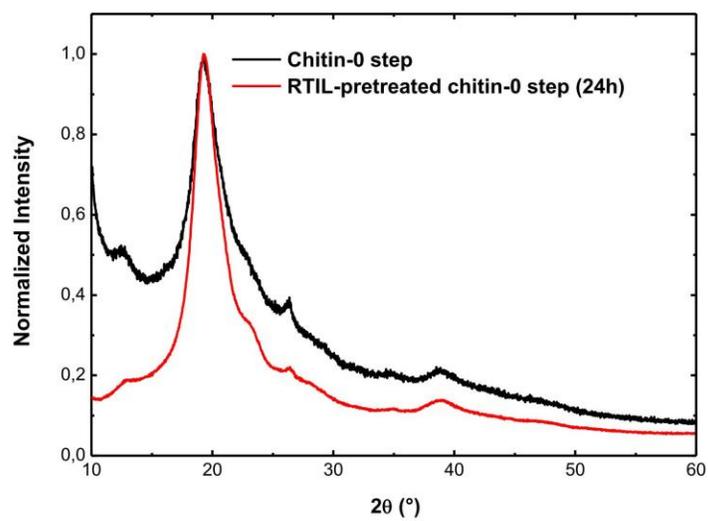


Figure S20. XRD of chitin-0 step and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-0 step for 24h at 110°C.

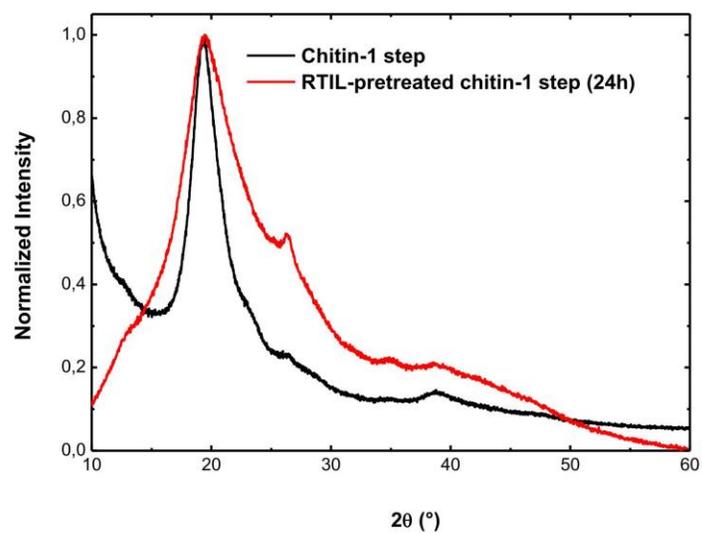


Figure S21. XRD of chitin-1 step and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-1 step for 24h at 110°C.

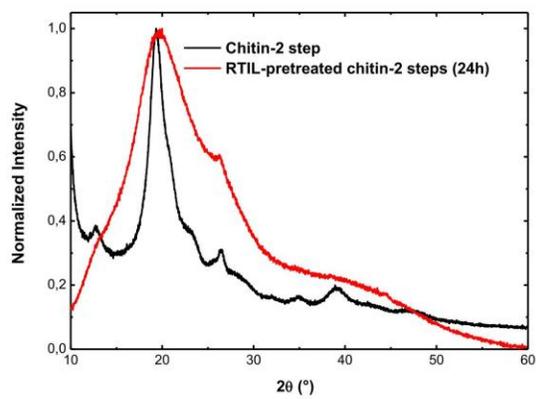


Figure S22. XRD of chitin-2 steps and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps for 24h at 110°C.

4. SEM images of extracted chitins

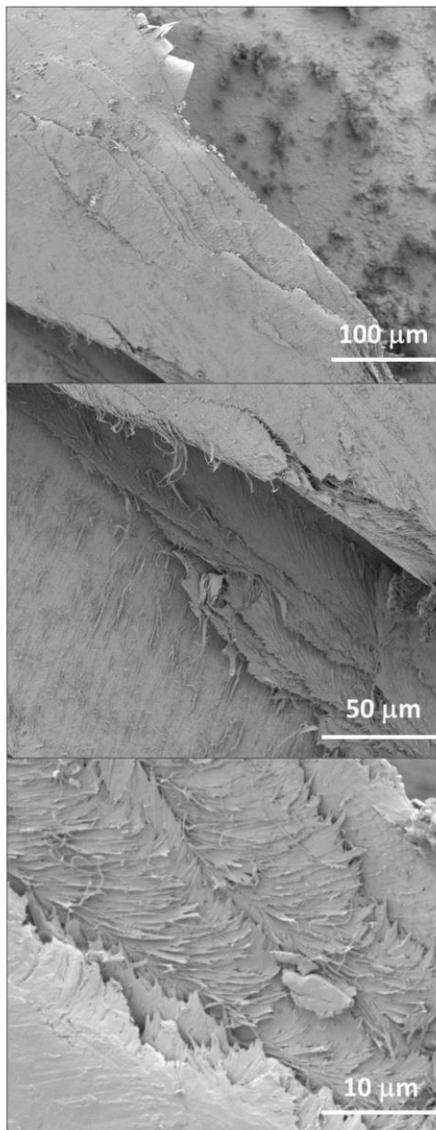


Figure S23. SEM images of chitin S-0 step.

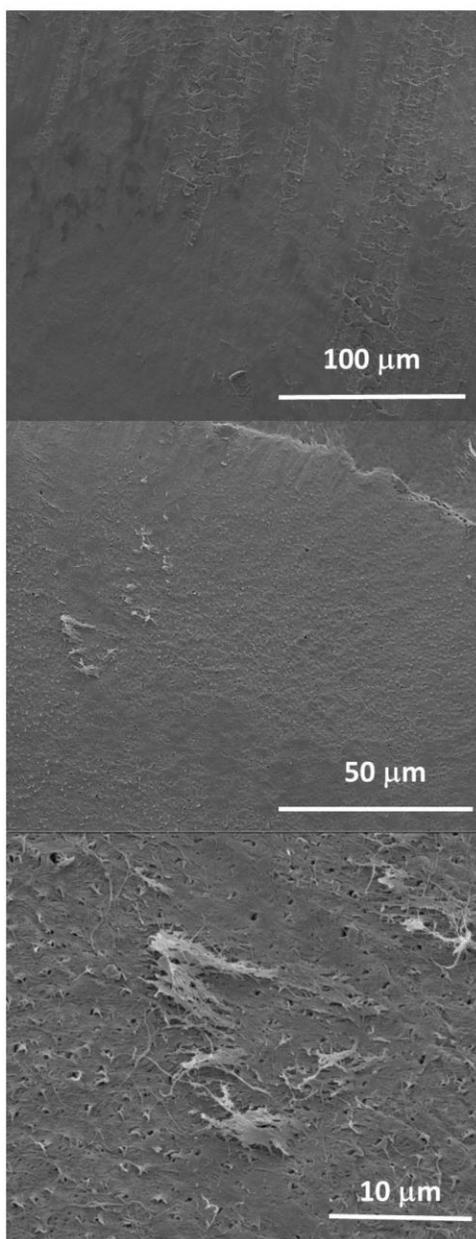


Figure S24. SEM images of chitin S-1 step.

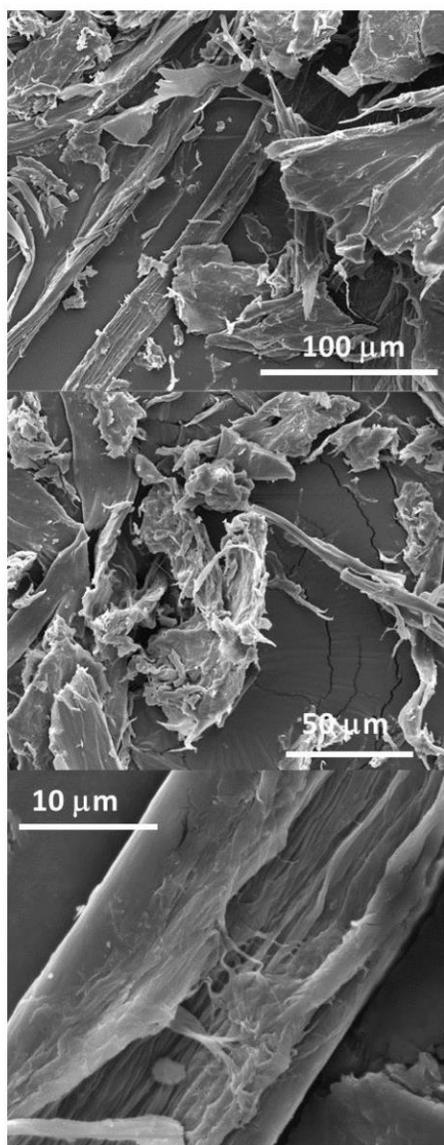


Figure S25. SEM images of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin S-0 step for 24h at 110°C.

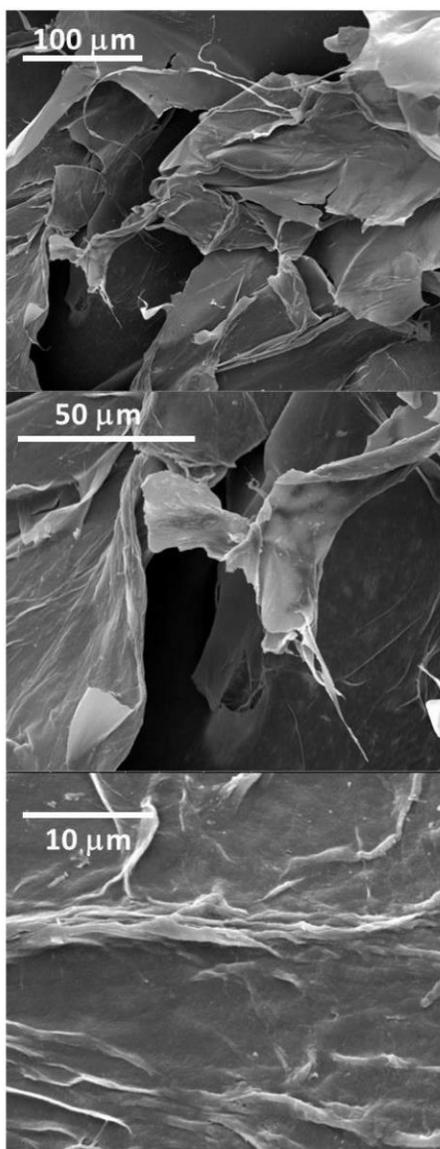


Figure S26. SEM images of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-0 step for 24h at 110°C.

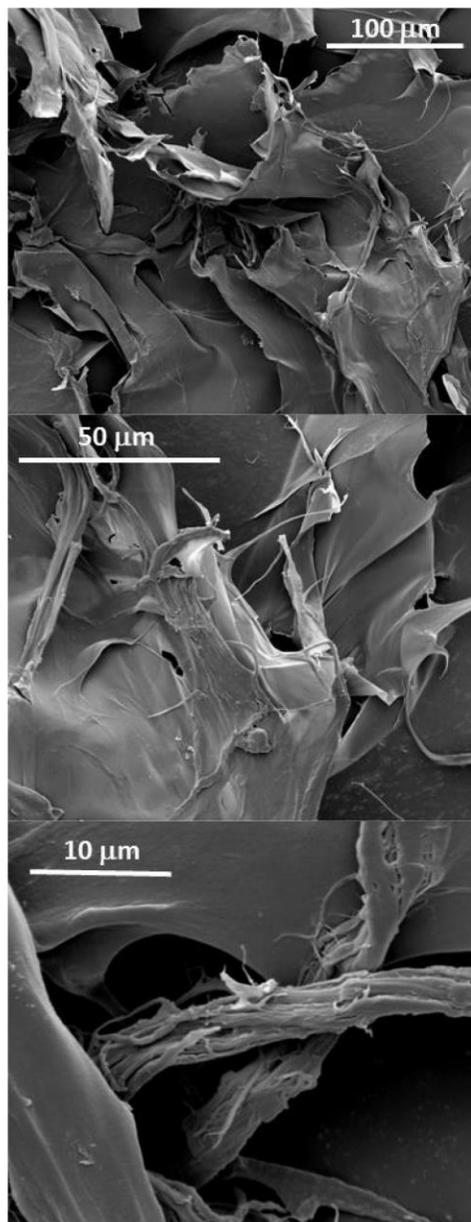


Figure 27. SEM images of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-1 step for 24h at 110°C.

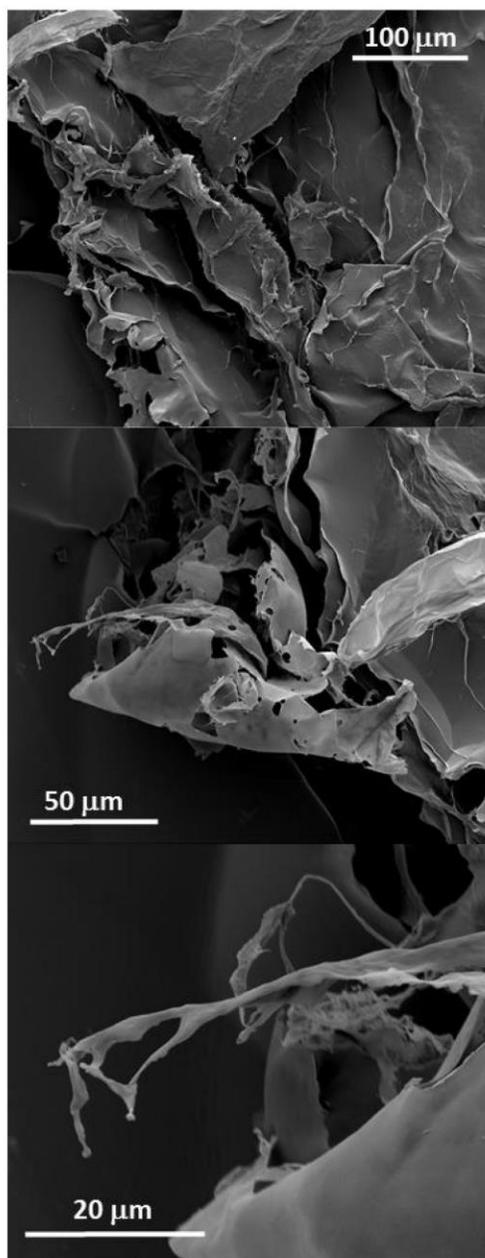


Figure S28. SEM images of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps for 24h at 110°C.

5. Chitin purity

Nitrogen content using Kjeldahl method²

This method is the official worldwide standard for the determination of nitrogen content in a wide range of samples, by converting nitrogen compounds (proteins, amines, organic compounds) into ammonia compounds. Nitrogen contents of the chitin samples before and after [C₂mim][OAc]-pretreatment were determined using the Kjeldahl method adapted from the literature. In brief, 100 mg of chitin was dissolved in 10mL of concentrated sulfuric acid in presence of Kjeldahl catalyst (9% CuSO₄·5H₂O). After heating at high temperature (>350 °C) until the solution became transparent without white smoke, the solution was cooled at room temperature. 70 mL of distilled water and 70mL of a solution of NaOH 40% (w/w) were added and distilled. The distillate was trapped in an 30 mL of Tashiro indicator solution and finally titrated with a solution of HCl 0.1 M until the solution became violet.

-**Chitin and protein contents**³ were obtained using the methodology described by Diaz-Rojas et al. and the following formulae:

$$\text{Chitin content } Q = \frac{(Nt \cdot Cp + K - 100) \cdot Cq}{Cp - Cq}$$

$$\text{Protein content } P = \frac{(Nt \cdot Cq + K - 100) \cdot Cp}{Cq - Cp}$$

-Non-nitrogen content **K = I + L + W**

Where:

I = inorganic matter, determined by TGA under air atmosphere at 800°C.

L = lipid content, obtained using the Soxhlet extraction method.

W = water content, determined by TGA under nitrogen atmosphere at around 100°C.

Cp and **Cq** are conversion coefficients that relate the mass fraction of nitrogen with protein and chitin, respectively. The usual value for **Cp** in proteins from marine products is 6.25.

$$Cq = \frac{(GlcNAc - GlcN) \cdot FA + GlcN}{N}$$

Cp = 6.25

Where:

N = molecular mass of nitrogen (14.007).

FA = is the molar fraction of acetylated monomers in the chitin/ chitosan polymer chain.

$$GlcNAc = \frac{221.21 \cdot n - 18.02 \cdot (n-1)}{n}$$

$$GlcN = \frac{179.1724 \cdot n - 18.02 \cdot (n-1)}{n}$$

GlcNAc is the theoretical molecular mass of a *N*-acetyl glucosamine monomer repeated 'n' times and linked by Beta,1-4, glycosidic bonds in a chitin/ chitosan polymer chain. The value of GlcNAc varies from 221.21 to 203.19 as 'n' tends to infinity (i.e., as a mol of water is lost per established glycosidic linkage).

GlcN is the theoretical molecular mass of a glucosamine monomer repeated 'n' times and linked by beta 1-4, glycosidic bonds in a chitin/chitosan polymer chain. The value of GlcN varies from 179.17 to 161.15 as 'n' tends to infinity.

² Kirk, P. L. (1950). Kjeldahl Method for Total Nitrogen. *Analytical Chemistry*, 22, 354-358.

³ Díaz-Rojas, E. I., Argüelles-Monal, W. M., Higuera-Ciapara, I., Hernández, J., Lizardi-Mendoza, J., & Goycoolea, F. M. (2006). Determination of chitin and protein contents during the isolation of chitin from shrimp waste. *Macromolecular Bioscience*, 6, 340-347.

Table S1. Characterization data of the commercially available and extracted chitins from *Bombyx eri* larva and shrimp shells sources before and after RTIL-pretreatment.

Chitin	Nitrogen content ^c (N, %)	Lipids ^d (%)	H ₂ O ^e (%)	Ash content ^e (%)	Protein ^f (P, %)	Chitin purity ^g (Q, %)
Chitin-0 step ^a	10.3	0	7.02	1.90	45.8	45.0
RTIL-pretreated Chitin-0 step (24h)	7.5	0	8.37	0.57	15.8	75.2
Chitin-1 step ^a	6.03	0	9.16	0.75	0.4	89.7
RTIL-pretreated Chitin-1 step (24h)	5.85	0	12.44	0	0	87.6
Chitin-2 steps ^a	6.03	0	7.92	0.32	0	93.3
Chitin S-0 step ^b	9.23	0	9.23	21.73	49.7	19.3
RTIL-pretreated Chitin S-0 step (24h)	5.79	0	10.98	14.87	9.5	64.6
Chitin S-1 step ^b	2.91	0	6.53	30.31	ND	<65% ^g
Chitin com	6.26	0	3.84	0	0	98.9

(a) Extracted chitin from *Bombyx eri* Larva; (b) Extracted chitin from shrimp shells; (c) evaluated using the Kjeldahl method; (d) determined using the Soxhlet extraction method; (e) determined using thermogravimetric analysis under nitrogen atmosphere from 50 to 800°C following by an isotherm at 800°C under air for 30 minutes; (f) using the methodology described by Diaz-Rojas et al.; (g) yield over-evaluated. ND: Not Determined.

6. Thermogravimetric analysis

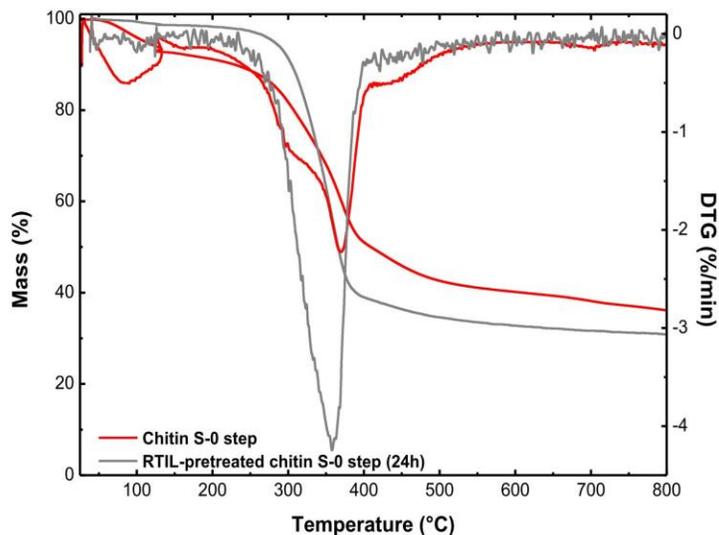


Figure S29. Thermogravimetric and differential thermal analysis of chitin S-0 step and [C₂mim][OAc]-pretreated chitin S-0 step (24h at 110°C) under argon atmosphere.

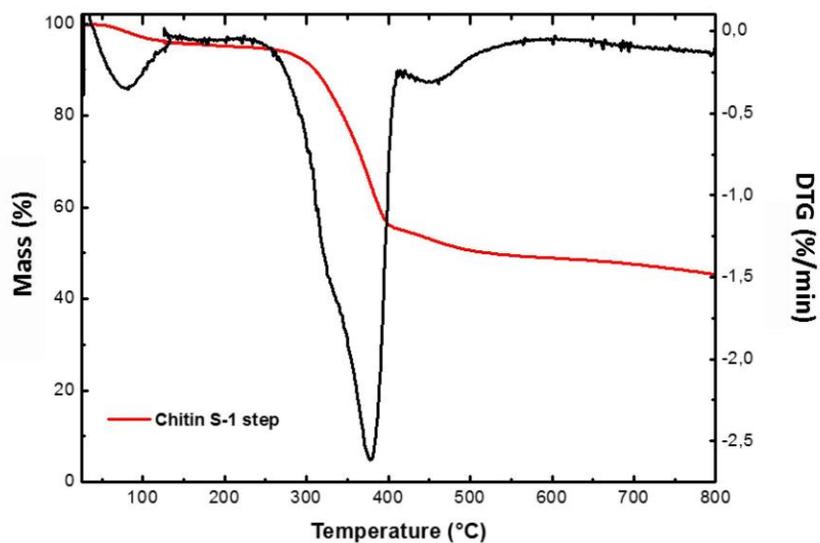


Figure S30. Thermogravimetric and differential thermal analysis of chitin S-1 step under argon atmosphere.

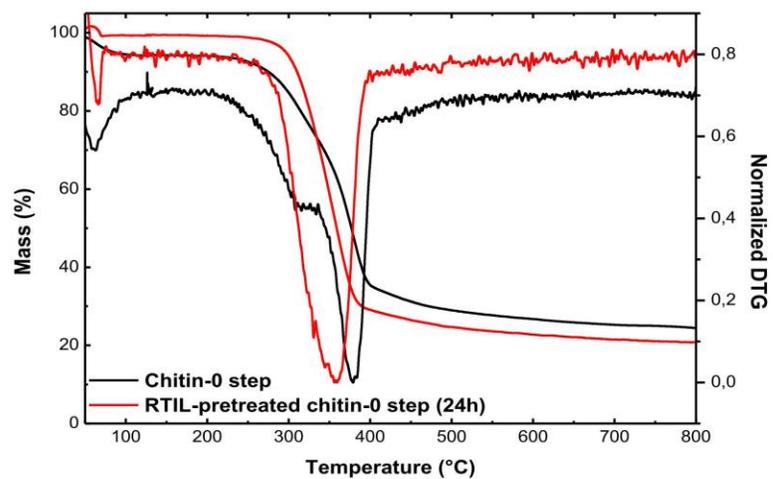


Figure S31. Thermogravimetric and differential thermal analysis of chitin-0 step and $[C_2mim][OAc]$ -pretreated chitin-0 step (24h at 110°C) under argon atmosphere.

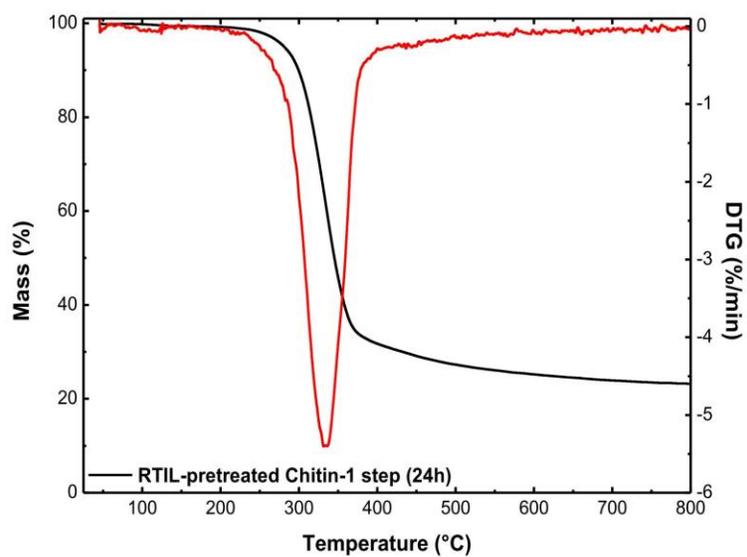


Figure S32. Thermogravimetric and differential thermal analysis of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-1 step (24h at 110°C) under argon atmosphere.

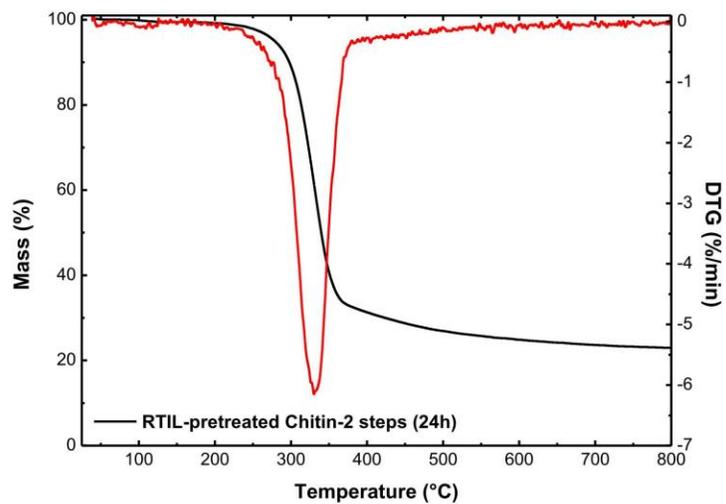
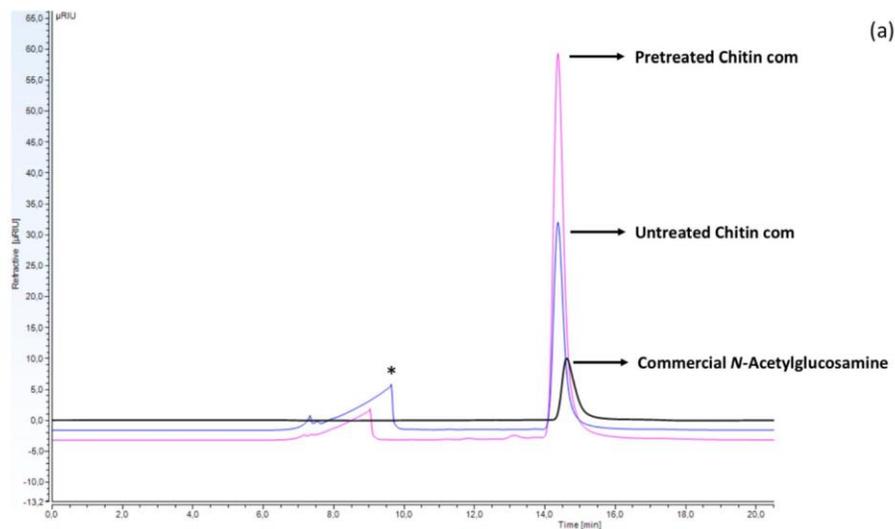
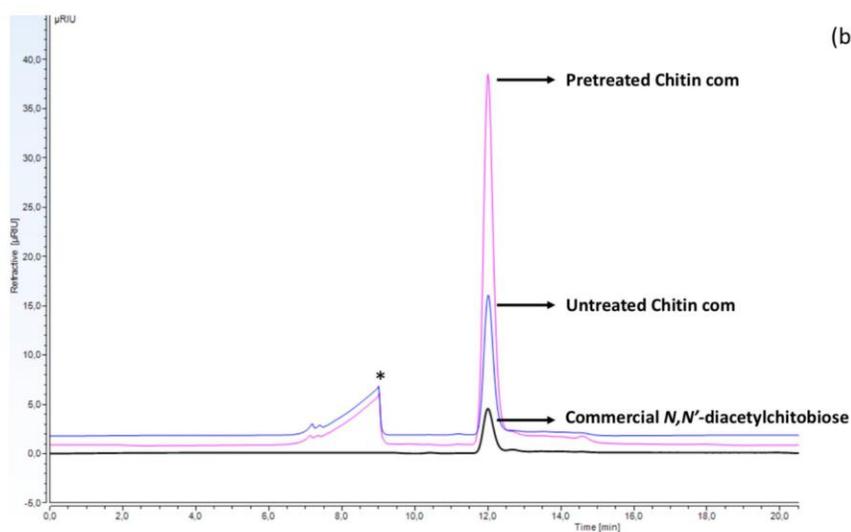


Figure S33. Thermogravimetric and differential thermal analysis of [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps (24h at 110°C) under argon atmosphere.

7. HPLC chromatograms



(a)



(b)

Figure S34. HPLC chromatograms of : (a) standard *N*-acetylglucosamine (black line), supernatant of hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis of untreated chitin com (blue line) or [C₂mim][OAc]-pretreated chitin com (pink line) in aqueous buffer. The reactions were catalysed by the chitinase from *S. griseus* for 24h then supplemented by the chitinase from *T. viride* for 12h. (b) standard *N,N'*-diacetylchitobiose (black line) and supernatant hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis of untreated chitin com (blue line) or [C₂mim][OAc]-pretreated chitin com (pink line) catalysed by the chitinase from *S. griseus* for 24h in aqueous buffer. *identified as enzymes preparation and aqueous buffer.

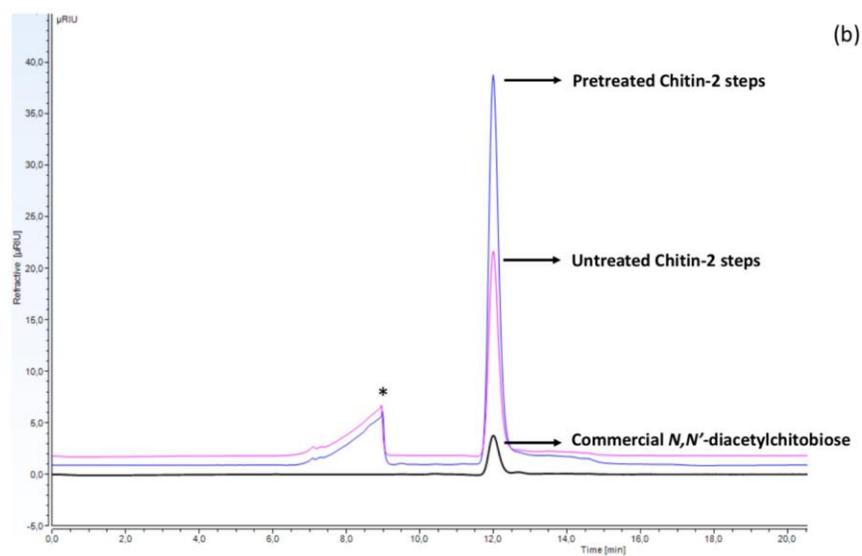
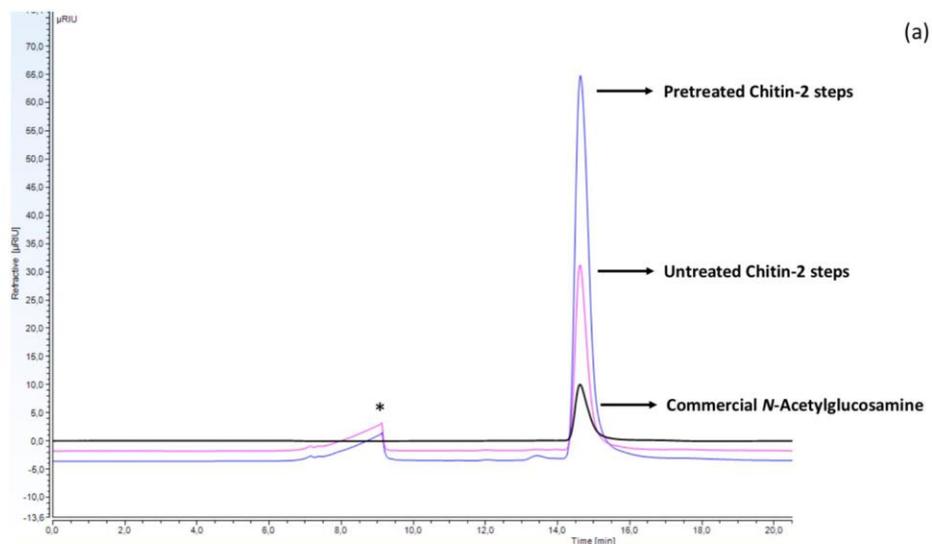


Figure S35. HPLC chromatograms of : (a) standard *N*-acetylglucosamine (black line), supernatant of hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis of untreated chitin-2 steps (pink line) or [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps (blue line) in aqueous buffer. The reactions were catalysed by the chitinase from *S. griseus* for 24h then supplemented by the chitinase from *T. viride* for 12h. (b) standard *N,N'*-diacetylchitobiose (black line) and supernatant hydrolysate obtained by enzymatic hydrolysis of untreated chitin-2 steps (pink line) or [C₂mim][OAc]-pretreated chitin-2 steps (blue line) catalysed by the chitinase from *S. griseus* for 24h in aqueous buffer. *identified as enzymes preparation and aqueous buffer.

8. *N*-Acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose characterizations

^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were respectively recorded at 400 and 75 MHz using a Bruker DRX-400 spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million relative to a residual solvent peak. For D_2O , MeOH was used as standard for ^{13}C (^1H : $\delta=4.79$ ppm, ^{13}C : $\delta=49.50$ ppm). Peak multiplicity is reported as: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), quintet (quint), sextuplet (s^x), septuplet (s^p), multiplet (m), doublet of doublet (dd), doublet of doublet of doublet (ddd), doublet of triplet (dt) and broad (br). High-resolution mass spectra HRMS were obtained by electrospray ionization (ESI) using a Micromass-Waters Q-TOF Ultima Global instrument.

N-Acetylglucosamine (DP1):

^1H NMR (D_2O , 25 °C, 400 MHz): Mixture 1.2:1 of two diastereoisomers : δ_H 5.21 (d, $J = 3.5$ Hz, 1.2H, H1 α), 4.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H1 β), 3.93-3.84 (m, 4.4H, H6), 3.82-3.76 (m, 2.2H, H2), 3.55-3.46 (m, 4.2H, H3, H4), 2.06 (s, 6.6H, Ac).

^{13}C NMR (D_2O , 25 °C, 100 MHz): Mixture 1.2:1 of two diastereoisomers δ_C 170.6, 174.48 (Ac), 94.89, 90.80 (C1), 75.92, 73.87 (C3), 71.5, 70.64 (C4), 70.03, 69.80 (C5), 60.70, 60.54 (C6), 56.66, 54.05 (C2), 22.13, 21.86 (CH_3).

The spectrum is matching with other spectra found in literature.⁴

N,N'-diacetylchitobiose (DP2):

^1H NMR (D_2O , 25 °C, 400 MHz): Mixture 1:0.7 of two diastereoisomers δ_H 5.11 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H1 α), 4.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H1 β), 4.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H1'), 3.86-3.36 (m, 17H, H2, H2', H3, H3', H4, H4', H5, H5', H6, H6'), 1.99 (s, 3H, Ac), 1.96 (s, 2.1H, Ac).

^{13}C NMR (D_2O , 25 °C, 100 MHz): δ_C 174.7, 174.6, 174.4 (CO), 101.4 (C1'), 94.8, 90.4 (C1), 79.8 (C4), 79.3 (C3'), 74.5 (C3), 73.4 (C4), 72.5 (C3), 69.9 (C5) 69.7 (C5'), 69.3 (C5), 60.5 (C6'), 60.1, 60.0 (C6), 56.0 (C2), 55.57 (C2'), 53.6 (C2), 22.1, 21.9 (CH_3).

HRMS (ESI⁺) : Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{Na}^+$ [$\text{M} + \text{Na}$]⁺: 447.1591; Found: 447.1585.

⁴ Liu, F.-C., Su, C.-R., Wu, T.-Y., Su, S.-G., Yang, H.-L., Lin, J. H.-Y. & Wu, T.-S. (2011). Efficient ^1H -NMR Quantitation and Investigation of *N*-Acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and *N,N'*-Diacetylchitobiose (GlcNAc)₂ from Chitin. International Journal of Molecular Sciences, 12, 5828-5843.

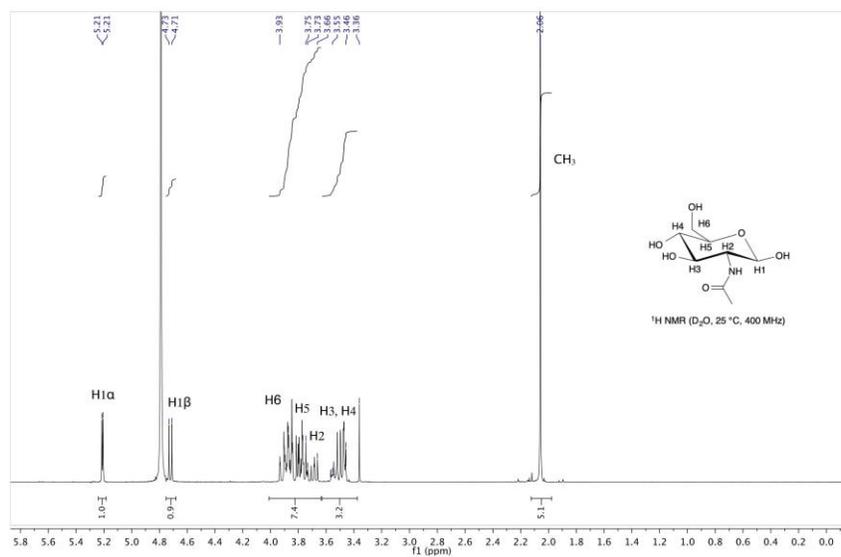


Figure S36. ^1H NMR spectrum of *N*-Acetylglucosamine in D_2O .

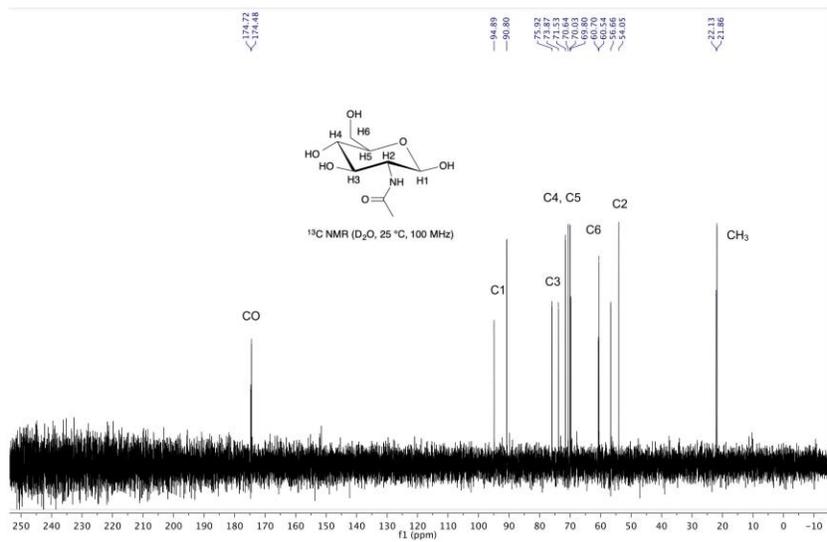


Figure S37. ¹³C NMR spectrum of *N*-Acetylglucosamine in D₂O.

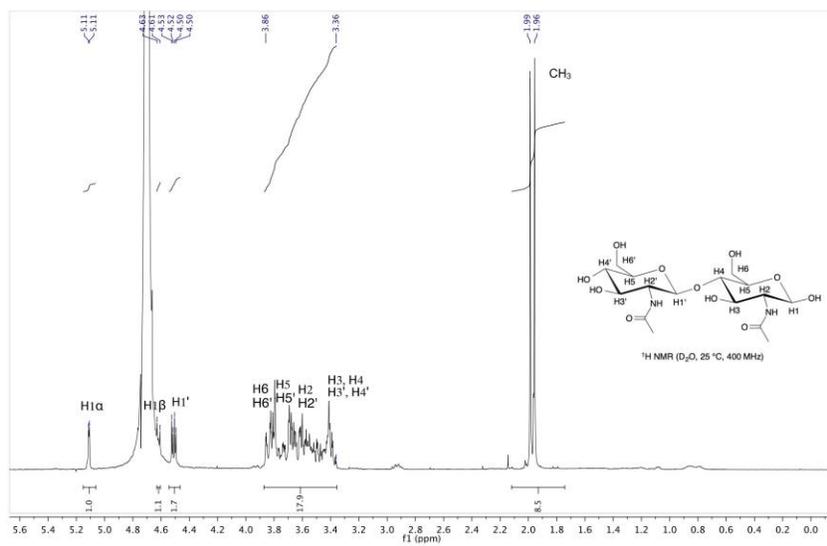


Figure S38. ^1H NMR spectrum of N,N' -diacetylchitobiose in D_2O .

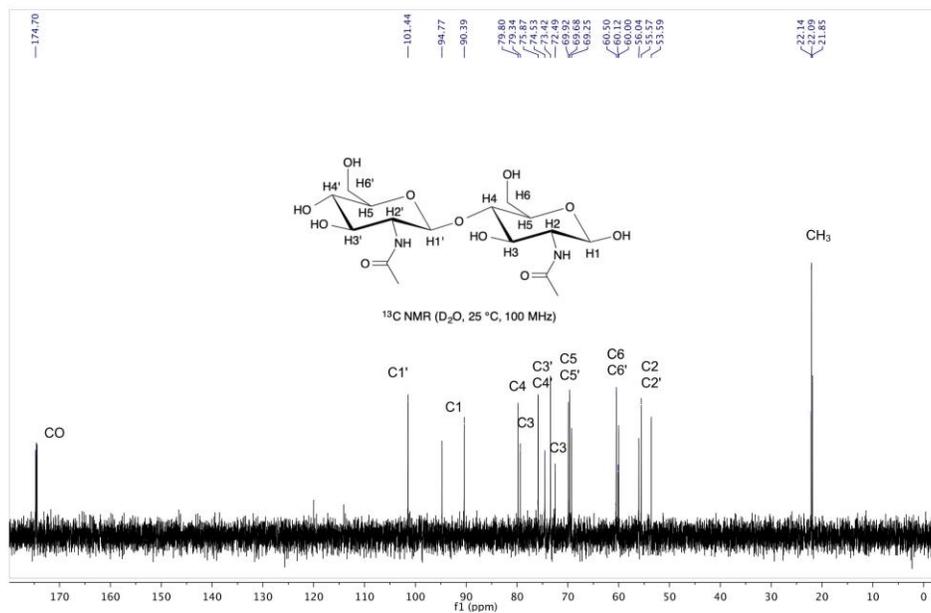


Figure S39. ¹³C NMR spectrum of *N,N'*-diacetylchitobiose in D₂O.

9. Fermentescibility of enzymatic hydrolysates

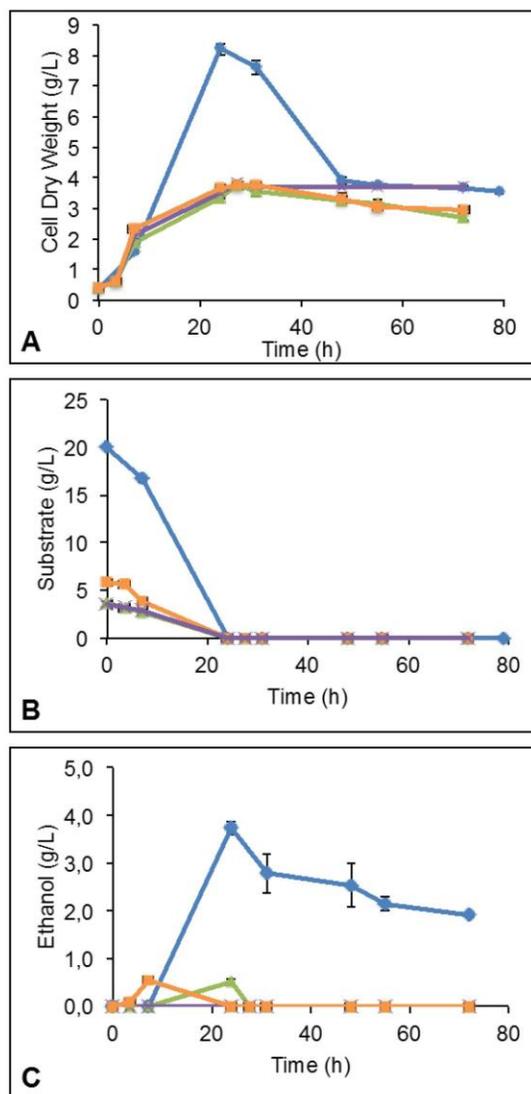


Figure S40. Growth expressed as Cell Dry Weight in g/L (A), substrate consumption in g/L (B) and ethanol production in g/L (C) of *S. stipitis* CLIB 187 strain on various substrates: commercial GlcNAc (♦), enzymatic hydrolysate of chitin com with the chitinase from *S. griseus* for 24 h then with the chitinase from *T. viride* for 12 h, rich in GlcNAc (▲), enzymatic hydrolysate of chitin com with the chitinase from *S. griseus* only, rich in GlcNAc₂ (x) and enzymatic hydrolysate of *Bombyx eri* larva chitin-2 steps with the chitinase from *S. griseus* for 24 h then with the chitinase from *T. viride* for 12 h, rich in GlcNAc (■).

Table S2. Ethanolic yields on substrates issued from commercial or extracted products.

Substrate	Initial concentration (g/L)	Ethanol produced (g/L)	Ethanol yield (g/g)	Maximum theoretical yield (%)
Commercial products				
<i>N</i> -acetylglucosamine	20.00 ± 0.01	3.73 ± 0.08	0.19 ± 0.01	44.7 ± 1.5
Chitin com extracted from shrimp shells				
Hydrolysate rich in GlcNAc	3.70 ± 0.12	0.50 ± 0.08	0.14 ± 0.02	32.5 ± 4.6
Hydrolysate rich in GlcNAc ₂	3.49 ± 0.06	ND	ND	0
Chitin-2 steps extracted from <i>Bombyx eri</i> larva				
Hydrolysate rich in GlcNAc	5.91 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.09 ± 0.01	22.3 ± 1.2

ND: Not determined.

Résultats :

-E. Husson, C. Hadad, G. Huet, S. Laclef, D. Lesur,b, V. Lambertyn, A. Jamali, S. Gottis, C. Sarazin, A. Nguyen Van Nhien ; **Effect of room temperature ionic liquids on selective biocatalytic hydrolysis of chitin via sequential or simultaneous strategies** ; *Green Chemistry* ; 2017 ; **19**, 4122-4131 (DOI : 10.1039/C7GC01471F)

- G. Huet, Caroline Hadad, E. Husson, S. Laclef, Virginie Lambertyn, M. Araya Farias, Arash Jamali, M. Courty, R. Alayoubi, I. Gosselin, C. Sarazin, A. Nguyen Van Nhien ; **Straightforward extraction and selective bioconversion of high purity chitin from Bombyx eri larva: Toward an integrated insect biorefinery** ; *Carbohydrate Polymers* ; 2020 ; **228** ; 115382 (DOI : 10.1016/j.carbpol.2019.115382)

I. Discussion et conclusions

Les deux articles, publiés dans les journaux internationaux « **Green Chemistry** » et « **Carbohydrate Polymers** », sont complémentaires l'un de l'autre.

Le premier article traite de la faisabilité du prétraitement aux liquides ioniques, sur une chitine commerciale de haute pureté, avec deux voies de prétraitement/hydrolyse proposées : (i) **la voie séquencée**, où le prétraitement est réalisé en amont de l'hydrolyse, et (ii) **la voie simultanée**, où l'hydrolyse est effectuée en milieu ionique (Chart 1 (Husson et al. 2017)). Cette première étude nous a permis d'obtenir de précieuses informations nécessaires à l'obtention de rendements d'hydrolyse, concurrentiels à ceux de la littérature (Tableau 1 (Husson et al. 2017)). Dans le deuxième article, nous avons étendu cette méthode à des chitines de différentes sources, avec l'objectif, de valoriser la bioraffinerie de l'insecte, en proposant une voie de valorisation des cuticules d'insectes en mono-, chito-oligosaccharides.

L'impact du prétraitement de la chitine par deux liquides ioniques commerciaux à base de noyau imidazolium (respectivement acétate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium ([C₂mim][OAc] et méthylphosphonate de 1-éthyl-3-méthylimidazolium [C₂mim][MeO(H)PO₂]) sur les résultats des hydrolyses enzymatiques a été étudié (Figure I.12).

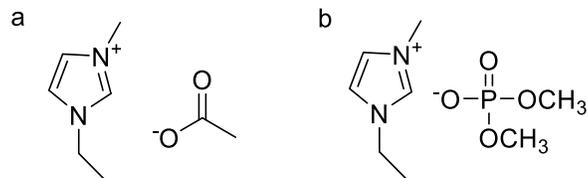


Figure I.12 : Liquides ioniques utilisés dans l'étude : (a) [C₂mim][OAc] et (b) [C₂mim][MeO(H)PO₂].

Comme exposé précédemment, la chitine est un polymère semi-cristallin ce qui lui confère sa propriété récalcitrante. Cela est lié au réseau de liaisons hydrogène, hautement ordonné, qu'il est nécessaire de désorganiser pour permettre, dans un second temps, une meilleure hydrolyse enzymatique. Le « chart 1 » de notre premier article (Husson et al. 2017) résume la stratégie développée pour affecter la structure supramoléculaire du polymère en amont de son hydrolyse enzymatique. [C₂mim][OAc] et [C₂mim][MeO(H)PO₂] ont été choisis pour leur impact positif sur le prétraitement de biomasses lignocellulosiques, en augmentant leur digestibilité par des hydrolases (Auxenfans, Buchoux, Larcher, et al. 2014b; Auxenfans et al. 2017; Yang et al. 2013). De plus, grâce à leurs chaînes alkyles inférieures à 4 carbones, leur toxicité est grandement réduite. Ce prétraitement doux (110 °C, 40 min) permet de solubiliser partiellement la chitine. L'arrêt du prétraitement se fait par ajout d'eau qui réagira, par l'effet anti-solvant, et faire précipiter la chitine. Des traces de liquide ionique peuvent subsister entre les fibres de chitine et ces dernières doivent être convenablement nettoyées par une succession de rinçages à l'eau, de re-dispersion des fibres au bain à ultrason et de filtration des fibres. La chitine est ensuite lyophilisée et est appelée chitine prétraitée.

Lors de cette première étude, nous avons testé deux chitinases: (i) une chitinase de *Trichoderma viride* (TV, mycète), hydrolysant sélectivement la chitine en *N*-acétylglucosamine (GlcNAc, DP1), le monomère de la chitine, et (ii) une seconde provenant de *Streptomyces griseus* (SG, bactérie), pouvant hydrolyser la chitine en *N,N'*-diacétylchitobiose (GlcNAc₂, DP2), le dimère du polymère de chitine. La stratégie séquencée, décrite dans cet article, démontre une efficacité supérieure de [C₂mim][OAc] par rapport à l'utilisation du LI [C₂mim][MeO(H)PO₂]. En effet, la Figure 1 du Green Chem. 2017 (Husson et al. 2017), compare les rendements en DP1 et DP2 obtenus à partir de la chitine non traitée, et des chitines prétraitées aux deux LIs.

Les hydrolyses de la chitine, non prétraitée ou prétraitée au $[C_2mim][MeO(H)PO_2]$ catalysées par les enzymes de *T. viride*, ne permettent d'atteindre que de très faibles rendements (10.74 ± 1.40 mg/g de chitine). Seul le prétraitement au $[C_2mim][OAc]$ donne lieu à une augmentation des rendements en DP1 en utilisant les chitinases de *T. viride*. En ce qui concerne les hydrolyses catalysées avec les chitinases de *S. griseus*, le prétraitement au $[C_2mim][OAc]$ induit également une augmentation des rendements en DP2. $[C_2mim][MeO(H)PO_2]$ n'a donc pas permis d'augmenter les rendements en DP1 ou DP2 et n'est donc pas efficace pour prétraiter la chitine en amont de son hydrolyse enzymatique contrairement à $[C_2mim][OAc]$.

Les caractérisations, effectuées sur les chitines prétraitées, ont également montré un impact différent du LI $[C_2mim][OAc]$ sur la chitine pure comparé au prétraitement effectué avec $[C_2mim][MeO(H)PO_2]$. En effet, les images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) indiquent un changement morphologique important de la chitine, après prétraitement au $[C_2mim][OAc]$. Les particules observées dans le cas de la chitine pure, ou encore après prétraitement au $[C_2mim][MeO(H)PO_2]$, ne sont plus visibles donnant lieu à une structure plus expansée sous forme de feuillets (Figure 3 (Husson et al. 2017)). Ce changement structural a également été mis en évidence avec le calcul de l'indice de cristallinité, réalisé à partir des diffractogrammes obtenus par DRX (Figure 4 (Husson et al. 2017)). Une baisse notable de cet indice a été notée après prétraitement au $[C_2mim][OAc]$, 50 % contre 75 %, dans le cas de la chitine pure alors qu'aucune baisse n'a été observée, dans le cas de la chitine prétraitée au $[C_2mim][MeO(H)PO_2]$. De plus, le paramètre Kamlet taft de $[C_2mim][OAc]$ est de 0,64 contre 0,48 pour $[C_2mim][MeO(H)PO_2]$ en accord avec les données de la littérature concernant d'autres polysaccharides (Shamshina 2019). En dessous de $\beta < 0.5$, la basicité nette du liquide ne serait pas suffisante pour entrer en interaction avec les liaisons hydrogènes et déstabiliser le réseau intra- et inter-chaines au sein du polymère.

Ces premières analyses nous ont donc permis de sélectionner le LI le plus adapté pour le prétraitement de ce biopolymère. Une fois ce dernier sélectionné, nous avons opté pour une seconde stratégie visant à limiter le nombre d'étapes intermédiaires liées à l'élimination du liquide ionique de la chitine et permettant de diminuer la quantité de LI utilisée. Cette méthode,

dite simultanée, s'opère sans retirer le liquide ionique de la chitine après prétraitement et l'hydrolyse enzymatique se fera alors en milieu LI. Différents essais ont été réalisés avec les deux chitinases et à différentes concentrations en LI entre 5 à 50 % (v/v). La Figure 5 (Husson et al. 2017) indique l'ensemble des rendements en DP1 et DP2 obtenus, après 24 h d'hydrolyse enzymatique et à différentes concentrations. De cette étude, nous pouvons conclure que la présence du LI en milieu aqueux n'a pas d'influence sur la sélectivité de chaque enzyme. En effet, comme pour la stratégie séquencée, la chitinase de *T. viride* a généré principalement la *N*-acétylglucosamine (DP1) et le produit principal obtenu avec la chitinase de *S. griseus* est le *N, N'*-diacétylchitobiose (DP2). Notons que le meilleur rendement en DP1 est celui obtenu avec une concentration de 5 % (v/v) en LI (77.26 ± 2.34 mg/g chitine vs 7.89 ± 0.90 mg/g de chitine sans LI). A une concentration de 10% (v/v) en LI, une légère baisse de ce rendement est observable. En revanche, à partir d'une concentration de 20% (v/v) de [C₂mim][OAc], une diminution importante des rendements a été notée, probablement due à la désactivation partielle de la chitinase, induite par une plus grande quantité de liquide ionique. Enfin, à partir de 40 % (v/v), la *N*-acétylglucosamine n'est plus détectée par HPLC suggérant une désactivation totale de la chitinase. Des résultats similaires ont été obtenus en présence de *S. griseus*, où le rendement en DP2 le plus élevé a été obtenu à une concentration de 10 % (v/v) en LI. Toutefois, quel que soit l'enzyme utilisée (*T. viride* ou *S. griseus*), les rendements obtenus, à une concentration de 5 % ou 10 % (v/v) en LI, restent inférieurs à ceux obtenus par la stratégie séquencée (DP1 : 118.38 ± 17.59 mg/g chitine vs 77.26 ± 2.34 mg/g chitine ; DP2 : 573.72 ± 5.99 vs 667.60 ± 20.71 mg/g de chitine). La stratégie simultanée est un compromis entre l'accès des enzymes au substrat avec le prétraitement au liquide ionique et la dénaturation des enzymes par ce même liquide ionique.

Enfin, nous avons étudié l'influence du mélange des deux chitinases commerciales sur la sélectivité et sur les rendements obtenus en DP1 et DP2 après hydrolyse enzymatique par voie séquencée et simultanée de la chitine non traitée et de la chitine prétraitée au LI. La stratégie utilisée est décrite dans le Chart 1 (Husson et al. 2017): (i) les deux chitinases sont introduites en même temps pendant 24 h, (ii) les deux chitinases sont introduites successivement, la deuxième enzyme étant introduite 24 h après la première. Les résultats obtenus ont montré que quelle que soit la combinaison, la sélectivité s'est orientée majoritairement vers la formation du DP1, les

rendements résiduels en DP2 ne dépassant pas 4 mg/g de chitine non-traitée ou prétraitée. En revanche, pour les trois combinaisons d'enzymes testées, les rendements en DP1 ont été significativement améliorés que cela soit dans le cas de la chitine non traitée ou dans le cas de la chitine prétraitée au LI. C'est la combinaison « SG puis TV », par voie séquentielle, appliquée à la chitine prétraitée qui conduit au rendement le plus élevé en DP1 (760.0 ± 0.1 mg/g de chitine), suggérant une synergie entre les deux chitinases. Il est important de noter que ce rendement en DP1 est largement supérieur à ceux de la littérature comme le montre le Tableau 1 (Husson et al. 2017).

Nous avons étendu cette méthode à différentes sources de biomasses chitineuses en nous affranchissant pour certaines, des étapes d'extraction de la chitine. Cette étude a fait l'objet du second article présenté dans ce chapitre (Gael Huet et al. 2020).

Deux sources de chitine ont alors été sélectionnées : la première est obtenue à partir de cuticules de *Bombyx eri*, une chenille et, la seconde, à partir de carapaces de *Crangon crangon*, une crevette. De cette façon, nous avons pu comparer les avantages et les inconvénients de travailler sur une source provenant d'insectes ou de crustacés. En effet, ce deuxième article présente également la composition des biomasses chitineuses en chitine, protéines, minéraux, eau et lipides à différents stades de l'extraction. La « 0 étape » représente la biomasse brute nettoyée au préalable avec de l'eau et de l'éthanol. La « 1 étape » correspond à la « 0-étape » ayant subi uniquement l'étape de déprotéinisation. Enfin, la « 2 étapes » correspond à la « 0 étape » ayant subi les deux étapes d'extraction, c'est à dire la déminéralisation et la déprotéinisation. Le prétraitement au $[C_2min][OAc]$ a ensuite été effectué sur les différents échantillons, nous permettant de comparer son efficacité en fonction de la source et de la pureté de la chitine. Pour cela, les biomasses ont été hydrolysées par les mêmes enzymes employées lors de l'article précédent, selon la stratégie séquentielle et en combinant les chitinases.

Il est important de noter que le ratio « chitine/protéines/minéraux/eau/lipides » dépend fortement de la source. C'est pourquoi une partie de ces travaux a tout d'abord été dédiée à la détermination des compositions en fonction de l'étape d'extraction. Toutes ces informations sont regroupées dans le Tableau 1 (Gael Huet et al. 2020).

Les résultats de composition des chitines/biomasses chitineuses permettent de mettre en évidence une information majeure qui est la teneur en minéraux, bien plus importante, pour les échantillons «0» et «1 étape» issus de *Crangon crangon* (respectivement 21.73 et 30.31 %) par rapport aux échantillons «0» et «1 étape» issus de *Bombyx eri* (respectivement 1.9 % et 0.75 %). À contrario, la teneur en protéines est sensiblement égale, dans les biomasses de chitine de *Bombyx eri* et *Crangon crangon* n'ayant subi aucune étape d'extraction (0 étape), soit respectivement 45.8 % et 49.7%. Il y a donc une nette différence de la proportion de chitine présente dans les sources puisque la quantité de chitine pour les deux biomasses est de 45% pour *Bombyx eri* (0 étape) contre seulement 19.3% pour *Crangon crangon* (0 étape). Il est important de souligner ici, qu'après une étape de déprotéinisation, la biomasse de chitine issue de *Bombyx eri* est relativement pure et prête à utilisation (89.7% de chitine, 0.75% de minéraux et 0.4% de protéines) alors que celle issue de *Crangon crangon* contient moins de 65% de chitine, le reste correspondant majoritairement aux minéraux. De plus, la composition de l'échantillon de *Bombyx eri*, après les 2 étapes d'extraction, est similaire à celle obtenue après 1 étape. L'étape de déminéralisation n'est donc pas nécessaire ce qui minimise le coût de l'extraction et pourrait faciliter le procédé industriel. En revanche, cette étape est indispensable, dans le cas de la biomasse de chitine issue de *Crangon crangon*, si l'on souhaite obtenir un pourcentage de chitine supérieur à 90%.

Les biomasses de chitine sont ensuite prétraitées au LI et soumises à l'hydrolyse enzymatique. Ce prétraitement a été réalisé sur l'ensemble de nos échantillons et les indices de cristallinité de la chitine, ainsi que les DTG_{max} (dérivé maximale de l'analyse thermogravimétrique) avant et après prétraitement, sont présentés dans le Tableau 2 (Gael Huet et al. 2020). Ces données permettent, de mettre en évidence, une perte de cristallinité et une baisse de la DTG_{max} sur l'ensemble de nos échantillons prétraités au $[C_2min][OAc]$. Le prétraitement au LI permet de baisser la cristallinité du polymère en déstabilisant le réseau de liaisons hydrogène, rendant ainsi la structure supramoléculaire de la chitine plus amorphe. Comme dans le cas de la chitine commerciale, les clichés MEB montrent que la structure de la chitine change après prétraitement et passe d'une structure condensée de petites particules à

une structure en feuillets beaucoup plus expansée après prétraitement au [C₂min][OAc]. Cette structure, plus expansée, faciliterait aussi l'accès des chitinases au polymère.

Dans cette étude, nous avons également montré que le prétraitement au [C₂min][OAc] permet de solubiliser les protéines et que ces dernières peuvent être partiellement éliminées des biomasses chitineuses quelle que soit la source.

En ce qui concerne les résultats obtenus lors des hydrolyses enzymatiques, la première constatation qui peut être faite est que, indépendamment de la source, de l'étape d'extraction ou encore de la chitinase utilisée, le prétraitement au LI augmente les rendements en DP1 et DP2 obtenus par hydrolyse enzymatique. En effet, les rendements des hydrolyses réalisées sur *Crangon crangon* « 2 étapes » passent de 7 mg GlcNAc/g de chitine à 118 mg de GlcNAc/g de chitine lorsque la chitine est prétraitée et hydrolysée par la chitinase extraite de *TV*. La même constatation est faite pour la chitine issue de *Bombyx eri* où les rendements augmentent de 72 mg de GlcNAc/g de chitine à 121 mg de GlcNAc/g de chitine. Quelle que soit la biomasse utilisée, les rendements atteignent une valeur maximale aux alentours de 120 mg en GlcNAc/g de chitine lorsque la chitinase de *TV* est utilisée. Les rendements maximaux sont aux alentours de 680 mg de GlcNAc₂/g de chitine lorsque la chitinase de *SG* est utilisée sur de la biomasse prétraitée au [C₂min][OAc]. Lorsque les deux enzymes sont combinées, les rendements obtenus à partir de la chitine de *Bombyx eri* « 2 étapes » prétraitée sont particulièrement élevés et atteignent 899 mg de GlcNAc/g de chitine. Les rendements obtenus sur la chitine de *Crangon crangon* « 2 étapes » prétraitée sont aussi élevés mais légèrement inférieurs avec des valeurs de 760 mg de GlcNAc/g de chitine.

Cette différence de rendement, entre les biomasses prétraitées et non prétraitées, peut s'expliquer par la différence de cristallinité, avant et après prétraitement. Comme constaté dans le premier article (Husson et al. 2017), l'indice de cristallinité est hautement corrélé aux rendements des hydrolyses (Tableau 2, (Gael Huet et al. 2020)). Plus une chitine est cristalline, moins les rendements sont élevés. Cette hypothèse est vérifiée sur les chitines non prétraitées au liquide ionique. En effet, les hydrolyses réalisées sur *Crangon crangon*, qui est plus cristalline que *Bombyx eri*, ont donné des rendements nettement inférieurs. Cette plus faible cristallinité

de la chitine d'insectes a permis aux hydrolyses réalisées sans prétraitement avec l'enzyme extraite de *SG*, d'obtenir des rendements intéressants (566 mg GlcNAc₂/g de chitine). Les échantillons obtenus à partir de la biomasse de *Bombyx eri*, naturellement plus amorphe, seraient de meilleurs candidats puisqu'ils nécessiteraient moins de traitement pour l'extraction et moins de prétraitement au LI pour obtenir de bons rendements en oligosaccharides.

La levure *Scheffersomyces stipitis* a été sélectionnée, en accord avec les données de la littérature (Inokuma, Hasunuma, and Kondo 2016), dans le but de fermenter de la *N*-acétylglucosamine et le chitobiose obtenus dans les hydrolysats en éthanol. En parallèle, La fermentation a également été réalisée en utilisant la *N*-acétylglucosamine commerciale comme source de carbone. Les rendements en éthanol obtenus pour chacune de ces fermentations ont été comparés. La production d'éthanol a été observée sur tous les échantillons contenant le monomère GlcNAc, quelle que soit leur origine. En revanche, aucune production d'éthanol n'a été détectée à partir des hydrolysats riches en DP2 (Tableau S2, supporting information, (Gael Huet et al. 2020)).

Notons que la totalité de la *N*-acétylglucosamine a été consommée au niveau de toutes les expériences, même si les concentrations en éthanol déterminées sont différentes. En effet, la fermentation de la *N*-acétylglucosamine commerciale a fourni les meilleurs rendements avec une concentration en éthanol de 0.19 g d'éthanol /g de GlcNAc soit un rendement de 44.7 %. Le rendement obtenu à partir de l'hydrolysat, issu de la dégradation enzymatique de la chitine commerciale prétraitée, atteint 0.14 g/g soit un rendement de 32.5 %. Enfin, la fermentation, réalisée sur l'hydrolysat, issu de la dégradation enzymatique de la chitine prétraitée de *Bombyx eri 2 étapes*, permet d'obtenir un rendement de 0.09g/g soit un rendement de 22.3 %. Même si les rendements restent inférieurs à ceux obtenus à partir de la glucosamine commerciale, ces expériences démontrent que la fermentation n'est pas inhibée par les traitements effectués sur les biomasses de chitine (déprotéinisation, déminéralisation mais aussi le prétraitement au [C₂min][OAc]). Les liquides ioniques sont connus pour leurs cytotoxicités or *S.stipitis* a été capable de fermenter la glucosamine, provenant d'un hydrolysat de chitine prétraitée, et donc avec de potentielles traces de [C₂min][OAc]. La voie séquencée ne semble pas générer d'inhibiteur

potentiel pour les microorganismes responsables de la fermentation. Il est important de souligner, ici, que ces résultats encourageants ont été obtenus sans optimisation des conditions opératoires de la fermentation.

II. Conclusions :

La chitine provenant de *Bombyx eri* semble être une source prometteuse, en raison de sa faible teneur en minéraux, permettant une extraction facilitée, moins coûteuse mais aussi moins polluante. Cette faible teneur en minéraux engendre une teneur en chitine plus importante dans les biomasses non extraites (0 étape) avec 45 % de chitine dans *Bombyx eri* contre 19.3 % chez *Crangon crangon*. Lorsque seule, l'étape de déprotéinisation est réalisée, cette teneur en chitine passe à 90 % pour *Bombyx eri* contre seulement 65 % pour *Crangon crangon*. De plus, la chitine de *Bombyx eri* est naturellement plus amorphe que celle de *Crangon crangon* ce qui lui confère une meilleure digestibilité enzymatique.

Le prétraitement au [C₂min][OAc] a démontré son efficacité à amorphiser la chitine et à augmenter les performances de la dépolymérisation enzymatique, indépendamment de la source de chitine et de la composition de la biomasse chitineuse. La capacité d'un liquide ionique à solubiliser et à prétraiter la chitine provient de sa capacité à disrupter le réseau de liaison hydrogène. Cela est directement lié à la valeur du paramètre β des paramètres Kamlet Taft qui doit être supérieur à 0,5 pour pouvoir solubiliser la chitine. Plus le paramètre β est important, plus le liquide ionique est capable de rompre le réseau de liaisons hydrogène et ainsi de solubiliser la chitine. Le [C₂min][MeO(H)PO₂] n'ayant pas un paramètre β assez important, il n'a pas été efficace en tant que prétraitement de la chitine. Enfin, La fermentescibilité aérobie des hydrolysats riches en *N*-acétylglucosamine a été démontrée en présence de *S. stipitis*.

Chapitre 2 : Liquides ioniques *versus* liquides ioniques zwitterioniques : Impact des prétraitements des biomasses chitineuses et lignocellulosiques sur la dépolymérisation enzymatique

Partie A : État de l'art

Une introduction complète ayant déjà été faite sur la biomasse chitineuse et ses prétraitements aux liquides ioniques (LIs) dans l'introduction générale et le chapitre I, nous avons focalisé l'introduction de ce deuxième chapitre sur une autre ressource renouvelable riche en polysaccharides : la biomasse lignocellulosique (BLC) ; sa transformation et l'utilisation de néo-solvants tels que les liquides zwitterioniques (ZILs) pour son fractionnement.

I. Composition de la biomasse lignocellulosique

Il existe un large panel de biomasses lignocellulosiques, potentiellement valorisables, telles que les résidus forestiers (bois durs *versus* bois tendre), les résidus agricoles (paille de blé, paille de riz et tiges de maïs) ainsi que les cultures dédiées (*Miscanthus x giganteus*). La BLC est d'un intérêt majeur pour les exploitations forestières qui produisent une quantité importante de sciure de bois mais aussi pour les exploitations agricoles qui génèrent beaucoup de co-produits. Il a été estimé que la production annuelle mondiale de BLC était d'environ 181,5 milliard de tonnes (Dahmen et al. 2019; Kumar, Singh, and Singh 2008). Dans l'Union Européenne, connue pour ses nombreuses exploitations agricoles et forestières, cela représente 513 millions d'hectares repartis en forêts (36 %), terres agricoles (32 %) et pâturages (15 %), potentiellement capables de fournir de la BLC (Fischer et al. 2010).

La BLC est composée de trois principaux biopolymères distincts : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Cependant, la proportion entre ces trois biopolymères varie en fonction de la source. De manière générale, la teneur en cellulose dans une biomasse varie de 25 à 55 %, de 8 à 50 % en ce qui concerne l'hémicellulose et de 10 à 35 % pour la lignine (Zhao et al. 2012). Les teneurs en cellulose et en lignine sont plus importantes dans le bois, alors que la teneur en hémicellulose est plus importante dans les biomasses herbacées (Zhao et al. 2012) (Tableau II.1).

Tableau II.2 : Compositions moyennes en cellulose, hémicellulose et lignine des biomasses provenant du bois ou de sources herbacées (Zhao et al. 2012).

SOURCES	COMPOSITION MOYENNE EN CELLULOSE (%)	COMPOSITION MOYENNE EN HÉMICELLULOSE (%)	COMPOSITION MOYENNE EN LIGNINE
BIOMASSES DE BOIS	40-55	8-25	18-35
BIOMASSES HERBACÉES	25-50	20-50	10-30

Les trois polymères sont étroitement liés entre eux pour donner sa structure à la BLC (Figure II.10). Les chaînes de cellulose s’assemblent entre elles, par le biais d’un réseau de liaisons hydrogène, pour former des fibres. Les fibres de cellulose sont, comme pour la chitine, semi-cristallines et composées de zones amorphes et de zones cristallines (Thygesen et al. 2005). Les pectines peuvent aussi se retrouver, entre les chaînes d’hémicellulose et de cellulose, pour apporter de la stabilité au réseau. La lignine est un polymère amorphe qui donnera sa rigidité à la structure et la protégera des attaques microbiologiques (Brodeur et al. 2011). De manière générale, la cellulose et l’hémicellulose se trouvent dans les lamelles moyennes et internes de la paroi secondaire, alors que la lignine est localisée dans les lamelles moyennes externes. Cette structuration complexe est à l’origine des propriétés récalcitrantes de la BLC : principal verrou scientifique et technologique à sa valorisation.

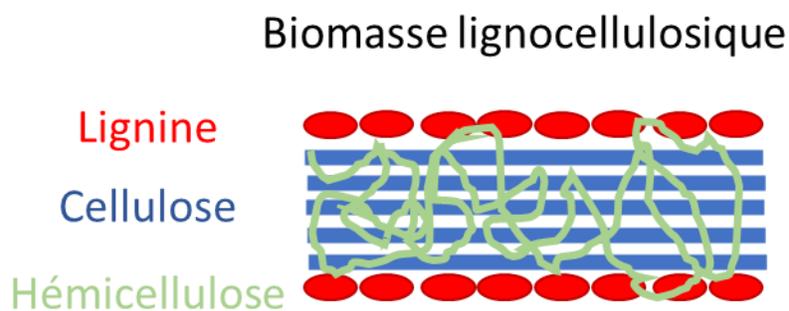


Figure II.10 : Vue simplifiée de l’organisation de la matrice lignocellulosique.

II. Cellulose

1. Structure chimique

La cellulose est généralement la principale composante de la BLC. Elle est composée de motifs glucose, reliés entre eux, par des liaisons osidiques β 1-4 (Figure II.11). Ce polymère est donc polaire et possède trois fonctions hydroxyles par monomère (hors monomères aux extrémités) en C2, C3 (alcools secondaires) et C6 (alcool primaire). Ces fonctions libres donnent au polymère de cellulose, ses propriétés récalcitrantes puisqu'elles permettront la formation des liaisons hydrogène. Ces liaisons inter- ou intra-chaines sont à l'origine de la structure supramoléculaire de la cellulose. Les liaisons couramment observées sont l'hydrogène de la fonction hydroxyle en C3 qui interagit avec l'oxygène du cycle adjacent en C6, l'hydrogène de la fonction hydroxyle en C6 qui interagit avec l'oxygène de la fonction hydroxyle en C2 et l'hydrogène de la fonction hydroxyle en C6, qui interagit avec l'oxygène en C3 (Pérez and Samain 2010; André Pinkert, Kenneth N. Marsh, Shusheng Pang 2009).

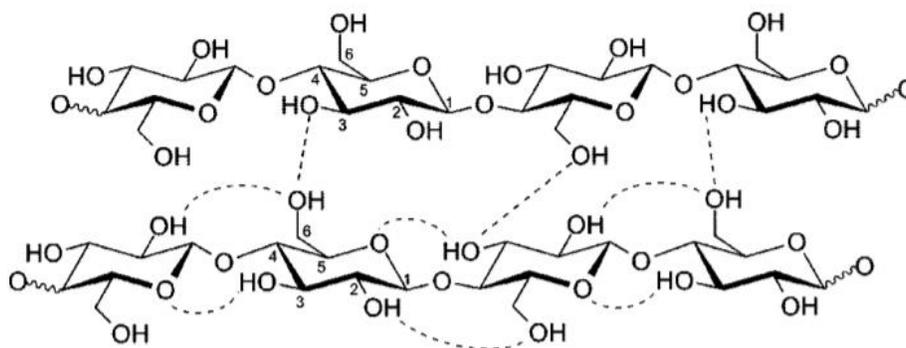


Figure II.11 : Représentation des interactions des liaisons hydrogène inter- et intra-chaines de la cellulose (André Pinkert, Kenneth N. Marsh, Shusheng Pang 2009).

2. Cristallinité et polymorphisme

Il est possible de trouver la cellulose sous 4 formes cristallines notées I, II, III et IV. La forme I de la cellulose est celle, trouvée à l'état naturel, les chaînes de cellulose s'agencent de manière parallèle les unes par rapport aux autres (Figure II.3). Les autres formes cristallines découlent de la première forme. La cellulose II a ses chaînes qui s'organisent de manière antiparallèle, les unes par rapport aux autres (Figure II.3). Cela modifie le réseau de liaisons hydrogène qui s'organise différemment et devient plus dense. La cellulose II contient des cristaux

de plus petite taille et plus denses ce qui expliquerait la meilleure stabilité thermique de cette dernière (Langan, Nishiyama, and Chanzy 1999).

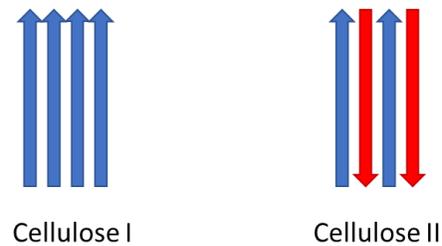


Figure II.3 : Représentation schématique des polymorphismes de la cellulose I et II.

Les celluloses III et IV sont des formes obtenues à partir des deux précédentes à l'aide de traitements chimiques. L'alignement des fibres est conservé, mais un changement de la structure supramoléculaire de la cellulose est observé. Les formes III et IV sont toutes les deux des formes réversibles de la cellulose (Roche and Chanzy 1981; Pérez and Samain 2010 ; Kobayashi et al. 2011; Masahida Wada, Heux, and Sugiyama 2004; Masahisa Wada, Ike, and Tokuyasu 2010).

III. Applications

La cellulose peut être utilisée pour une multitude d'applications (Figure II.4). De manière générale, elle peut aussi être transformée en molécules plateformes (oligosaccharides) pouvant être utilisées dans de nombreuses réactions chimiques. La cellulose peut servir d'excipient dans le domaine biomédical à l'aide des nanocristaux qui peuvent en être extraits (Seabra et al. 2018). Les nanocristaux de cellulose, combinés à des encres, peuvent être utilisables pour de l'impression 3D (Cernencu, Lungu, and Stancu 2019).

Bien entendu, la fermentescibilité des sucres, issus de la dépolymérisation de la cellulose pour l'obtention de bioéthanol, est l'application la plus étudiée en raison de la nécessité de trouver des alternatives aux carburants actuels. Ces biocarburants cellulodiques disposent d'un avantage certain sur les carburants fossiles puisqu'ils ne sont constitués que de carbones issus de la biosphère. Dans un cadre raisonné, et en utilisant les déchets agricoles, les biocarburants sont une alternative à envisager et même à exploiter au niveau industriel puisque ces biomasses sont disponibles en très grosses quantités et peu onéreuses. De plus, la production de biocarburants à partir de biomasses cellulodiques génère peu de gaz à effet de serre (Brodeur et al. 2011).

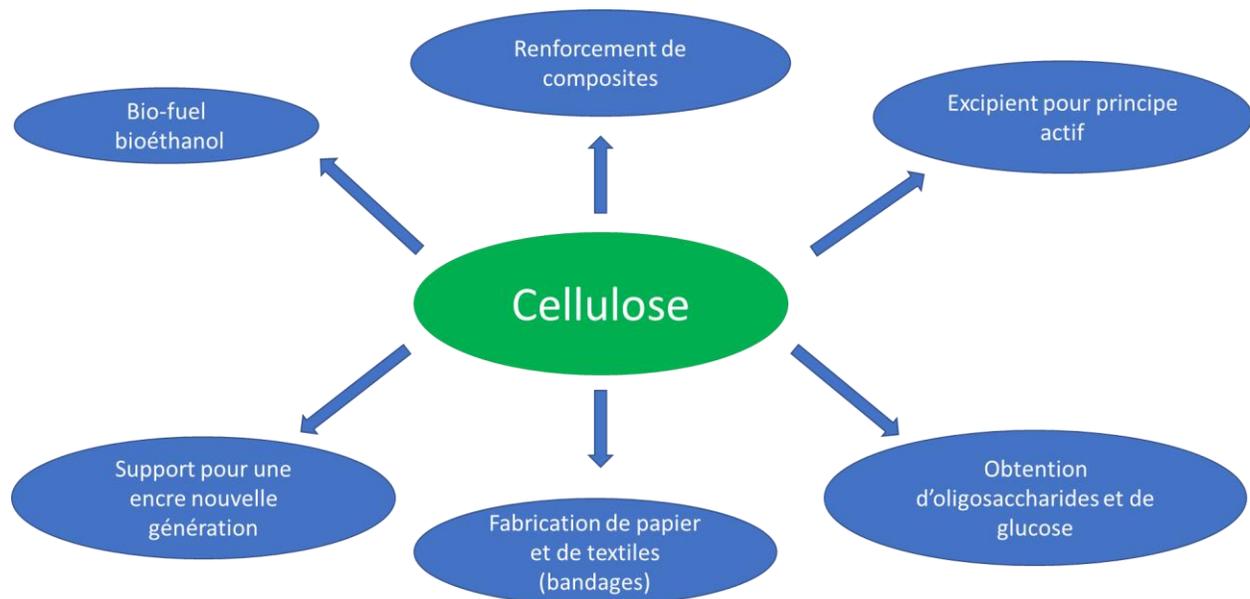


Figure II.4 : Principales applications de la cellulose (Cernencu, Lungu, and Stancu 2019; Kolakovic et al. 2012; Seabra et al. 2018; Carere et al. 2008; Czaja et al. 2007; Yang et al. 2011; J. Astruc 2018).

IV. Fermentation alcoolique de monosaccharides

La fermentation alcoolique est une voie métabolique qui peut être mobilisée par certains microorganismes, comme *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*, pour la transformation de sources de carbone en éthanol. La fermentation se produit uniquement sous certaines conditions. La température est un facteur primordial : si la température est trop basse, les microorganismes entreront en stase, en revanche, si elle est trop haute, les microorganismes ne pourront pas survivre. De plus, bien que cette voie de synthèse produise de l'éthanol dans le milieu de culture, ce dernier est toxique vis-à-vis des microorganismes s'il est présent en trop grande quantité. Il est aussi nécessaire que le milieu de fermentation contienne de l'azote qui est indispensable pour la synthèse de protéines. La source de carbone des levures est généralement composée de monosaccharides comme les hexoses (le D-glucose, le D-mannose ou bien le D-galactose) qui sont présents dans la cellulose et l'hémicellulose (Lin et al. 2014, Carere et al. 2008). La voie métabolique pour ces trois monosaccharides est décrite Figure II.5.

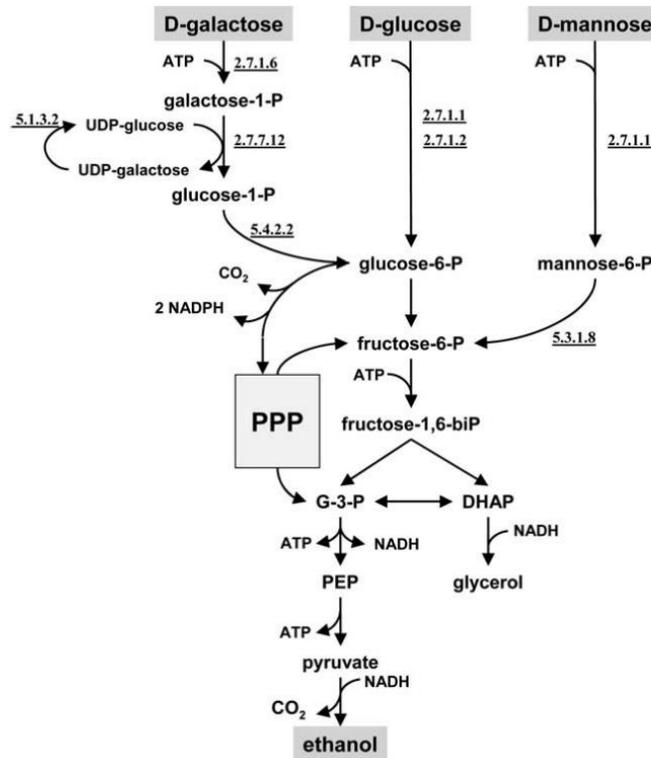


Figure II.5: Voies métaboliques des hexoses pour *S. cerevisiae*, schéma tiré de van Maris et al., 2006. Les numéros dans la figure représentent des enzymes ou des noms d'étape de la voie métabolique. Les codes des gènes des enzymes sont : (i) Catabolisme du glucose : 2.7.1.1, hexokinase (HXK1/HXK2); 2.7.1.2, glucokinase (GLK1); (ii) Catabolisme du galactose par la voie Leloir : 2.7.1.6, galactokinase (GAL1); 2.7.7.12, galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GAL7); 5.1.3.2, UDP-glucose 4-epimerase (GAL10); 5.4.2.2 phosphoglucomutase (GAL5/PGM2) ; et (iii) Catabolisme du mannose : 2.7.1.1, hexokinase I (HXK1); 5.3.1.8, mannose-6-phosphate isomérase (PMI40); G-3-P, Glyceraldehyde-3-phosphate; DHAP, dihydroxy-acetone-phosphate; PEP, phospho-enol pyruvate; PPP, (Pentose phosphate pathway ou voie métabolique des pentoses phosphate).

La voie métabolique de fermentation du glucose peut être réduite à l'équation suivante :



La fermentation du glucose est une voie de métabolisation libérant de l'éthanol et du CO₂. Le caractère récalcitrant de la cellulose empêche l'obtention de rendements élevés lors de son hydrolyse. Des prétraitements aux liquides ioniques ont déjà été réalisés au [C₂min][OAc] et au [C₂min][MeO(H)PO₂] pour augmenter les rendements des hydrolyses enzymatiques (Auxenfans et al. 2017). Cependant, un mauvais lavage de la cellulose après prétraitement peut entraîner la baisse des rendements en glucose en raison de la présence de liquide ionique résiduel, limitant ainsi son utilisation au niveau industriel. Les liquides ioniques zwitterioniques, grâce à leur

cytoxicité plus faible, sembleraient être une bonne solution pour démocratiser ce type de prétraitement puisque cela remédierait à la baisse des rendements en glucose (Chiaki Kodo, Kosuke Kuroda, Keisuke Miyazaki, Hisai Ueda 2020; Grøssereid et al. 2019; Wu et al. 2018). De plus, le caractère zwitterionique permet de s'affranchir du phénomène de dissociation des cations et anions comme dans le cas de simples liquides ioniques.

V. Objectif des travaux

L'objectif initial des travaux fut de trouver une alternative moins toxique et moins onéreuse aux liquides ioniques pour le prétraitement de la biomasse chitineuse. Pour cela, une nouvelle famille de LIs, appelée zwitterionique a été synthétisée. La particularité des molécules dites zwitterioniques est de présenter sur leur squelette, à la fois une charge anionique et cationique. Les ZILs ont très récemment été étudiés pour leur capacité à solubiliser la BLC (Satria et al. 2018). En plus de partager des caractéristiques similaires aux liquides ioniques, comme la solubilisation des polymères constitutifs de la BLC, certains ZILs détiendraient une toxicité inférieure aux liquides ioniques classiques ce qui ouvrirait une opportunité à leur utilisation à grande échelle (Chiaki Kodo et al 2020). La synthèse des différents ZILs synthétisés dans l'étude est réalisée à base d'acide urocanique, molécule bio-sourcée dérivant de la L-histidine. La synthèse se réalise en 4 étapes dont les rendements respectifs se situent entre 85 % et 99 %. La synthèse est décrite Figure 1 de l'article et de plus amples informations sont disponibles dans le supporting information de l'article (Gaël Huet et al. 2020). Contrairement aux synthèses de nombreux LIs classiques, la dernière étape de synthèse des ZILs (passage sur résine amberlite IRN-78 (OH⁻)) ne nécessite pas d'étape de purification supplémentaire. Les ZILs ont donc un énorme avantage puisqu'ils sont biosourcés, et dans notre cas, ne nécessitent pas d'étapes de purification par chromatographie. La synthèse des ZILs n'a pas été réalisée par mes soins mais par les membres de l'équipe du LG2A (Figure II.6).

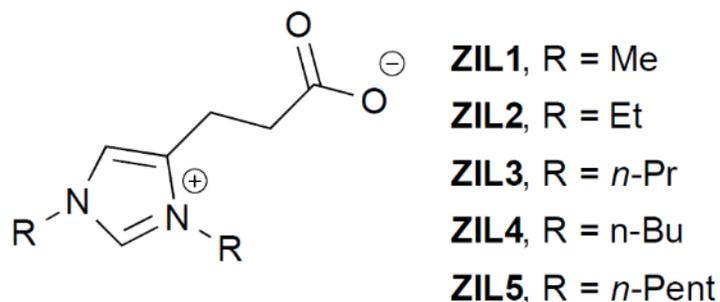


Figure II.6 : Structures des ZILs synthétisés.

Les ZILs, dont les chaînes alkyles vont de méthyle à pentyle, ont donc été testés sur une chitine commerciale puis sur différentes BLC (Figure II.7). Cet article présente une étude de l'influence de la longueur des chaînes alkyles constitutives des ZILs sur leur efficacité à prétraiter les biomasses animales et végétales en vue d'améliorer *in fine* leur dépolymérisation enzymatique. Les résultats obtenus ont été comparés au LI de référence [C₂mim][OAc] démontré comme efficace dans le chapitre 1 et largement reconnu pour son efficacité sur des biomasses végétales (Alayoubi et al. 2020).

La cytotoxicité des différents ZILs synthétisés a aussi été évaluée en fonction de la longueur de leur chaîne alkyle sur des levures (*S. cerevisiae*, *S. stipitis*), des bactéries (*E. coli*, *S. aureus*), ou encore des moisissures (*A. brasiliensis* et *P. chrysogenum*). L'interaction des ZILs et leur toxicité vis-à-vis de la membrane de *S. cerevisiae* a aussi été étudiée par dynamique moléculaire par nos collaborateurs du LG2A (Dr. Benjamin Bouvier et Dr. Christine Cézard). Ces résultats ont été confrontés à des résultats expérimentaux concernant la fermentation éthanolique par *S. cerevisiae* en présence de différentes concentrations de ZILs.

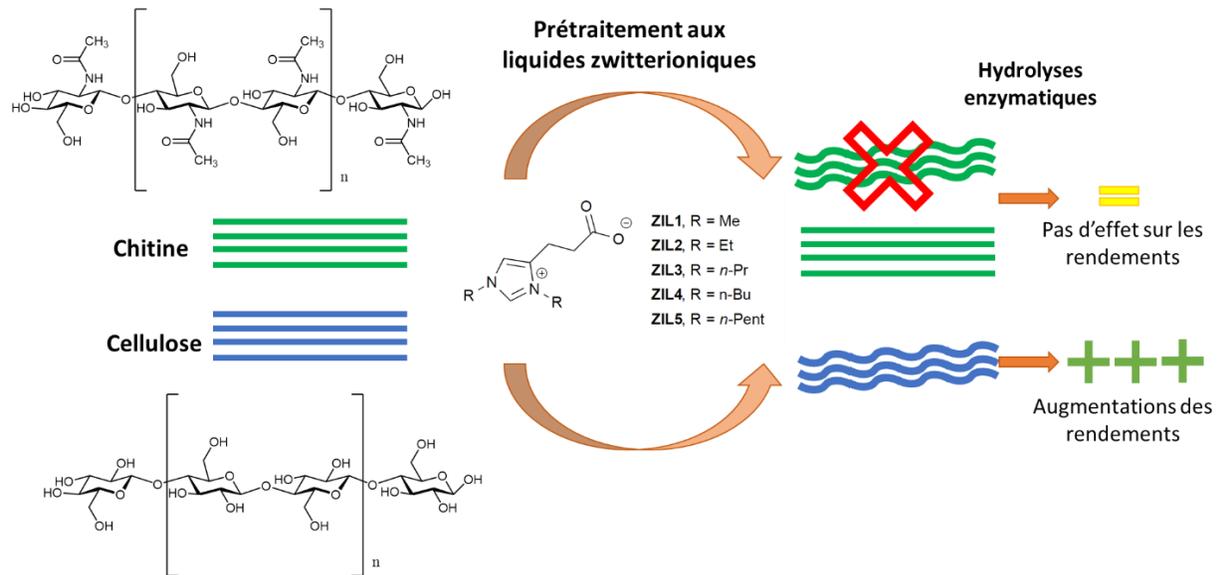


Figure II.7 : Stratégies appliquées à la chitine et la cellulose.

Partie B : Article, résultats et discussion

Article 3

1 **New Biobased-Zwitterionic Ionic Liquids: Efficiency and** 2 **Biocompatibility for the Development of Sustainable Biorefinery** 3 **Processes**

4 Gaël Huet,^a Monica Araya-Farias,^{b,c} Ranim Alayoubi,^b Sylvain Laclef,^a Benjamin Bouvier,^a Isabelle Gosselin,^b Christine
5 Cézard,^a Romain Roulard,^d Matthieu Courty,^e Caroline Hadad,^a Eric Husson,^b Catherine Sarazin,^b Albert Nguyen Van Nhien^a

6 ^a Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Université
7 de Picardie Jules Verne - UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens cedex, France.
8 E-mail: albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

9 ^b Unité de Génie Enzymatique et Cellulaire, UMR CNRS 7025, Université de Picardie Jules Verne - UFR
10 des Sciences, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

11 ^c Macromolécules and Microsystems in Biology and Medecine, Institut Curie – Centre de Recherche –
12 UMR 168 Physico Chimie Curie, Institut Pierre Gilles de Gennes pour la Microfluidique (IPGG), 6, rue Jean
13 Calvin, 75005 Paris, France.

14 ^d Plateforme de Microscopie Electronique – Université de Picardie Jules Verne, HUB de l’Energie, 33
15 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

16 ^e Laboratoire de Réactivité et Chimie des Solides, UMR CNRS 7314, Université de Picardie Jules Verne,
17 HUB de l’Energie, 33 rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex, France.

18

19 **Introduction**

20 Ionic Liquids (ILs) are generally defined as organic salts based on a substituted heterocyclic cation with an
21 organic or inorganic anion that melt below 100 °C. In addition to their thermal stability and low vapour
22 pressure, some of them can be considered as suitable solvent to solubilize the constitutive biopolymers of
23 lignocellulosic biomass (LCB). The IL-pretreatment of LCB demonstrated a great potential for improving
24 the availability of the constitutive polymers and thus their respective conversion into platform molecules,
25 high added value chemicals or biofuels.¹⁻³ By this way, hydrophilic imidazolium-based ILs as 1-ethyl-3-
26 methylimidazolium acetate [C₂mim][OAc] recently emerged in the biorefinery area as an efficient
27 alternative to other pretreatments prior to LCB transformation.⁴⁻⁸ Although their ability to disrupt or
28 fractionate LCB in mild conditions is admitted, their scale-up at industrial scale is still constrained by a
29 questionable safety context due to their eco-cytotoxicity⁹ and limited compatibility with the biological tools
30 (enzymes, cells) used in the biorefinery processes. Moreover, the imidazolium-based ILs are mainly
31 synthesized from non-renewable feedstock. They can also affect performances of both enzymatic hydrolysis
32 and microbial fermentation steps during LCB bioconversion processes. Indeed, residual [C₂mim][OAc]
33 amount entrapped in pretreated LCB can induce deactivation of hemicellulolytic enzymes during hydrolysis
34 step.¹⁰ Similarly, inhibition of yeast growth was observed from [C₂mim][OAc] concentration of 0.5 % (w/w)
35 during fermentation step.¹¹⁻¹³

36 To minimize these deleterious effects, successive washing of pretreated LCB requiring a large amount of
37 water can be implemented after pretreatment step, but remained quite often insufficient.

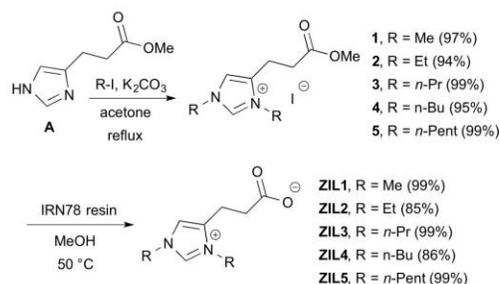
38 More recently, Kuroda et al.¹⁴ demonstrated that ZILs could be an interesting alternative to ILs, particularly
39 for LCB pretreatment prior enzymatic saccharification followed by microbial production of ethanol.

40 Nevertheless, those derivatives are not synthesized from renewable resources. Until now, few imidazolium-
41 ZIL derivatives have been synthesized and characterized.^{15,16} The studies were mainly conducted in the area
42 of (organo)catalysis.^{17, 18} The few examples described only their ability to dissolve¹⁹ or to hydrolyse
43 cellulose.²⁰ A strategy including pretreatment of LCB with H₂SO₄, addition of [(SO₃)⁴C₄C₁im] zwitterion for
44 *in situ* synthesis of [(HSO₃)⁴C₄C₁im]HSO₄ ionic liquid, and hydrolysis under microwave activation was
45 reported.²¹ However the biocompatibility of these sulfonate derivatives towards hemicellulolytic enzymes
46 and microorganisms could be questionable in regard of the cysteine content in proteins.²²
47 In the present work, we synthesized a new family of ZILs derived from the renewable natural amino acid L-
48 histidine by varying the length of the alkyl chains. This new ZIL family was then described in term of
49 structural and physicochemical properties before interaction studies with membranes of microorganisms.
50 This approach will give supplementary information for the development of lignocellulosic biorefinery.
51 Cytotoxicity study of the ZILs was then carried out with representative micro-organisms: bacteria
52 (unicellular, prokaryotic), yeasts (unicellular eukaryotic) and molds (pluricellular eukaryotic). A molecular
53 modelling study was also undertaken to provide comprehensive information about ZILs and biological
54 membrane interactions and explain the biocompatibility of ZILs with cells. The potential of ZILs for LCB
55 pretreatment prior to enzymatic saccharification was then investigated and compared to the performances
56 obtained with [C₂mim][OAc]. For this, two distinct representative LCB were selected: forest residues (oak
57 sawdust) and dedicated crop (*Miscanthus x giganteus*). Finally, the biocompatibility of ZILs with the
58 fermentative reference yeast, *S. cerevisiae*, was evaluated.

59 **Results and discussion**

60 **Biobased-ZILs synthesis**

61 ZIL derivatives have been synthesized following the general Scheme 1 starting from the known intermediate
62 **A**, easily obtained in two steps from the commercially available bio-based urocanic acid (resulting from
63 enzymatic deamination of natural L-histidine amino acid).²³
64 First, the iodide derivatives **1-5** were obtained by *N*-alkylation reaction, with yields ranging from 94% to
65 99%, by stirring 2.1 to 3 equivalents of the corresponding alkyl iodide with K₂CO₃ in acetone under reflux
66 for 1 h to 3 days with the ester derivative **A**. In presence of a strong basic resin such as Amberlite IRN78,
67 the **ZIL1** to **ZIL5** were obtained with yields ranging from 85% to 99%. In addition to these excellent yields,
68 no chromatographic purification was necessary to obtain purified ZILs. A detailed experimental procedure
69 is reported in the supporting information together with the full characterization of each product.



Scheme 1 : Biobased ZILs synthesis

70

71

72 Biobased-ZILs properties

73 Taking into consideration the melting point as one of the criteria for being considered as IL, only **ZIL1**
 74 cannot be considered as IL since its melting point is higher than 100 °C (+ 109 °C).

75 All the ZIL derivatives possess a glass transition temperature (T_g) from -5 °C to -36 °C which increased
 76 in the opposite way to the length of the substituted alkyl chain, as already described by Biswas et al.¹⁶ Data
 77 are summarized in Table 1 and compared to [C₂mim][OAc], the IL mainly reported and used for the LCB
 78 pretreatment as a compromise between efficiency and toxicity.²⁴⁻²⁶

79 Thermogravimetric analysis (TGA) under argon atmosphere (Figure 1) of all ZIL derivatives were
 80 performed. The obtained thermograms showed a first mass loss at around 100 °C corresponding to the water
 81 content (values indicated in Table 1) reaching a value close to 16 % for **ZIL1** showing the hygroscopic
 82 behavior of this compound. All biobased ZILs showed thermal stabilities limits of 250 °C to 315 °C, with
 83 little effect of the chain length in contradiction with the work reported by Dinda et al. in 2008.²⁷

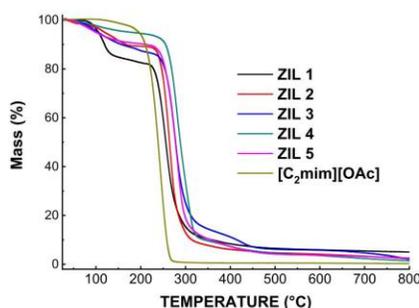
84 These values are very close to the temperature of degradation of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate
 85 [C₂mim][OAc].

86 **Table 1.** Characterization data of the synthesized biobased-ZILs and commercially available [C₂mim][OAc].

Compound	T _g (°C) ^a	T _m (°C) ^a	DTG (°C) ^b	water content (%) ^b
ZIL1	-5	+109	+255	15.8
ZIL2	-23	+97	+264	7.8
ZIL3	-30	-	+276	11.0
ZIL4	-35	+64	+280	9.5
ZIL5	-36	-	+314	5.9
[C ₂ mim][OAc]	-	-	+245	0.3

^aDetermined using DSC under argon atmosphere from 25 to -60 °C then to 200 °C. ^bDetermined using thermogravimetric analysis under argon atmosphere from 50 to 800 °C.

87



88

89 **Figure 1.** TGA of synthesized biobased-ZILs and commercially available [C₂mim][OAc] under argon
90 atmosphere from 50 to 800 °C.

91 Biobased-ZILs cytotoxicity

92 In order to test the toxicity of the ZIL derivatives, we investigated the minimum inhibitory concentration
93 (MIC) of the five ZILs on several microorganism species: (i) two bacteria, the Gram-negative *Escherichia*
94 *coli* and the Gram-positive *Staphylococcus aureus*, (ii) two yeasts, the model ethanologenic *Saccharomyces*
95 *cerevisiae* and the pentose-fermenting *Scheffersomyces stipitis* (formerly *Pichia stipitis*), and (iii) two
96 common molds, *Aspergillus brasiliensis* (formerly *Aspergillus niger*) and *Penicillium chrysogenum* (Table
97 2). The versatile [C₂mim][OAc] IL was taken as a reference.⁸

98 Firstly, the five ZIL derivatives induced different MIC values depending on the length of the alkyl chains.
99 The most biocompatible ZIL was **ZIL2** (ethyl chain) which showed the highest MIC values with all the
100 strains tested, from 200 to 400 µg/mL depending on the microorganisms: molds were the most tolerant to

101 **ZIL2** (MIC 300-400 $\mu\text{g/mL}$) compared to bacteria and yeasts (MIC 200-250 $\mu\text{g/mL}$). **ZIL1** exhibited a
 102 biocompatibility very close to **ZIL2** and the MIC values were identical for both molecules for *E. coli*, *S.*
 103 *aureus* and *S. cerevisiae*; they were slightly lower for *S. stipitis*, *A. brasiliensis* and *P. chrysogenum*. When
 104 increasing the ZIL chain length (**ZIL3** to **ZIL5**), MIC values decreased gradually indicating a greater
 105 toxicity. Bacteria, yeasts and molds were equally sensitive to **ZIL5** with a MIC value equal to 50 $\mu\text{g/mL}$ for
 106 all the microorganisms except for *P. chrysogenum* which showed a MIC of 100 $\mu\text{g/mL}$.
 107 Secondly, the ZIL biocompatibility was much higher than the classical [C₂mim][OAc] IL for all the ZIL
 108 derivatives on all the microorganisms tested. For example on *S. cerevisiae*, the MIC values was 20 $\mu\text{g/mL}$
 109 for [C₂mim][OAc], 250 $\mu\text{g/mL}$ for **ZIL2** and 50 $\mu\text{g/mL}$ for **ZIL5**. The only exception observed was
 110 specifically for the **ZIL5** on *A. brasiliensis* which showed a MIC value of 50 $\mu\text{g/mL}$ whereas the
 111 [C₂mim][OAc] induced a MIC of 150 $\mu\text{g/mL}$. Except this particular condition, all ZILs derivatives were
 112 much more biocompatible than [C₂mim][OAc] until 25 times for **ZIL2** on *S. aureus*.

113 **Table 2.** MIC values in $\mu\text{g/mL}$ on several microorganism species.

Compound	Bacteria		Yeasts		Molds	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. stipitis</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>P. chrysogenum</i>
ZIL1	200	250	250	150	200	350
ZIL2	200	250	250	200	300	400
ZIL3	150	100	200	150	300	350
ZIL4	50	50	100	50	150	250
ZIL5	50	50	50	50	50	100
[C ₂ mim][OAc]	10	10	20	20	150	90

114

115 **Computational study**

116 ILs are frequently described as perturbators of the cytoplasmic membrane integrity in microorganisms,
 117 inducing toxicity problems.²⁸⁻³¹

118 We thus used molecular simulations to study the membranotropic effects of ZILs of different alkyl chain
 119 length, compared to [C₂mim][OAc] IL. We simulated the behavior of a typical *Saccharomyces cerevisiae*
 120 membrane under the influence of these ionic liquids at long timescales (4.5 μs) using the MARTINI coarse-
 121 grained (CG) force field,³² whose performance for the simulation of membranes has been amply
 122 demonstrated (Marrink and Tieleman 2013). Inspired by the MARTINI representations of histidine, glutamic
 123 acid and linear alkyl chains, we designed three CG ZIL models, termed CG0b to CG2b, spanning atomistic
 124 **ZIL1** to **ZIL5**. Due to the degeneracy of the grain-to-atom mapping, each CG model represents more than
 125 one ZIL (Figure 2). [C₂mim][OAc] was similarly constructed, on the basis of CG0b and CG1b but lacking
 126 the connection between beads SC4 and Qa. The models were validated by comparing structural and
 127 thermodynamic properties between matching atomistic and coarse-grained simulations.

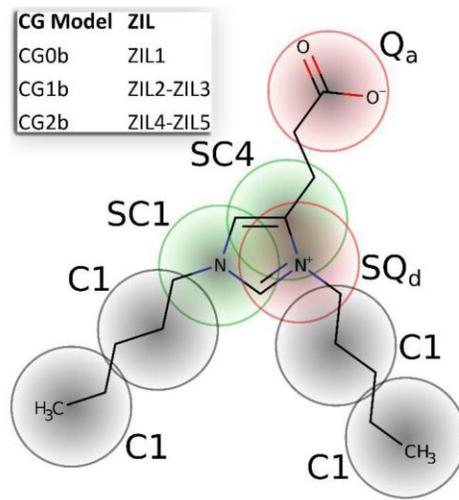
128 The composition of the membrane, taken from Vermass et al.,³³ was chosen to mimic the experimental
129 headgroup compositions of *S. cerevisiae* W303-1A, itself a good compromise between the compositions
130 observed in the different *S. cerevisiae* strains. Each leaflet had a composition ratio of 30:14:12:9:4:1 of
131 phosphatidyl choline (PC), phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl inositol (PI), ergosterol,
132 phosphatidyl serine (PS), and phosphatidic acid (PA) headgroups. The lipid tail composition and number of
133 insaturations reproduced those observed by mass spectrometry and were comparable for all lipids involved:
134 55% palmitoyl-oleyl class (C16:0-18:1), 22% stearyl-linoleyl class (C18:0-C18:2), and 23% dioleyl class
135 (C18:1-C18:1).

136 We first examined the durability of the contacts established between the different ionic liquids and the yeast
137 membrane, and whether the latter's structural integrity was retained. The different CG IL and ZIL models
138 were found to have strikingly different effects on the membrane (Figure 3).

139 **ZIL1** (CG0b) had no effect: as can be seen from the position of the density peak, it tended to remain in
140 solution and only formed transient contacts with the membrane. The density curve reveals that **ZIL2-ZIL3**
141 (CG1b) also preserved the integrity of the membrane but interacted much more durably with it, at times
142 penetrating the polar head group layer. The cation part of [C₂mim][OAc] showed a similar affinity for the
143 membrane; despite slightly more frequent occurrences of ingress inside the head group layer, it preserved
144 the membrane's overall integrity. However, in stark contrast to **ZIL2-ZIL3** where cation and anion are
145 covalently bound, the [OAc] anion became fully dissociated and remained in solution. Finally, **ZIL4-ZIL5**
146 (CG2b) were seen to penetrate much deeper into the membrane, eventually splitting it into several
147 components. The main steps of the membrane degradation mechanism are presented on Figure 4. The ZIL
148 molecules were seen to aggregate (upper left panel), forming a wedge which was driven between individual
149 membrane components (lower panel); the local increase in lipid density which ensued destabilized the
150 membrane *via* repulsions between the dipoles of the lipid headgroups. The effect was amplified by the
151 dipolar nature of the ZILs themselves and their similarity with the membrane components, despite shorter
152 hydrophobic tails. This resulted in the progressive separation of membrane patches (upper right panel) and
153 the eventual breakup of the membrane in a simulation time of under 100 ns, which was roughly equivalent
154 to 0.5 μ s considering the typical MARTINI kinetic speedup compared to all-atom models.³⁴

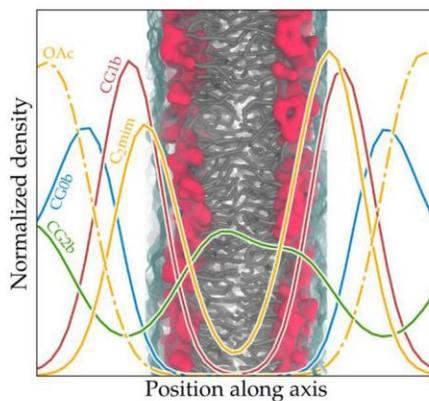
155 The auto-aggregative power of **ZIL4-ZIL5** thus appeared crucial to their membranotropic properties. To
156 confirm the importance of this effect, we simulated the solvated ZIL CG models in the absence of the
157 membrane. At concentrations of 100 g/L in water, the ZIL models showed a propensity to form transient
158 clusters which increased with the length of the alkyl chain. This can clearly be seen on Figure 5, where the
159 probability of finding another ZIL molecule in close contact to a given ZIL molecule is represented as
160 isodensity surfaces. Indeed, at longer alkyl chain lengths (CG2b), the amphiphile and detergent-like
161 character of ZILs becomes sufficient to trigger self-assembly, as observed in the case of lipids. The affinity
162 of the ZILs for themselves thus appears to be the main drive behind the breaking up of membranes by ZIL
163 clusters. This corroborates experimental evidence that IL toxicity increases with chain length due to
164 membrane penetration.^{28, 29, 35, 36}

165 We then compared the effects of [C₂mim][OAc] and CG1b on the yeast membrane in more detail. As
166 explained above, both exhibited similar affinities for the membrane and neither triggered a membrane
167 breakup within the timescales under consideration. This is in agreement with several experimental studies
168 which reported no significant effect on model membranes both for 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride
169 [C₂mim][Cl] ILs with tails shorter than 6 carbon atoms³⁷ and for [C₂mim][OAc].³⁸ However, looking more
170 closely at the time-resolved dynamics of the membranes in our simulations revealed striking differences
171 between CG1b and [C₂mim][OAc]. [C₂mim][OAc] had a profound influence on fundamental dynamical
172 membrane properties such as the distribution of areas per lipids (APL, Figure 6). In the presence of this IL,
173 the distribution of APL over the membrane surface lost its homogeneity and featured locally large APL
174 values, hinting at the formation of transient hole defects. Conversely, CG1b had no major impact on the
175 distribution of APL. There is mounting evidence that such transient defects in membranes could affect
176 biological function,³⁹ which could explain the higher toxicity of [C₂mim][OAc] compared to CG1b observed
177 with the MIC results (Table 2). In particular, these defects could facilitate the penetration of water molecules
178 into the membrane, which has well-known deleterious effects.⁴⁰ The benefits of substituting ILs by ZILs
179 thus appear clearly in our simulation results, in good agreement with experimental evidence shown in Table
180 2. However, it should be kept in mind that yeasts being complex microorganisms, the toxicity of ionic liquids
181 can have many other causes than the destabilization of cell membranes which we simulate here. In particular,
182 the complete dissociation of the [C₂mim][OAc] ion pair observed in our simulations increases the positive
183 charge at the membrane surface and could disrupt the function of membrane transporters powered by
184 transmembrane proton gradients. Some authors have also shown that ILs could interact with the cell wall
185 polysaccharides in yeasts and modify the cell morphology.^{11, 13, 41}
186 Other possible effects include modifications of the global cellular metabolism,³⁸ enhancement of ethanolic
187 fermentation yields^{11, 13} or damage to yeast mitochondrial functions.⁴² Some microorganisms also possess
188 efflux pump systems for toxic products increasing the biocompatibility of ILs.⁴³ More research is needed to
189 fully understand how (Z)ILs are tolerated by cells and some authors have even shown that the cytotoxicity
190 of ILs is highly dependent on the biological system and that the same compound can be very toxic for an
191 organism and without any effect for another.⁴⁴
192
193



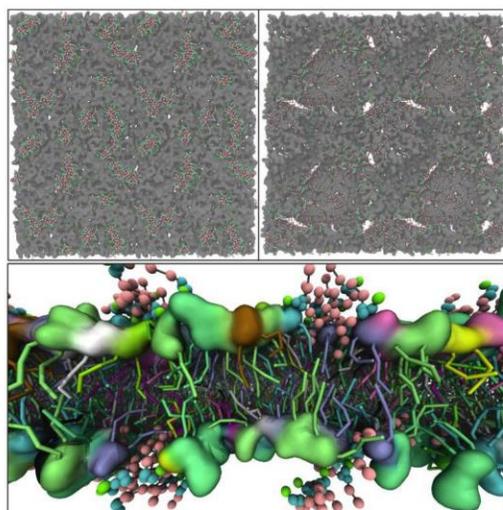
194

195 **Figure 2.** Left: atom-to-bead mapping of the ZILs. The beads are labelled by their MARTINI atom type and
 196 colored according to their chemical character (red, green and black for charged, polar and apolar,
 197 respectively). Inset: equivalence between CG and atomistic ZIL models. CG models are denoted CGnb
 198 where n is the number of C1 beads of the alkyl chains.



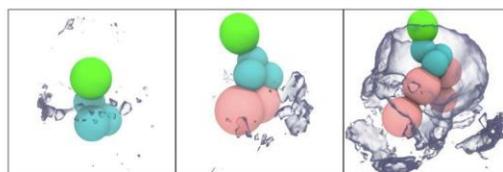
199

200 **Figure 3.** Normalized density of ILs along the membrane normal axis. The position of the membrane is
 201 materialized (grey sticks: hydrophobic tails; red surface: polar heads; blue surface: first hydration layer).



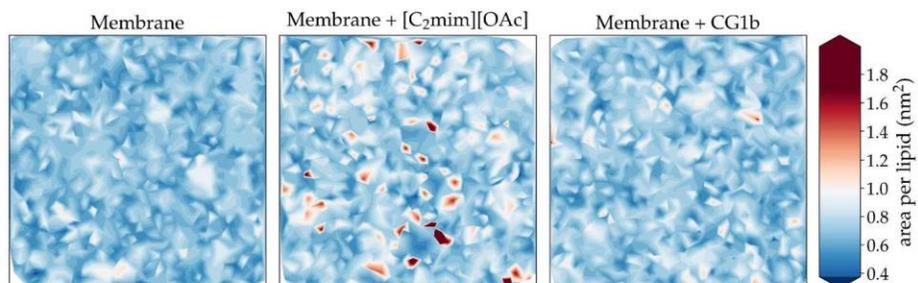
202

203 **Figure 4.** Top: initial events of yeast membrane breakup by the CG2b ZIL model, looking down on the
 204 membrane (gray surface). Snapshots at 10 ns into the simulation (top left), showing the clustering of the
 205 ZILs, and 20 ns (top right), showing the onset of membrane splitting. Bottom: insertion of ZIL alkyl chains
 206 between membrane components, seen from the side (lipids colored by type; surface=polar heads;
 207 rods=hydrophobic tails). In all panels, ZIL beads are colored pink, blue and green for the alkyl, cyclic and
 208 acid parts, respectively.



209

210 **Figure 5.** 70th-percentile isodensity surfaces of ZIL molecules around a ZIL molecule (from left to right:
 211 CG0b, CG1b, CG2b). ZIL beads are colored pink, blue and green for the alkyl, cyclic and acid parts,
 212 respectively.



213

214 **Figure 6.** Top view of the membrane surface, colored by area per lipid values, for representative
215 conformations of the membrane in the absence of IL (left), in the presence of [C₂mim][OAc] (center) or
216 CG1b (right).

217

218 **ZIL pretreatment of lignocellulosic biomasses: enzymatic saccharification and structural properties**

219 Two main strategies are reported in the literature:

220 (i) the simultaneous strategy consisting in *in situ* enzymatic hydrolysis of LCB in diluted-IL aqueous media
221 with an efficiency dependent on a compromise between a better accessibility (IL-biomass interactions) of
222 cellulosic fraction and enzyme deactivation (IL-cellulases interactions) and, (ii) the sequential strategy
223 defining as subsequent separated steps of IL-pretreatment of LCB then enzymatic saccharification.^{12, 45, 46}

224 However, the ILs classically used for these approaches exhibit some drawbacks in term of toxicity, cost and
225 recycling, thereby justifying the design of biosourced alternative non-conventional solvents.

226 Among these new solvents, some would be suitable to improve enzymatic saccharification *via* a
227 simultaneous strategy including an incubation of biomass in these solvents (8h, 120 °C) before adding
228 aqueous buffer and enzymes in one-pot. In this context, we propose for the first time to investigate the
229 potential of our new synthesized ZILs to improve enzymatic saccharification through a sequential strategy.

230 Two lignocellulosic biomasses were rationally selected: *Miscanthus x giganteus* (monocot) as dedicated
231 crops and oak (dicot) sawdust as forestry residues. These two biomasses exhibited similar global chemical
232 composition in term of cellulose and lignin contents.^{5,6} Apart from these quantitative similarities, these two
233 biomasses are distinguished by their respective aromatic lignin content (hydroxyphenyl/guaiacyl/syringyl
234 units ratio) and hemicellulose composition^{47, 48} and can hence be considered as two distinct recalcitrant
235 lignocellulosic matrices. Figure 7 presents the glucose yields obtained after saccharification catalyzed by the
236 cellulases of *T. reesei* before (untreated) and after a short pretreatment with the different ZILs at 110 °C.

237 Enzymatic saccharification of both untreated biomasses led to similar yields of glucose in average of 5.74 g
238 / 100 g of dried matter, confirming the recalcitrant properties of these two samples. Overall, ZIL
239 pretreatments allowed improved the performance of saccharification regardless of the biomass. The length
240 of *N*-alkyl chains from ZIL seems to have an influence on the ability of ZIL to efficiently pretreat the
241 biomasses prior their enzymatic saccharification. Indeed, the glucose yields increased with the increase of
242 *N*-alkyl chain length of ZIL from 1 to 2 carbons and then decreased until 5 carbons. There is an obvious
243 correlation between the alkyl chain length on ZIL derivatives and the performances of saccharification.
244 Indeed, Singh et al. have recently showed that imidazolium cation with lower alkyl chain length like
245 [C₂mim][OAc] can interact with the aromatic rings of lignin moieties *via* π -stacking as well as H-bonding.
246 In opposite, ILs with higher alkyl chain length cannot interact as efficiently with the lignin due to steric
247 hindrance and cause less biomass disorganization.

248 The improvement of saccharification appeared less marked for *Miscanthus x giganteus* than oak sawdust
249 with a maximal yield of glucose of 12.96% obtained after **ZIL2**-pretreatment *versus* 24.92% for oak sawdust

250 (an increase by a factor of 4 in comparison with the untreated sample). These maximal performances
251 obtained with **ZIL2** were then compared with those obtained after [C₂mim][OAc] pretreatment, the reference
252 ionic liquid for biomass pretreatment reported in the literature.^{49, 50} In our experimental conditions,
253 [C₂mim][OAc] was shown more suitable than **ZIL2** to efficiently pretreat *Miscanthus x giganteus* prior to
254 enzymatic saccharification with a glucose yield of $24.53 \pm 0.76\%$. These results could be explained by SEM
255 micrographs of *Miscanthus* before and after ZIL-pretreatment showing no significative disruption of the
256 matrix, in contrast to [C₂mim][OAc]-pretreated sample (see supplementary data, figure S1).

257 On the other hand, the pretreatment of oak sawdust with [C₂mim][OAc] led to efficient saccharification
258 (glucose yield of $27.96 \pm 1.98\%$), similar to that achieved after **ZIL2** pretreatment. Pretreatment by **ZIL2**
259 would be thus a promising eco-alternative to [C₂mim][OAc] for oak sawdust pretreatment.

260 The structural changes induced by ZIL pretreatments were thoroughly studied in order to explain the
261 improvement of saccharification after ZIL-pretreatment. The morphological properties of oak sawdust
262 before and after ZIL-pretreatment were thus investigated by scanning electron microscopy (SEM) and
263 compared to those induced by [C₂mim][OAc] pretreatment. Untreated oak sawdust (Figure 8A) exhibited a
264 complex organization with a highly fibrillar morphology of strongly agglomerated particles. After ZIL-
265 pretreatment (Figure 8C-G), the local organization of lignocellulosic matrix was altered leading to more
266 expanded materials with individualized fibers. These modifications suggested a better accessibility of
267 cellulosic fraction for enzymes according to the improvement of saccharification performances. Similar
268 changes of lignocellulosic matrix were observed with [C₂mim][OAc] pretreatment (Figure 8B) as previously
269 reported in the literature.⁶

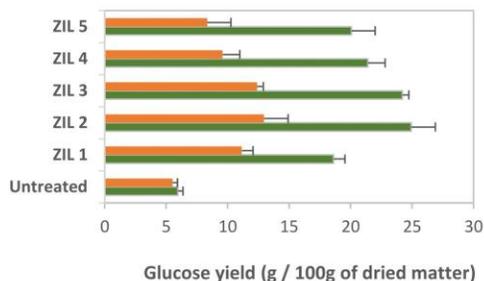
270 Impacts on structural properties of oak sawdust were also investigated by X-ray diffraction and
271 thermogravimetric analyses before and after **ZIL2**-pretreatment and then compared to those obtained after
272 [C₂mim][OAc] pretreatment.

273 The X-ray diffractogram of untreated sawdust showed a main broad peak at 22° (2θ) and two broad humps
274 centered at $\sim 16^\circ$ (2θ) and 35° (2θ) (Figure 9). This profile was characteristic of cellulose I which is a
275 composite mixture of two distinct crystalline forms, cellulose I α (triclinic) and cellulose I β (monoclinic) in
276 agreement with literature data.⁵¹ From these data, the crystallinity index of untreated sawdust was estimated
277 at 51%.

278 In the case of **ZIL2**-pretreated sawdust, the crystallinity index was 46% and no shift was observed suggesting
279 few impacts of ZIL on the supramolecular structure of the cellulosic fraction. Conversely, [C₂mim][OAc]
280 pretreatment visibly modify the crystallographic structure of oak sawdust. Indeed, [C₂mim][OAc]
281 pretreatment resulted in the broadening of the main peak, its shift to lower angle ($\sim 20^\circ$) and the
282 disappearance of $\sim 16^\circ$ peak. The shift in the main peak to lower values of 2θ could indicate a transition from
283 cellulose I to cellulose II or an increase in the spacing between the stacked sheets of cellulose molecules.
284 The decrease of $\sim 35^\circ$ peak intensity could be due to the partial disruption of the microfibril alignment of the
285 cellulose chains and/or a possible depolymerization. Finally, the crystallinity index decreased from 51 to
286 33%.

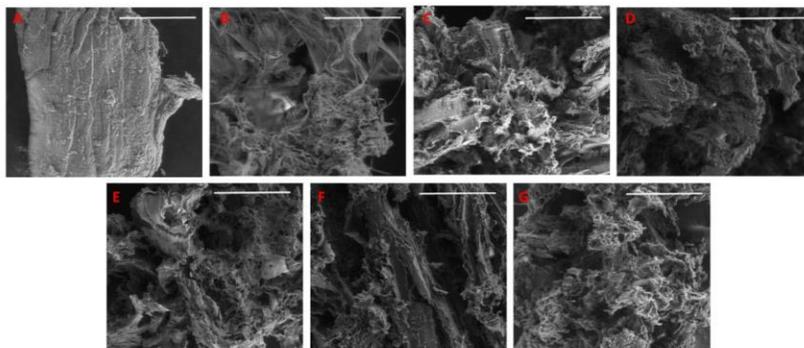
287 The TGA of the untreated- and pretreated-oak sawdust (Figure 10) showed a first mass loss at around 100
 288 °C corresponding to the evaporation of absorbed bond water in the samples and, in agreement with the
 289 literature, the thermal decomposition of the sawdust between 200 and 400 °C.⁵² Two pseudo-peaks,
 290 hemicellulose and cellulose, were present in the differential thermal analysis and their corresponding T_{max1}
 291 and T_{max2} are listed in the Table 3. As demonstrated by Zhang et al.⁵³ the increase of the T_{max2} peak of the
 292 pretreated-oak sawdust with the **ZIL2** is due to the removal of minerals which leads to an enhanced thermal
 293 stability. In the case of the [C₂mim][OAc]-pretreated oak sawdust sample, we observed a decrease of the
 294 T_{max2} . Indeed, XRD data showed the formation of cellulose II which involved a severe degradation of the
 295 biomass components as already mentioned by Zhang et al.⁵³
 296 **ZIL2**-pretreatment would both preserve the supramolecular structure of cellulosic biomass and avoid
 297 undesirable partial depolymerization of cellulose while improving its accessibility to cellulases. **ZIL2** was
 298 thus demonstrated to be more suitable than [C₂mim][OAc] to implement eco-friendly pretreatment in
 299 preserving structural integrity of cellulosic polymer. We suggested also that the disruption mechanism of
 300 lignocellulosic matrix induced by **ZIL2** would be thus distinct than those of [C₂mim][OAc].

301
 302



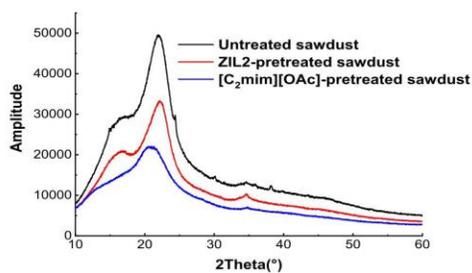
303

304 **Figure 7.** Glucose yields (g / 100 g of dried matter) obtained after enzymatic saccharification of *Miscanthus*
 305 *x giganteus* (orange) and oak sawdust (green) before and after pretreatment with the different ZILs.



306

307 **Figure 8.** SEM micrographs of untreated oak sawdust (A); [C₂mim][OAc]-pretreated oak sawdust (B);
 308 pretreated oak sawdust with **ZIL1** (C); **ZIL2** (D); **ZIL3** (E); **ZIL4** (F) and **ZIL5** (G); (scale = 50µm)



309

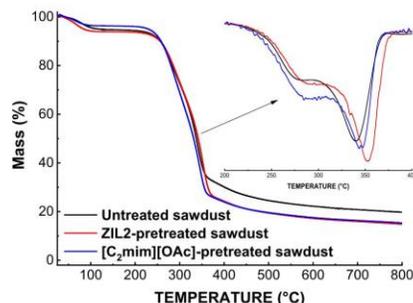
310 **Figure 9.** X-ray diffractogram of untreated oak sawdust (black), **ZIL2**-pretreated oak sawdust (red) and
 311 [C₂mim][OAc]-pretreated oak sawdust (blue) for 40 min at 110 °C.

312 **Table 3.** T_{max1} and T_{max2} peaks' position of untreated oak sawdust, **ZIL2**-pretreated oak sawdust and
 313 [C₂mim][OAc]-pretreated oak sawdust for 40 min at 110 °C.

Compound	T _{max1} (°C) ^a	T _{max2} (°C) ^a	water content ^a
Untreated oak sawdust	293	344	5.0%
ZIL2-pretreated oak sawdust	296	351	6.2%
[C ₂ mim][OAc] pretreated oak sawdust	281	339	3.8%

^adetermined using thermogravimetric analysis under nitrogen atmosphere from 50 to 800°C.

314



315

316 **Figure 10.** TGA analysis of untreated oak sawdust (black), **ZIL2**-pretreated oak sawdust (red) and
 317 [C₂mim][OAc]-pretreated oak sawdust (blue) for 40 min at 110 °C. Inset: derivatives of untreated
 318 oak sawdust (black), **ZIL2**-pretreated oak sawdust (red) and [C₂mim][OAc]-pretreated oak sawdust
 319 (blue) for 40 min at 110 °C.

320

321 **Biocompatibility of ZILs at different concentration for ethanol production.**

322 **ZIL2** was the ZIL derivatives giving the better results of enzymatic hydrolysis after LCB
 323 pretreatment. We then searched if the potentially residual quantity of **ZIL2** remaining entrapped in
 324 the pretreated biomass could have a toxic effect on the downstream process such as yeast ethanolic
 325 fermentation or cellular production of any other compound of interest, as was observed with the
 326 classical [C₂mim][OAc] IL.¹⁻³ Indeed, we tried to determine if low **ZIL2** concentrations could
 327 influence the *S. cerevisiae* fermentation and the ethanolic production. For that purpose, we
 328 inoculated *S. cerevisiae* yeast cells in a YMD growth medium (glucose 20 g/L, yeast extract 3 g/L,
 329 malt extract 3 g/L and peptone 3 g/L, pH = 4.8) eventually supplemented with different **ZIL2** or
 330 [C₂mim][OAc] concentrations. The growth was monitored by measurement of the Optical Density
 331 at 600 nm (OD₆₀₀) (Figure 11) and the quantification of the ethanol produced by HPLC analysis
 332 (Table 4). The results in Figure 11 showed that the growth of *S. cerevisiae* was undisturbed by the
 333 presence of **ZIL2** up to concentrations of 10% (w/w) with exponential and stationary growth phases
 334 identical in term of duration and OD₆₀₀ values, whereas the reference [C₂mim][OAc] induced
 335 toxicity at a concentration as low as 0.5% (w/w) with a maximal OD₆₀₀ value 3 times lower than in
 336 the YMD growth medium and no growth anymore at a concentration of 2% (w/w).

337 Ethanol production by *S. cerevisiae* was quantified by HPLC and the maximum ethanol
 338 yields are presented in Table 4. In these experiments, the only ethanologenic nutrient was the

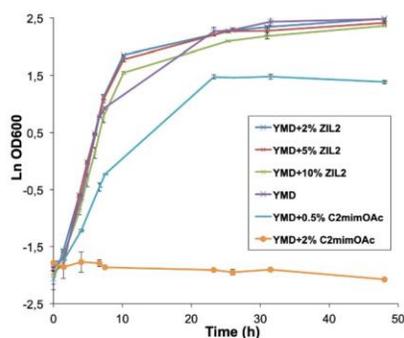
339 glucose contained in the YMD medium.¹¹ The highest ethanol yield was obtained when *S. cerevisiae*
 340 was grown in the YMD medium without any supplementation (84.2%). The addition of **ZIL2** at
 341 2% had no effect on the ethanolic production (83.7%), while at 5 and 10 % a progressive decrease
 342 could be observed (80.9 and 69.1%, respectively). However, when [C₂mim][OAc] was added to the
 343 YMD medium, the ethanol yields drastically fell from 81.5% with 0.5% [C₂mim][OAc] down to
 344 zero with 2% IL.
 345

346 **Table 4.** Maximum ethanol yields of *S. cerevisiae* grown in different culture conditions.

Growth Medium	Maximum ethanol yields (%)
YMD	84.2 ± 1.6
YMD + 2% ZIL2	83.7 ± 0.6
YMD + 5% ZIL2	80.9 ± 0.6
YMD + 10% ZIL2	69.1 ± 0.6
YMD + 0.5% [C ₂ mim][OAc]	81.5 ± 4.1
YMD + 2% [C ₂ mim][OAc]	N.D.

ND: No ethanol detected

347



348

349 **Figure 11.** Growth of *S. cerevisiae* in YMD medium supplemented with different concentrations
 350 of **ZIL2** or [C₂mim][OAc].

351 **Experimental**

352 **Chemicals, bacteria, yeasts, molds and enzymes**

353 All purchased materials were used without further purification. Mineral acids and bases were used
354 in their highest concentration commercially available, from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
355 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([C₂mim][OAc], > 98%) was purchased from Solvionic SA
356 (Verniolle, France). The microorganism strains used in this study were the bacteria *Escherichia coli*
357 ATCC 10536 and *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CIP 53.154, the yeasts *Saccharomyces*
358 *cerevisiae* Type II from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and *Scherffersomyces stipitis* CLIB
359 187 (formerly *Pichia stipitis*) from the Institut Pasteur collection, and the molds *Aspergillus*
360 *brasiliensis* ATCC 16404 (formerly *Aspergillus niger*) and *Penicillium chrysogenum* ATCC 10106.
361 Bacteria were cultured at 37 °C in Luria Bertani (LB) broth (peptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L,
362 NaCl 5 g/L, pH 7.2), yeasts at 30 °C in Yeast-Malt-Dextrose (YMD) medium (glucose 20 g/L, yeast
363 extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 3 g/L, pH 4.8) and molds at 25 °C in RPMI-1640 Medium
364 with L-glutamine and without sodium bicarbonate (from Sigma-Aldrich) in MOPS buffer (pH 7.0).
365 Cellulases from *Trichoderma reesei* were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and
366 present a specific activity of 5 IU/mg; one unit liberates 1.0 μmole of glucose from cellulose in one
367 hour at pH 5.0 at 37 °C (2 h of incubation).
368 *Miscanthus x giganteus* was provided by UMR FARE (UMR 614 INRA URCA, Reims, France).
369 Industrial sawdust of oak (*Quercus petra*) was provided by the forest industry SARL Husson Paul
370 (Bathélemont, Lorraine, France). Raw biomasses were freeze-dried and then milled with planetary ball
371 mill (Retsch PM400) during 20 min at 300 rpm (particle sizes inferior to 255 μm).

372 **Instruments**

373 ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at 400 and 100 MHz using a
374 Bruker DRX-400 spectrometer and at 300 and 75 MHz using a Bruker DRX-300 spectrometer.
375 Chemical shifts are reported in parts per million relative to a residual solvent peak for CDCl₃ (¹H:
376 δ=7.26 ppm, ¹³C: δ=77.16 ppm), DMSO-d₆ (¹H: δ=2.50 ppm, ¹³C: δ=39.52 ppm) and MeOD-d₄ (¹H:
377 δ=3.31 ppm, ¹³C: δ=49.00 ppm). Peak multiplicity is reported as: singlet (s), doublet (d), triplet (t),
378 multiplet (m) and doublet of doublet (dd). High-resolution mass spectra HRMS were obtained by
379 electrospray ionization (ESI) using a Micromass-Waters Q-TOF Ultima Global instrument. The
380 morphology of untreated/pretreated biomass samples was investigated by scanning electron
381 microscopy (SEM). The method consisted of observation in low vacuum mode (under partial
382 vacuum pressure of water) without any sample preparation step. The microscope was an

383 environmental high-resolution electron scanning microscope Quanta 200 FEG (FEI Co., USA) with
384 a LF (Large Field) detector. The conditions of observation were the following: acceleration voltage
385 between of 2 kV, work distance between 5 and 9 ppm and pressure between 0.5 and 2 mbar. Infrared
386 spectra were obtained by using a Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometer (IRaffinity-1S,
387 Shimadzu) and ATR method with a germanium prism (MIRacle 10, Shimadzu). X-Ray Powder
388 Diffraction patterns (XRPD) were acquired using a Bruker D4 Endeavor diffractometer equipped
389 with a Cu anti-cathode (K α radiation, operating at 40 kV–40 mA). Patterns were collected in the 2 θ
390 range of 10–60° with a step size of 0.03° and using a low background silicon holder (Bruker AXS,
391 C79298A3244B261). Crystallinity index (CrI) were calculated from the XDR diffractograms using
392 the amorphous subtraction region method. TGA was recorded on a Netzsch STA 449C Jupiter
393 thermal analyser instrument equipped with a differential analysis microbalance coupled with a QMS
394 403 Aëolos mass spectrometer with a stainless steel capillary and a Secondary Electron Multiplier
395 (SEV) detector (Channeltron). The counting time for the mass spectrometer was 20 ms per (m/z)
396 value (scanning width: m/z = 10-150 amu) with a resting time of 1 s. All the ionic derivatives were
397 stored at room temperature in closed vials before analysis. The samples (approximately 20 mg of
398 each compound) were heated in an alumina crucible under argon, by equilibrating at 25 °C, and
399 following a ramp at 5 K/min up to 800 °C and an isotherm under air atmosphere for 30 minutes
400 (Flow rate: 50mL/min). Melting points were carried out by differential scanning calorimetry on a
401 DSC 204F1 supplied by NETZSCH-Gerätebau GmbH, Germany. All tests were performed at a
402 heating rate of 10K min⁻¹, between -60 to 200 °C in argon atmosphere (50 mL min⁻¹) using about
403 10 mg of sample. Liquid chromatography high performance Dionex Ultimate 3000 (Thermo
404 scientific, Sunnyvale, CA, USA) consisting of an automatic sample changer, a pump and a detector
405 type refractometer (RefractoMax 520), the column was a HyperRez XP Carbohydrate H+ (300 x
406 7.7 mm) equipped with a pre-column, kept at 75 °C. The isocratic mode is used, with ultra-pure
407 water as mobile phase; flow rate was 0.6 ml/min. The retention time of glucose was 11.63 min and
408 xylose was 13.81 min. Quantification was based on calibration curves established using standard
409 glucose and xylose.

410 All molecular dynamics simulations and analyses thereof were performed using GROMACS.⁵⁴ All
411 molecular graphics were generated using VMD.⁵⁵ All plots were designed with Matplotlib.⁵⁶

412

413 **Yeast fermentation**

414 For the yeast growth experiments and the ethanolic fermentation of *S. cerevisiae*, cultures were
415 realized in Erlenmeyer shake flasks in YMD medium eventually supplemented with ZIL2 at 2%,
416 5% or 10%, or [C₂mim][OAc] at 0.5% or 2% (all the percentages are w/w). The inoculum was a

417 mid-log phase preculture. The yeast growth was followed by Optical Density at 600 nm (OD₆₀₀).
418 The ethanol concentration was quantified by high performance liquid chromatography. The ethanol
419 yields were calculated as :

$$420 \quad Y_{\text{EtOH}} = (\text{concentration}_{\text{Ethanol}} \text{ (g/L)} / (\text{concentration}_{\text{Glucose}} \text{ (g/L)} \times 0.511)) \times 100$$

421 where 0.511 represents the theoretical yield of ethanol from glucose.

422

423 **Minimum inhibitory concentration (MIC) experiments**

424 For the minimum inhibitory concentration (MIC) experiments, ZIL derivatives or [C₂mim][OAc]
425 were dissolved at 450 µg/mL in growth liquid media (LB for bacteria, YMD for yeasts and RPMI-
426 1640 for molds), filter sterilized and serially diluted in sterile growth media. Each test tubes was
427 inoculated by cell suspensions (bacteria, yeasts or mold spores) with an OD₆₀₀ adjusted to 0.125
428 and incubated in a rotary shaker during 24 h for bacteria and yeasts or 72 h for molds under each
429 optimal temperature conditions. The cell growth was then measured by OD₆₀₀. The MIC was defined
430 as the lowest concentration of compound which prevented the visible growth of microorganisms,⁵⁷
431 *i.e.* that showed no increase in OD₆₀₀. Each experiment was realized twice.

432

433 **[C₂mim][OAc] and ZILs pretreatments**

434 Lignocellulosic biomasses (LCBs) were submitted to pretreatments adapted from standard
435 procedures reported in our previous studies.^{5, 6, 48} LCB (2% w/v) was added to 1 mL of
436 [C₂mim][OAc] or ZILs, and incubated in an oil bath at 110 °C with vigorous stirring for 40 min.
437 After incubation, the LCB was precipitated by adding ultrapure water (2:1 v/v water/IL) to the
438 mixture with vigorous stirring for 30 min in ice bath to increase the polarity of the medium. The
439 resulting suspension was subsequently centrifuged (10.1733 g) (Allegra® 64R Beckman Coulter,
440 Indianapolis, United States) at 20°C for 20 min. This step was repeated 6 times until amber-colored
441 suspension became clear with conductivity lower than 200 µS/cm. This extensive washing step
442 ensured minimization of residual [C₂mim][OAc] or ZILs to prevent potential deleterious effect on
443 enzymatic hydrolysis.⁸ The resulting insoluble substrate was then freeze-dried at room temperature
444 for 24 h and collected for subsequent enzymatic hydrolysis.

445

446 **Enzymatic saccharification**

447 Cellulase-catalyzed hydrolysis were adapted from standard procedures described in our previous
448 studies.^{5, 8, 48} Freeze-dried untreated or pretreated LCBs were pre-incubated at 40 °C in 900 µL of
449 acetate buffer (50 mM, pH 4.8) in Eppendorf tubes. After this pre-incubation step, reactions were

450 started by adding cellulase mixtures from *T. reesei*. The final concentration of cellulase was
451 1 mg/mL (250 IU/g of substrate). The final volume of reaction medium was 1 mL. Reactions were
452 carried out at 40 °C and stirred at 1000 rpm (Eppendorf Thermomixer 5436). After 48 h, reactions
453 were stopped by incubation for 20 min at 90 °C to deactivate enzymes. Controls with
454 buffer/substrate and with buffer/substrate/thermally inactivated enzymes (90 °C, 20 min) were also
455 performed.

456 Supernatants of hydrolysates were recovered by centrifugation (6000g, 15 min), diluted in ultra-
457 pure water and filtered (0.2 µm) prior to HPAEC analyses. Each reaction was repeated 3 times. No
458 sugars production was detected in the absence of native enzymes.

459

460 **Glucose analysis**

461 Glucose concentrations in supernatants was determined by HPAEC using an analytical CarboPac
462 PA-20 (150 ×3 mm) column equipped with a guard column (30 ×3 mm) (DIONEX, Thermo Fisher
463 Scientific, Massachusetts, United States) and kept at 25°C. Elution was carried out at a flow rate of
464 0.5 mL/min with a gradient method using sodium hydroxide and sodium acetate as eluent, as
465 described recently.⁸ The injection volume was 10 µL. Quantification was based on calibration curve
466 using standard glucose solutions (0–0.1 g/L). The retention times of glucose, 11.50 min. The yields
467 of the substrate conversion into glucose were expressed as mean values with standard deviations
468 (±) in g per 100 g of dry matter.

469

470 **Synthesis of ZIL derivatives**

471 **General procedure for synthesis of iodide derivatives**

472 To a solution of derivative **A** in acetone was added potassium carbonate (2 equivalents) and alkyl
473 iodide (2.1 to 4 equivalents) and the mixture was stirred for 1h to 3 days at 70°C. After cooling at
474 room temperature, the solvent was eliminated under vacuum and dichloromethane was added to the
475 reaction mixture. After filtration and elimination of the solvent under vacuum, pure compounds 1-
476 5 were obtained.

477 **General procedure for saponification**

478 To a solution of derivatives 1-5 in MeOH was added Amberlite IRN78 OH resin in a 1/6 ratio. The
479 reaction was monitored by Mass Spectrometry (MS) with Electrospray Ionization (ESI). The
480 reaction was stopped after total disappearance of the I⁻ anion in the reaction media with MS(ESI)
481 in negative mode. After stirring for 30 min at 40°C, the solution was filtered and the solvent was
482 eliminated under vacuum to afford pure ZIL 1-5.

483

484 **Computational study**

485 **Parameterization of the ZIL coarse-grained models**

486 Atomic charges for the all-atom model of **ZIL4** were obtained using the RESP approach inside
487 Antechamber.⁵⁸ Other forcefield parameters were gleaned from the GAFF forcefield.⁵⁹ **ZIL4** was
488 placed in a cubic box (34 Å per side) and solvated with 798 TIP3P water molecules. The system
489 was minimized to convergence, heated up to 300 K within 100 ps at constant volume with the ZIL4
490 atoms restrained (500 kJ mol⁻¹ nm⁻¹), then for 100 ps at constant pressure. The restraints were
491 progressively released over 1 ns. The velocity-rescaling thermostat time constant was raised from
492 0.2 ps⁻¹ in the previous simulations to 2 ps⁻¹, and the Berendsen barostat (0.2 ps⁻¹) was switched to
493 Parrinello-Rahman (10 ps⁻¹). The system was then simulated for a 50 ns production run. All
494 simulations used periodic boundary conditions, particle-mesh Ewald electrostatics, and 1 nm
495 Coulomb and Van der Waals cutoffs. The time-dependent position of the atoms in the production
496 simulation were used to obtain reference distributions of all possible bonds, angles and dihedral
497 angles between the CG1b MARTINI beads. The parameters of the MARTINI model were adjusted
498 so that the distributions obtained during a 50 ns coarse-grained simulation would match these
499 reference distributions as closely as possible. This process yielded the CG1b model; the CG0b and
500 CG2b models were generated by removing or adding a C1 MARTINI bead, with additional bond
501 and angle parameters (in the case of CG2b) derived from the equivalent alkyl chain as already
502 parameterized in MARTINI.

503 **Coarse-grained system setup and simulation.**

504 The membrane was assembled from its individual lipid components, whose topologies are available
505 in the MARTINI 2 forcefield,³³ using CHARMM-GUI.⁶⁰ It was subsequently energy-minimized to
506 convergence. Several phases of constant temperature (velocity-rescaling thermostat, 300 K, 1.0 ps⁻¹)
507 and pressure (Berendsen barostat, 1 bar, 5.0 ps⁻¹) equilibration simulations with restrained lipid
508 heads were successively performed: respectively 500k, 200k, 100k, 50k and 50k steps of 2fs, 5fs,
509 10fs, 15fs and 20 fs with restraints of 200, 100, 50, 20 and 10 kJ mol⁻¹ nm⁻¹. The production
510 simulations used a timestep of 20 fs, no restraints on any particle, a Parrinello-Rahman barostat
511 with a 12 ps⁻¹ time constant. The ZILs were introduced into the equilibrated system by randomly
512 replacing a number of water grains, performing 100 steps of steepest-descent minimization and
513 200k 10-fs steps of equilibration. The equilibrated simulation boxes had an approximate size of
514 20x20x8 nm; their molecular compositions are given in the table below. In all simulations, the
515 membrane, ZIL and water used separate couplings to the heat bath; similarly, the membrane normal
516 axis was coupled to the pressure bath independently from the other two axes. The electrostatic
517 interactions employed a reaction-field scheme (cutoff 1.1 nm, relative dielectric constant 15) while

518 the Van der Waals interactions were computed using a potential-shift Verlet scheme (cutoff 1.1
519 nm). The simulations of the ZILs solvated in water employed similar simulation parameters, but the
520 equilibration phase was reduced to 500k steps of 10 fs without restraints.

521 **Conclusions**

522 The ZILs derivatives were obtained in few steps with excellent overall yields without
523 chromatography purification. These new biobased ZILs have shown very high biocompatibility
524 towards several types of microorganisms: bacteria (unicellular prokaryotic cells), yeasts (eukaryotic
525 unicellular cells) and molds (eukaryotic pluricellular cells), **ZIL2** being the best tolerated by all the
526 microorganisms. This was confirmed by our simulations as far as membranotropic effects in yeasts
527 are concerned which shown that **ZIL2** preserved the cytoplasmic membrane integrity. Neither
528 exchange nor dissociation can occur during the process due to the intrinsic ZIL structure, which
529 could result in different toxicity-related mechanisms in ZIL and imidazolium-IL derivatives. The
530 fact that the cation and anion remain on the same skeleton would be thus an advantage compared
531 to the classical imidazolium-IL as the zwitterionic nature of ZILs suppress the hydrophobic
532 interaction between the imidazolium *N*-alkyl chains and the phospholipids.¹⁴

533 Finally biobased imidazolium-ZIL was demonstrated as an excellent eco-alternative to petroleum-
534 based imidazolium ionic liquids for efficient pretreatment of hardwood prior to enzymatic
535 saccharification

536 Structural and morphological properties of ZIL-pretreated LCB suggested a different molecular
537 mechanism during the pretreatment compared to [C₂mim][OAc]. ZIL-pretreatment preserved supra
538 molecular structure of cellulosic fraction in LCB while increasing its accessibility and digestibility
539 to enzymes. Moreover, low ZIL concentration had no negative effect neither on *S. cerevisiae* growth
540 nor on ethanol production. Imidazolium based-ZILs constitutes thus promising alternative to ILs
541 for the development of sustainable biorefinery processes.

542 **Conflicts of interest**

543 “There are no conflicts to declare”.

544

545

546 **Acknowledgements**

547 ANVN thanks the ministère de l'enseignement et de la recherche for financial support. The
548 calculations presented herein were performed using HPC resources from the MatriCS computing
549 platform of Université de Picardie - Jules Verne, Amiens, France.

550 **Notes and references**

- 551 1 K. M. Docherty and J. C. F. Kulpa, *Green Chem.*, 2005, **7**, 185-189.
- 552 2 M. Ouellet, S. Datta, D. C. Dibble, P. R. Tamrakar, P. I. Benke, C. Li, S. Singh, K. L. Sale, P. D.
553 Adams, J. D. Keasling, B. A. Simmons, B. M. Holmes and A. Mukhopadhyay, *Green Chem.*, 2011,
554 **13**, 2743-2749.
- 555 3 I. R. Sitepu, S. Shi, B. A. Simmons, S. W. Singer, K. Boundy-Mills and C. W. Simmons, *FEMS*
556 *Yeast Res.*, 2014, **14**, 1286-1294.
- 557 4 E. Husson, S. Buchoux, C. Avondo, D. Cailleu, K. Djellab, I. Gosselin, O. Wattraint and C. Sarazin,
558 *Bioresource Technol.*, 2010, **102**, 7335-7342.
- 559 5 T. Auxenfans, S. Buchoux, E. Husson and C. Sarazin, *Biomass Bioenerg.*, 2014, **62**, 82-92.
- 560 6 T. Auxenfans, S. Buchoux, D. Larcher, G. Husson, E. Husson and C. Sarazin, *Energ. Convers.*
561 *Manage.*, 2014, **88**, 1094-1103.
- 562 7 E. Husson, C. Hadad, G. Huet, S. Laclef, D. Lesur, V. Lambertyn, A. Jamali, S. Gottis, C. Sarazin
563 and A. Nguyen Van Nhien, *Green Chem.*, 2017, **19**, 4122-4131.
- 564 8 M. Araya-Farias, E. Husson, J. Saavedra-Torrico, D. Gérard, R. Roulard, I. Gosselin, H.
565 Rakotoarivonina, V. Lambertyn, C. Rémond and C. Sarazin, *Front. Chem.*, 2019, **7**, 585-585.
- 566 9 A. Romero, A. Santos, J. Tojo and A. Rodríguez, *J. Hazard. Mater.*, 2008, **151**, 268-273.
- 567 10 T. Auxenfans, S. Buchoux, K. Djellab, C. Avondo, E. Husson and C. Sarazin, *Carbohydr. Polym.*,
568 2012, **90**, 805-813.
- 569 11 N. Mehmood, E. Husson, C. Jacquard, S. Wewetzer, J. Büchs, C. Sarazin and I. Gosselin,
570 *Biotechnol. Biofuels*, 2015, **8**, 17.
- 571 12 T. Auxenfans, E. Husson and C. Sarazin, *Biochem. Eng. J.*, 2017, **117**, 77-86.
- 572 13 N. Mehmood, R. Alayoubi, E. Husson, C. Jacquard, J. Büchs, C. Sarazin and I. Gosselin, *Int. J.*
573 *Mol. Sci.*, 2018, **19**, 887.
- 574 14 K. Kuroda, H. Satria, K. Miyamura, Y. Tsuge, K. Ninomiya and K. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.*,
575 2017, **139**, 16052-16055.
- 576 15 Z. Fei, D. Zhao, T. J. Geldbach, R. Scopelliti and P. J. Dyson, *Chem. – Eur. J.*, 2004, **10**, 4886-
577 4893.

578 16 Y. Biswas, P. Ghosh and T. K. Mandal, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 13322-13335.
579 17 A. Ferry, K. Schaepe, P. Tegeder, C. Richter, K. M. Chepiga, B. J. Ravoo and F. Glorius, *ACS*
580 *Catal.*, 2015, **5**, 5414-5420.
581 18 S. Mahato, R. Chatterjee, N. Chakraborty Ghosal and A. Majee, *Synthetic Commun.*, 2017, **47**,
582 1905-1915.
583 19 I. Grössereid, K. C. Lethesh, V. Venkatraman and A. Fiksdahl, *J. Mol. Liq.*, 2019, **292**, 111353.
584 20 S. Suzuki, Y. Takeoka, M. Rikukawa and M. Yoshizawa-Fujita, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 14623-14632.
585 21 H. Satria, K. Kuroda, T. Endo, K. Takada, K. Ninomiya and K. Takahashi, *ACS Sustain. Chem.*
586 *Eng.*, 2017, **5**, 708-713.
587 22 S. Khademi, D. Zhang, S. M. Swanson, A. Wartenberg, K. Witte and E. F. Meyer, *Acta Cryst. D*,
588 2002, **58**, 660-667.
589 23 R. K. Dubey, N. Kumar and R. Jain, *Synthetic Commun.*, 2012, **42**, 2207-2216.
590 24 D. Fu and G. Mazza, *Bioresource Technol.*, 2011, **102**, 8003-8010.
591 25 N. Sun, H. Rodríguez, M. Rahman and R. D. Rogers, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 1405-1421.
592 26 S. K. Karatzos, L. A. Edye and W. O. S. Doherty, *Biotechnol. Biofuels*, 2012, **5**, 62-62.
593 27 E. Dinda, S. Si, A. Kotal and T. K. Mandal, *Chem. – Eur. J.*, 2008, **14**, 5528-5537.
594 28 S. P. Ventura, C. S. Marques, A. A. Rosatella, C. A. Afonso, F. Gonçalves and J. A. Coutinho,
595 *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2012, **76**, 162-8.
596 29 A. G. Santos, B. D. Ribeiro, D. S. Alviano and M. A. Z. Coelho, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 37157-37163.
597 30 B. Jing, N. Lan, J. Qiu and Y. Zhu, *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**, 2781-2789.
598 31 K. Cook, K. Tarnawsky, A. J. Swinton, D. D. Yang, A. S. Senetra, G. A. Caputo, B. R. Carone, T.
599 D. Vaden, *Biomolecules*, 2019, **9**, 251.
600 32 D. H. De Jong, G. Singh, W. F. D. Bennett, C. Arnarez, T. A. Wassenaar, L. V. Schäfer, X. Periole,
601 D. P. Tieleman and S. J. Marrink, *J. Chem. Theory Comput.*, 2013, **9**, 687-697.
602 33 J. V. Vermaas, G. T. Beckham and M. F. Crowley, *J. Phys. Chem. B*, 2017, **121**, 11311-11324.
603 34 S. J. Marrink and D. P. Tieleman, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6801-6822.
604 35 T.P.T. Pham, C.-W. Cho and Y.-S. Yun, *Water Res.*, 2010, **44**, 352-372.
605 36 G. Quijano, A. Couvert, A. Amrane, G. Darracq, C. Couriol, P. Le Cloirec, L. Paquin and D. Carrie,
606 *Chem. Eng. J.*, 2011, **174**, 27-32.
607 37 C. M. N. Mendonça, D. T. Balogh, S. C. Barbosa, T. E. Sintra, S. P. M. Ventura, L. F. G. Martins,
608 P. Morgado, E. J. M. Filipe, J. A. P. Coutinho, O. N. Oliveira and A. Barros-Timmons, *Phys. Chem.*
609 *Chem. Phys.*, 2018, **20**, 29764-29777.
610 38 S.-K. Ruokonen, C. Sanwald, A. Robciuc, S. Hietala, A. H. Rantamäki, J. Witos, A. W. T. King,
611 M. Lämmerhofer and S. K. Wiedmer, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 2669-2680.

612 39 W. F. D. Bennett and D. P. Tieleman, *Accounts Chem. Res.*, 2014, **47**, 2244-2251.
613 40 R. Zappacosta, M. Semeraro, M. Baroncini, S. Silvi, M. Aschi, A. Credi and A. Fontana, *Small*,
614 2010, **6**, 952-959.
615 41 L.-P. Liu, M.-H. Zong, R. J. Linhardt, W.-Y. Lou, N. Li, C. Huang and H. Wu, *Biotechnol. Biofuels*,
616 2016, **9**, 266.
617 42 Q. Dickinson, S. Bottoms, L. Hinchman, S. McIlwain, S. Li, C. L. Myers, C. Boone, J. J. Coon, A.
618 Hebert, T. K. Sato, R. Landick and J. S. Piotrowski, *Microb. Cell Fact.*, 2016, **15**, 17.
619 43 C. Yu, B. A. Simmons, S. W. Singer, M. P. Thelen and J. S. VanderGheynst, *Appl. Microbiol.*
620 *Biotechnol.*, 2016, **100**, 10237–10249.
621 44 K. S. Egorova and V. P. Ananikov, *ChemSusChem.*, 2014, **7**, 336-360.
622 45 S. Bose, D. W. Armstrong and J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 8221-8227.
623 46 E. Husson, T. Auxenfans, M. Herbaut, M. Baralle, V. Lambertyn, H. Rakotoarivonina, C. Rémond
624 and C. Sarazin, *Bioresource Technol.*, 2018, **251**, 280-287.
625 47 J. S. Lupoi and E. A. Smith, *Appl spectrosc.*, 2012, **66**, 903-910.
626 48 J. Schäfer, M. Sattler, Y. Iqbal, I. Lewandowski and M. Bunzel, *GCB Bioenergy*, 2019, **11**, 191-
627 205.
628 49 A. Brandt, J. Gräsvik, J. P. Hallett and T. Welton, *Green Chem.*, 2013, **15**, 550-583.
629 50 L. Liang, J. Yan, Q. He, T. Luong, T. R. Pray, B. A. Simmons and N. Sun, *Green Energy &*
630 *Environment*, 2019, **4**, 432-438.
631 51 G. Cheng, P. Varanasi, C. Li, H. Liu, Y. Melnichenko, B. Simmons, M. Kent and S. Singh,
632 *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 933-941.
633 52 M. Guida and A. Hannioui, *J. Mater. Environ. Sci.*, 2019, **10**, 742-755.
634 53 J. Zhang, Y. Wang, L. Zhang, R. Zhang, G. Liu and G. Cheng, *Bioresource Technol.*, 2014, **151**,
635 402-405.
636 54 M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess and E. Lindahl, *SoftwareX*,
637 2015, **1-2**, 19-25.
638 55 W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, *J. Mol. Graphics*, 1996, **14**, 33-38.
639 56 J. D. Hunter, *Comput. Sci. Eng.*, 2007, **9**, 90-95.
640 57 J. M. Andrews, *J. Antimicrob. Chemoth.*, 2001, **48**, 5-16.
641 58 J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman and D. A. Case, *J. Mol. Graph. Model.*, 2006, **25**, 247-260.
642 59 J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman and D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**,
643 1157-1174.
644 60 S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer and W. Im, *J. Comput. Chem.*, 2008, **29**, 1859-1865.
645

New Biobased-Zwitterionic Ionic Liquids : efficiency and biocompatibility for the development of sustainable biorefinery processes

Gaël Huet,^a Monica Araya-Farias,^{b,c} Ranim Alayoubi,^b Sylvain Laclef,^a Benjamin Bouvier,^a Isabelle Gosselin,^b Christine Cézard,^a Romain Roulard,^d Matthieu Courty,^e Caroline Hadad,^a Eric Husson,^b Catherine Sarazin,^b Albert Nguyen Van Nhien^{a*}

^aLaboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Université de Picardie Jules Verne - UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu – 80039 Amiens cedex, France.

^bUnité de Génie Enzymatique et Cellulaire, UMR CNRS 7025, Université de Picardie Jules Verne - UFR des Sciences, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

^cMacromolecules and Microsystems in Biology and Medicine, Institut Curie – Centre de Recherche – UMR 168 Physico Chimie Curie, Institut Pierre Gilles de Gennes pour la Microfluidique (IPGG), 6, rue Jean Calvin, 75005 Paris, France.

^dPlateforme de Microscopie Electronique – Université de Picardie Jules Verne, HUB de l’Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

^eLaboratoire de Réactivité et Chimie des Solides, UMR CNRS 7314, Université de Picardie Jules Verne, HUB de l’Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

*E-mail : albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

Table of contents

- 1. Synthesis of iodide derivatives**
- 2. Synthesis of ZIL derivatives**
- 3. Composition of the simulated systems (number of molecules)**
- 4. SEM micrographs**
- 5. ¹H and ¹³C NMR spectra of iodide and ZIL derivatives**

1. Synthesis of iodide derivatives

4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide (1)

5g (32.4 mmol) of **A**, 9g (65 mmol) of K₂CO₃ and iodomethane (8.1 mL, 130 mmol) were stirred in 100 mL of acetone at 70°C for 1h to afford after work-up, 9.7 g (97%) of pure compound **1** as a white solid. Mp = 134°C. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) : δ (ppm) 9.76 (s, 1 H, NCHN), 7.35 (s, 1 H, NCH), 3.99, 3.94 (s, 6 H, 2 x NCH₃), 3.64 (s, 3 H, OCH₃), 2.95 (dd, 2 H, *J* = 6.5 Hz, *J* = 7.5 Hz, CH₂), 2.73 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz, CH₂). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 171.7 (CO), 136.7 (NCHN), 134.5 (Cq), 120;7 (NCH), 52.2 (OCH₃), 36.9, 34.4 (2 x NCH₃), 31.8 (CH₂), 18.9 (CH₂). HRMS (ESI⁺) calc. for C₉H₁₅N₂O₂⁺: 183.1232, found 183.1139.

4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-diethyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide (2)

5g (32.4 mmol) of **A**, 9g (65 mmol) of K₂CO₃ and iodoethane (7.8 mL, 97 mmol) were stirred in 100 mL of acetone at 70°C overnight to afford after work-up, 10.4 g (94%) of pure compound **2** as a slight yellow solid. Mp = 111°C. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ (ppm) 9.86 (s, 1 H, NCHN), 7.41 (s, 1 H, NCH), 4.30 (dd, 2 H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 14.7 Hz, NCH₂), 4.24 (dd, 2 H, *J* = 7.3 Hz, *J* = 14.7 Hz, NCH₂), 3.61 (s, 3 H, OCH₃), 2.92 (m, 2 H, CH₂), 2.72 (t, 2 H, *J* = 6.7 Hz, CH₂), 1.52 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ (ppm) 171.8 (CO), 135.2 (NCHN), 133.8 (Cq), 119.2 (NCH), 52.1 (OCH₃), 45.2, 42.6 (2 x NCH₂), 31.8 (CH₂), 18.9 (CH₂), 15.6, 15.5 (2 x CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₁H₁₉N₂O₂⁺: 211.1447, found 211.1446.

4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dipropyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide (3)

4.6g (29.7 mmol) of **A**, 8.2g (59.4 mmol) of K₂CO₃ and 1-iodopropane (8.7 mL, 89 mmol) were stirred in 100 mL of acetone at 70°C for 3 days to afford after work-up, 15.0 g (99%) of pure compound **3** as a viscous liquid. ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 9.25 (s, 1 H, NCHN), 7.66 (s, 1 H, NCH), 4.13 (m, 4 H, 2 x NCH₂), 3.63 (s, 3 H, OCH₃), 2.93 (m, 2 H, CH₂), 2.75 (m, 2 H, CH₂), 1.81 (m, 4 H, 2 x CH₂), 0.88 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ (ppm) 172.3 (CO), 136.0 (NCHN), 134.2 (Cq), 119.6 (NCH), 52.1 (OCH₃), 50.8, 48.2 (2 x NCH₂), 31.5, 23.1, 22.8, 18.8 (4 x CH₂), 10.9, 10.8 (2 x CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₃H₂₃N₂O₂⁺: 239.1760, found 239.1760.

4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dibutyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide (4)

5g (32.4 mmol) of **A**, 8.9g (65 mmol) of K₂CO₃ and 1-iodobutane (7.7 mL, 68 mmol) were stirred in 100 mL of acetone at 70°C for 3 days to afford after work-up, 12.2 g (95%) of pure compound **4** as a viscous liquid. ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 9.35 (s, 1 H, NCHN), 7.71 (s, 1 H, NCH), 4.17 (m, 4 H, 2 x NCH₂), 3.61 (s, 3 H, OCH₃), 2.93 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.74 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 1.76 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.26 (m, 4 H, 2 x CH₂), 0.88 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ (ppm) 172.3 (CO), 135.9 (NCHN), 134.0 (Cq), 119.7 (NCH), 52.2 (OCH₃), 49.0, 46.6 (2 x NCH₂), 31.7, 31.6, 31.3, 19.4, 19.2, 18.9 (6 x CH₂), 13.8, 13.7 (2 x CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₅H₂₇N₂O₂⁺: 267.2073, found 267.2081.

4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dipentyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide (5)

5g (32.4 mmol) of **A**, 8.9g (65 mmol) of K₂CO₃ and 1-iodopentane (8.8 mL, 68 mmol) were stirred in 100 mL of acetone at 70°C for 3 days to afford after work-up, 13.2 g (99%) of pure compound **5** as a viscous liquid. ¹H NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 9.25 (s, 1 H, NCHN), 7.66 (s, 1 H, NCH), 4.15 (t, 4 H, *J* = 7.4 Hz, 2 x NCH₂), 3.63 (s, 3 H, OCH₃), 2.93 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.76 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 1.79 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.29 (m, 8 H, 4 x CH₂), 0.88 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ (ppm) 172.3 (CO), 136.0 (NCHN), 134.1 (Cq), 119.6 (NCH), 52.1 (OCH₃), 49.3, 46.7 (2 x NCH₂), 31.5, 29.3, 29.0, 28.2, 28.0, 22.0, 21.9, 18.8 (8 x CH₂), 14.2 (2 x CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₇H₃₁N₂O₂⁺: 295.2386, found 295.2382.

2. Synthesis of ZILs derivatives

3-(1,3-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium-4-yl)propanoate (ZIL1)

7.72g (24.90 mmol) of 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dimethyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide and 46g of Amberlite IRN78 OH resin (1/6 ratio) in 38.6 mL of MeOH were used to obtain pure **ZIL1** as a white solid (4.10g, >99% yield). Mp = 109°C. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 8.74 (s, 1H, NCHN residual), 7.30 (s, 1 H, CH=C), 3.88 (s, 3 H, NCH₃), 3.86 (s, 3 H, NCH₃), 2.93 (t, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 2.53 (t, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH₂). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 177.9 (CO₂), 136.4 (C_q), 135.9, 135.6 (m, NCHN residual), 119.8 (CH=N), 34.9 (CH₂CO₂⁻), 34.8 (NCH₃), 32.4 (NCH₃), 19.9 (CH₂). HRMS (ESI⁺) calc. for C₈H₁₃N₂O₂ [M+H]⁺ 169.0977, found 169.0981.

3-(1,3-diethyl-1*H*-imidazol-3-ium-4-yl)propanoate (ZIL2)

8.80g (26.03 mmol) of 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-diethyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide et 53g of resin Amberlite IRN78 OH (1/6 ratio) in 44 mL of MeOH were used to obtain pure **ZIL2** as a white solid (4.37g, 85% yield). Mp = 98°C. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 9.03 (s, 1H, NCHN residual), 7.44 (s, 1 H, CH=N), 4.25 (m, 4 H, 2 x NCH₂), 2.97 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 2.56 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz, CH₂), 1.55 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 177.8 (CO₂⁻), 135.9 (C_q), 134.4, 133.8 (m, NCHN residual), 118.4 (CH=C), 44.5, 41.8 (2 x NCH₂), 34.9 (CH₂), 20.0 (CH₂), 14.2, 13.9 (2 x CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₀H₁₇N₂O₂ [M+H]⁺ 197.1290, found 197.1294.

3-(1,3-dipropyl-1*H*-imidazol-3-ium-4-yl)propanoate (ZIL3)

2.42g (6.61 mmol) of 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dipropyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide and 14.5g of resin Amberlite IRN78 OH (1/6 ratio) in 12 mL of MeOH were used to obtain pure **ZIL3** as a viscous liquid (1.60g, >99% yield). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.99 (s, 1H, NCHN residual), 7.42 (s, 1 H, CH=C), 4.16 (m, 4 H, 2 x NCH₂), 2.96 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, CH₂), 2.56 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, CH₂), 1.92 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.00 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 177.9 (CO₂⁻), 136.1 (C_q), 135.2, 134.8, 134.5 (t, ¹J_{C-D} = 33 Hz, NCHN residual),¹ 118.7 (CH=C), 50.8, 48.0 (2 x NCH₂), 34.9 (CH₂), 22.9 (CH₂), 22.7 (CH₂), 20.1 (CH₂), 9.6 (CH₃), 9.5 (CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₂H₂₁N₂O₂ [M+H]⁺ 225.1603, found 225.1611.

3-(1,3-dibutyl-1*H*-imidazol-3-ium-4-yl)propanoate (ZIL4)

3.40g (8.63 mmol) of 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dibutyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide and 20.4g of resin Amberlite IRN78 OH (1/6 ratio) in 17 mL of MeOH were used to obtain pure **ZIL4** as a slight yellow solid (1.87g, 86% yield). Mp = 64°C. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 10.84 (s, 1 H, NCHN), 6.93 (s, 1 H, CH=C), 4.15 (m, 4 H, 2 x NCH₂), 2.85 (t, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 2.48 (t, 2 H, *J* = 7.1 Hz, CH₂), 1.75 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.28 (m, 4 H, 2 x CH₂), 0.86 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 176.0 (CO₂⁻), 138.4 (NCHN), 136.4 (C_q), 117.3 (CH=C), 49.0, 46.5 (2 x NCH₂), 35.7 (CH₂), 32.0, 31.9 (2 x CH₂), 21.0 (CH₂), 19.5, 19.4 (2 x CH₂), 13.4, 13.3 (2 x CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₄H₂₅N₂O₂ [M+H]⁺ 253.1913, found 253.1918.

¹H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 9.00 (s, 1H, NCHN residual), 7.42 (s, 1 H, CH=C), 4.20 (m, 4 H, 2 x NCH₂), 2.96 (m, 2 H, CH₂), 2.55 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz, CH₂), 1.87 (m, 4 H, 2 x CH₂),

1.41 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.02 (m, 6 H, 2 x CH₃). ¹³C) NMR (MeOD, 100 MHz) δ : 177.9 (CO₂⁻), 136.4 (C_q), 135.0, 134.8, 134.4 (t, ¹J_{C-D} = 29 Hz, NCHN residual),¹ 118.7 (CH=C), 49.0, 46.4 (2 x NCH₂), 34.9 (CH₂), 31.6, 31.5, 31.4 (3 x CH₂), 20.1 (CH₂), 19.2, 19.1 (2 x CH₂), 12.5, 13.4 (2 x CH₃).

3-(1,3-dipentyl-1*H*-imidazol-3-ium-4-yl)propanoate (ZIL5)

6.20g (14.69 mmol) of 4-(3-methoxy-3-oxopropyl)-1,3-dipentyl-1*H*-imidazol-3-ium iodide and 37g of resin Amberlite IRN78 OH (1/6 ratio) in 31 mL of MeOH were used to obtain pure ZIL5 as a viscous liquid (4.13g, >99% yield). ¹H) NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.92 (s, 1 H, NCHN residual), 7.39 (s, 1 H, CH=C), 4.19 (m, 4 H, 2 x NCH₂), 2.94 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, CH₂), 2.54 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, CH₂), 1.89 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.32 (m, 8 H, 4 x CH₂), 0.95 (t, 6 H, *J* = 6.5 Hz, 2 x CH₃). ¹³C) NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 177.9 (CO₂⁻), 136.1 (C_q), 134.9, 134.6 (m, NCHN residual), 118.7 (CH=N), 49.3, 46.6 (2 x NCH₂), 34.8 (CH₂), 29.2, 29.0 (2 x CH₂), 28.1, 28.0 (2 x CH₂), 21.8, 21.7 (2 x CH₂), 20.0 (CH₂), 12.8, 12.7 (2 x CH₃). HRMS (ESI⁺) calc. for C₁₆H₂₉N₂O₂ [M+H]⁺ 281.2229, found 281.2231.

3. Composition of the simulated systems (number of molecules)

ERGO	DOPA	PIPA	POPA	DOPC	PIPC	POPC	DOPE	PIPE	POPE
180	4	4	12	138	132	330	64	62	154

DOPS	PIPS	POPS	PIPI	POPI	ZIL	W (0/1/2 bead)
18	18	44	52	188	409	9645/9256/8645

4. SEM micrographs

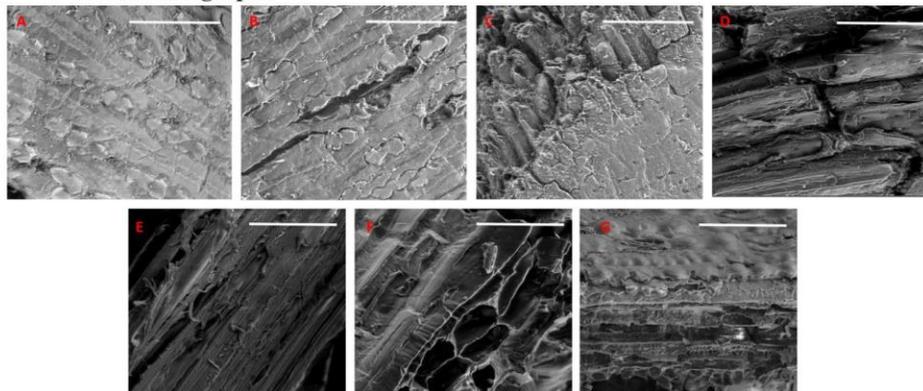
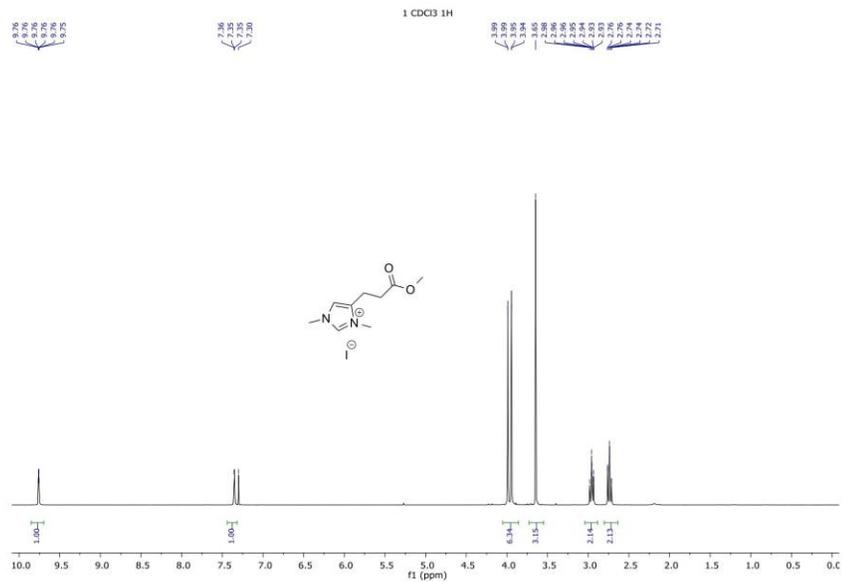


Figure S1. SEM micrographs of untreated miscanthus (A), [C₂mim][OAc]-pretreated miscanthus (B), pretreated miscanthus with ZIL1 (C), ZIL2 (D), ZIL3 (E), ZIL4 (F) and ZIL5 (G), (scale = 50μm)

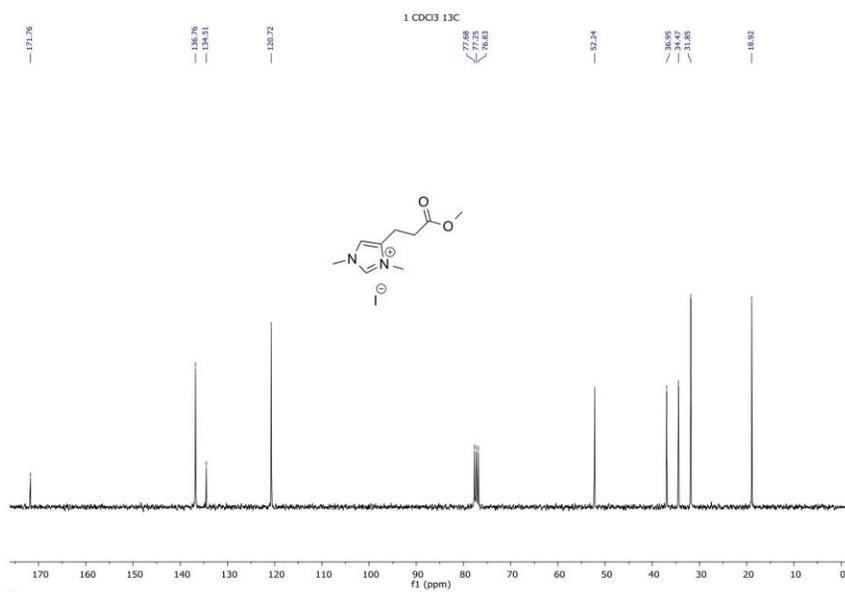
References

- 1 I. Tommasi and F. Sorrentino, *Tet. Lett.*, 2006, **47**, 6453-6456.

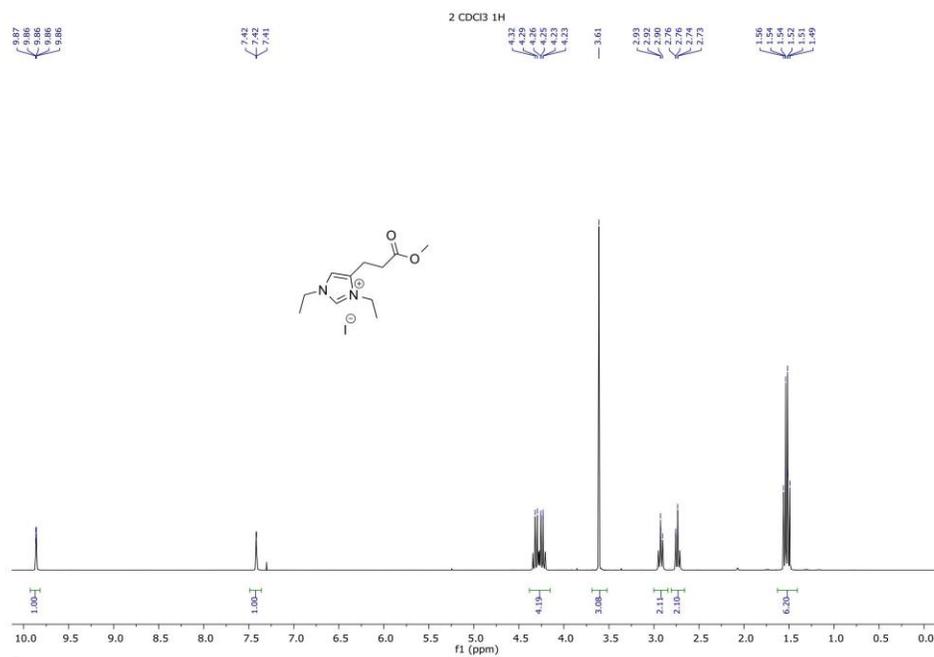
5. ^1H and ^{13}C NMR spectra of ZIL derivatives



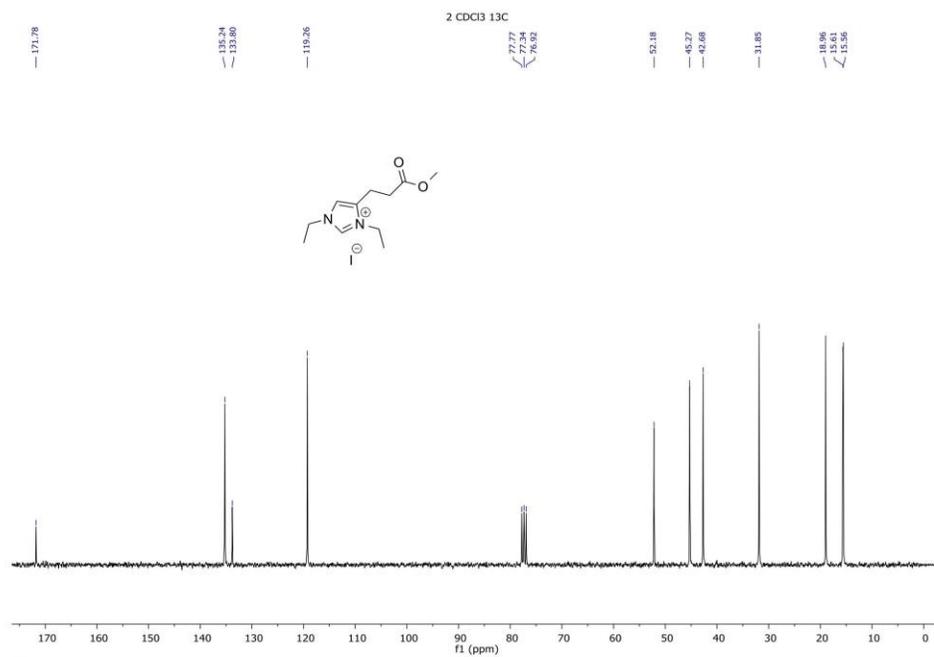
^1H NMR of compound **1**



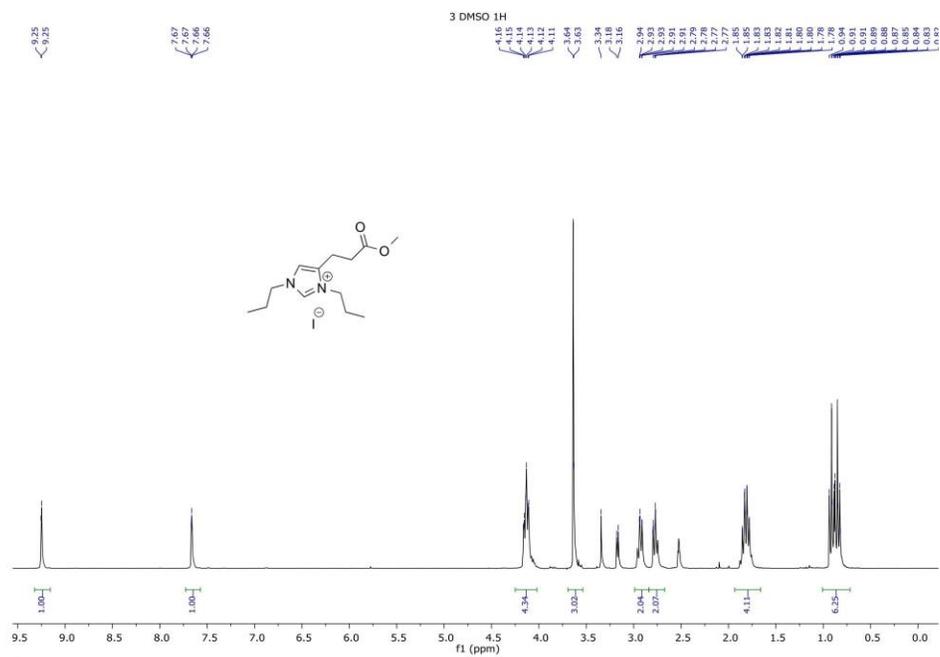
^{13}C NMR of compound **1**



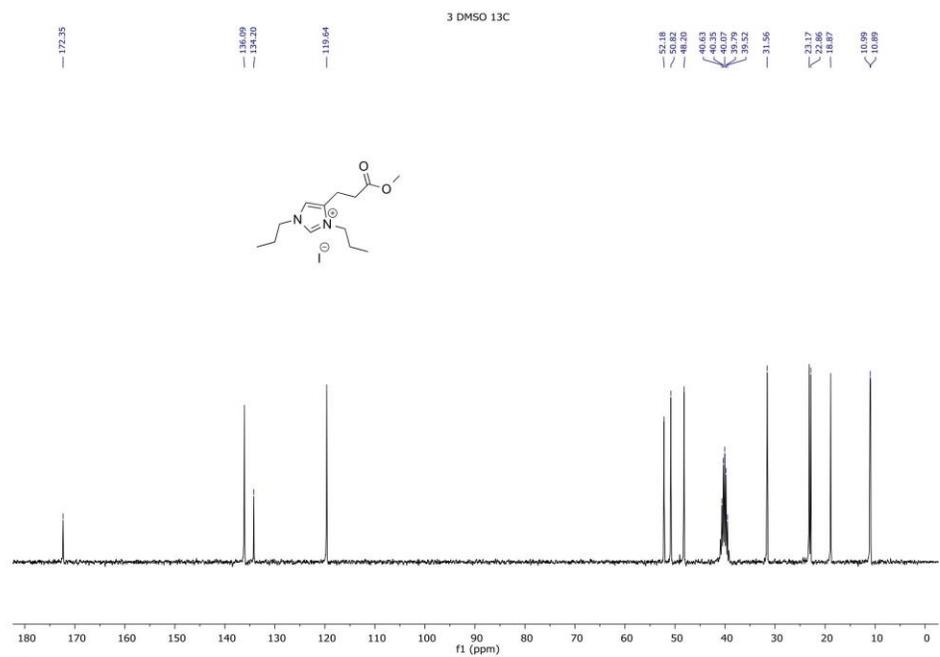
¹H NMR of compound 2



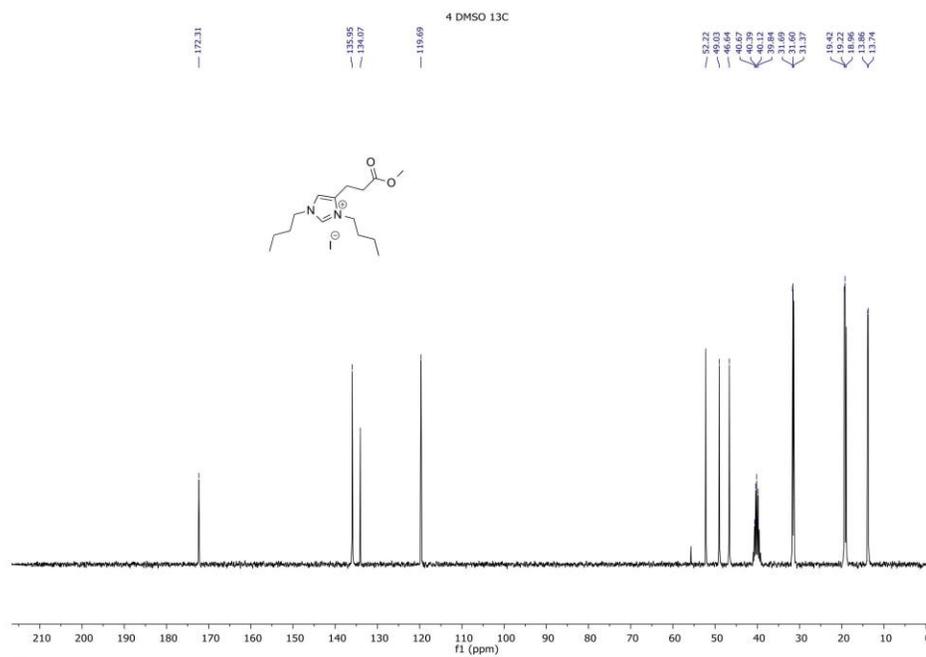
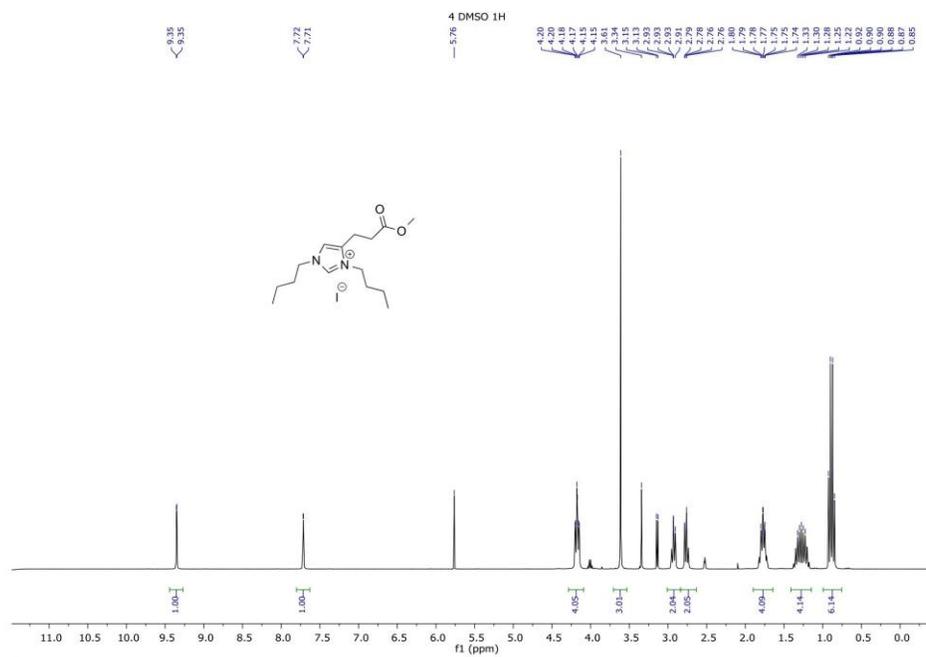
¹³C NMR of compound 2

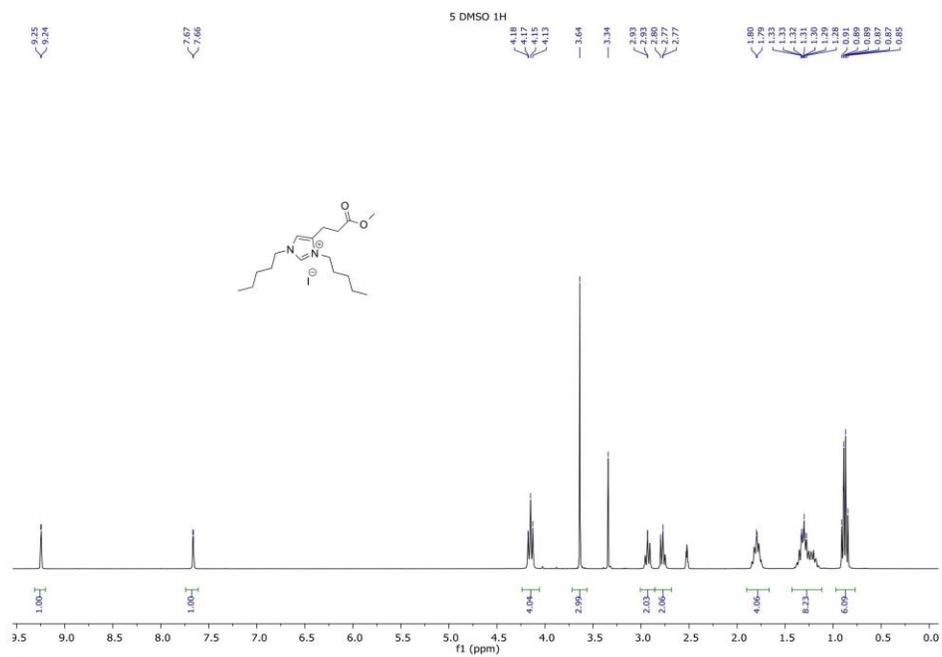


¹H NMR of compound 3

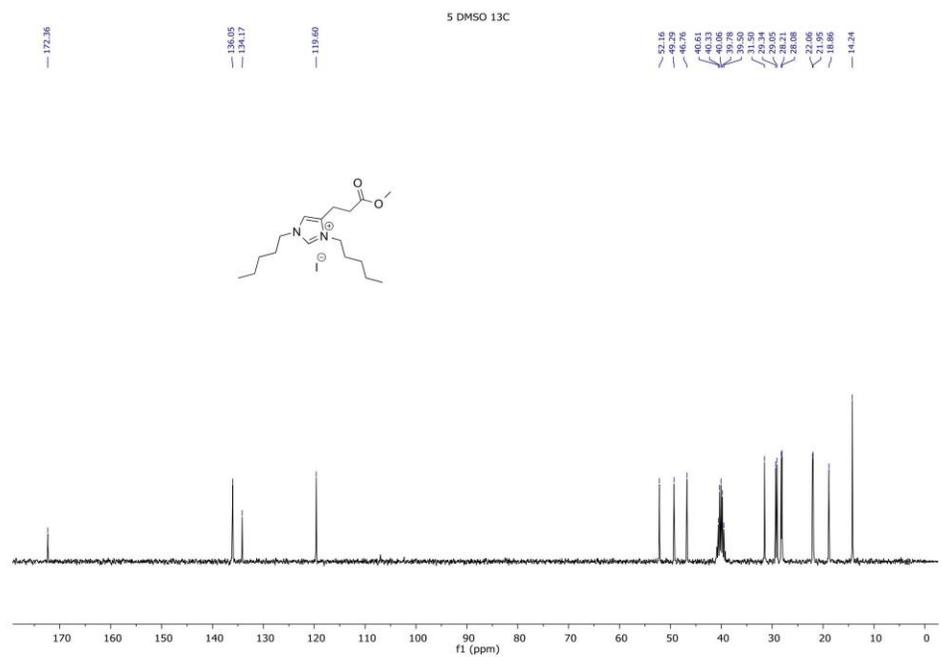


¹³C NMR of compound 3

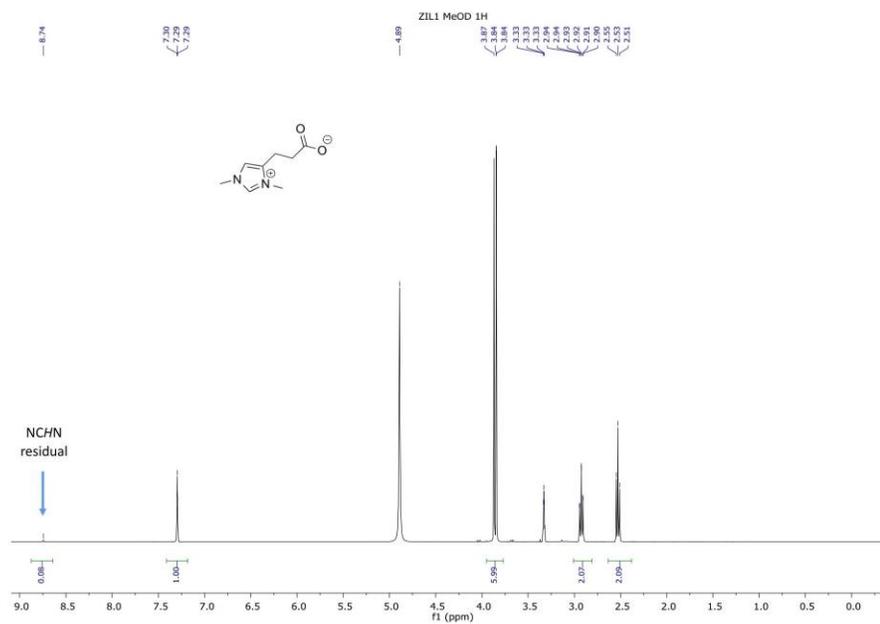




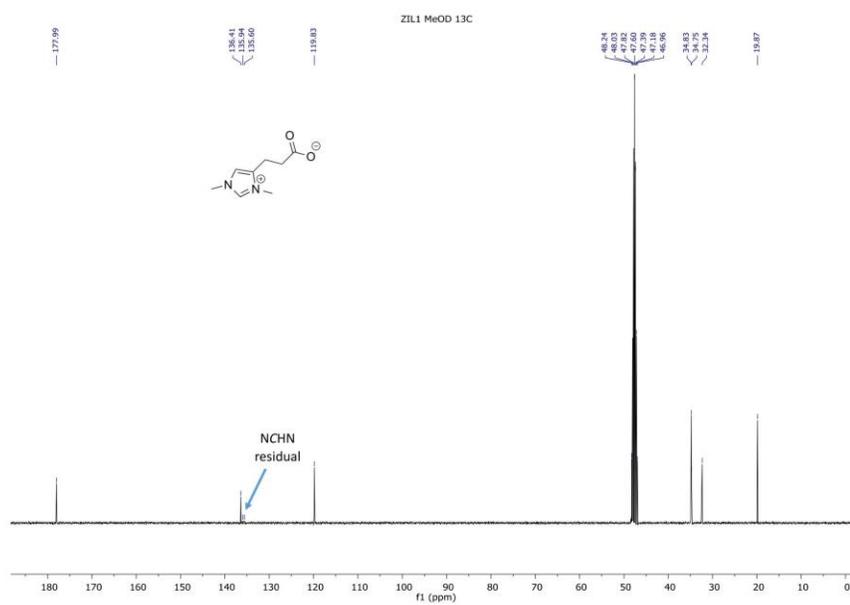
¹H NMR of compound 5



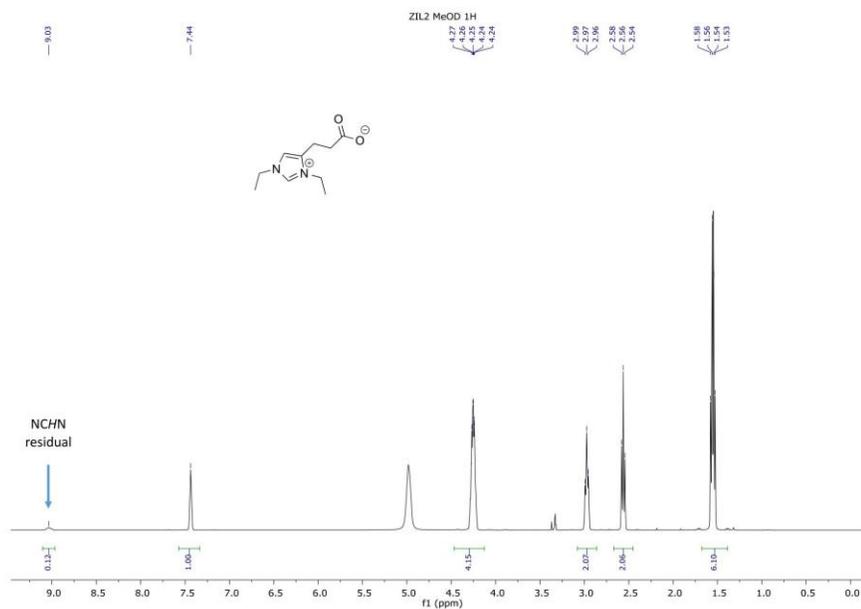
¹³C NMR of compound 5



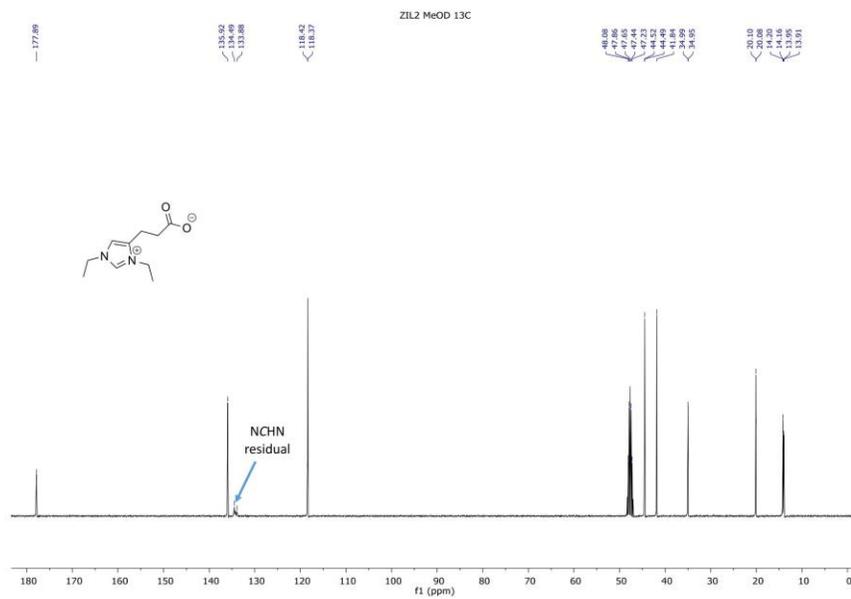
¹H NMR of compound **ZIL1**



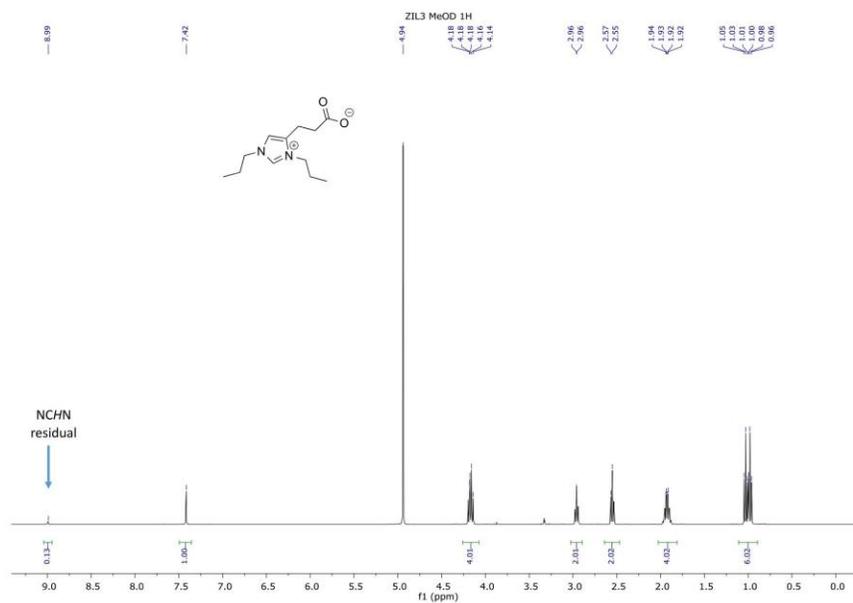
¹³C NMR of compound **ZIL1**



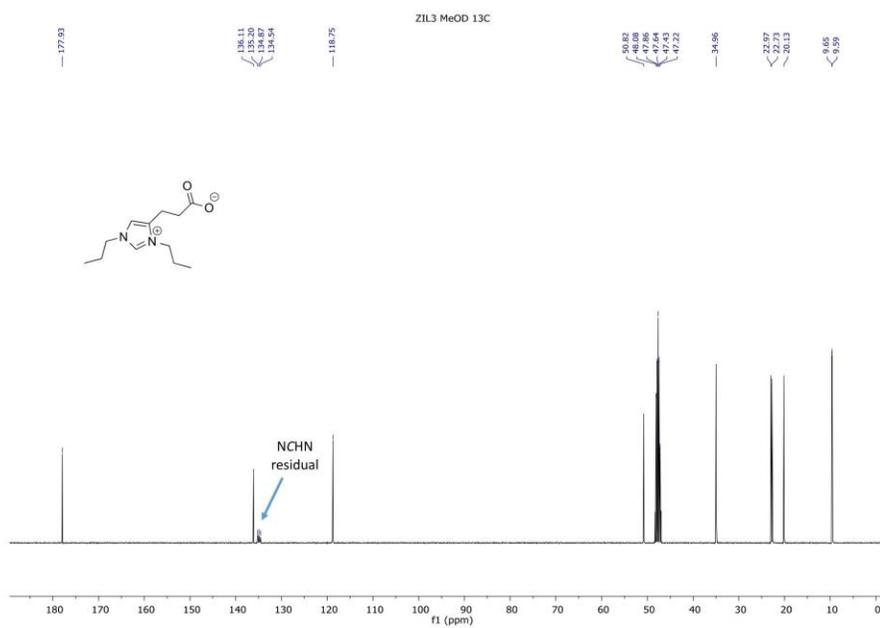
¹H NMR of compound **ZIL2**



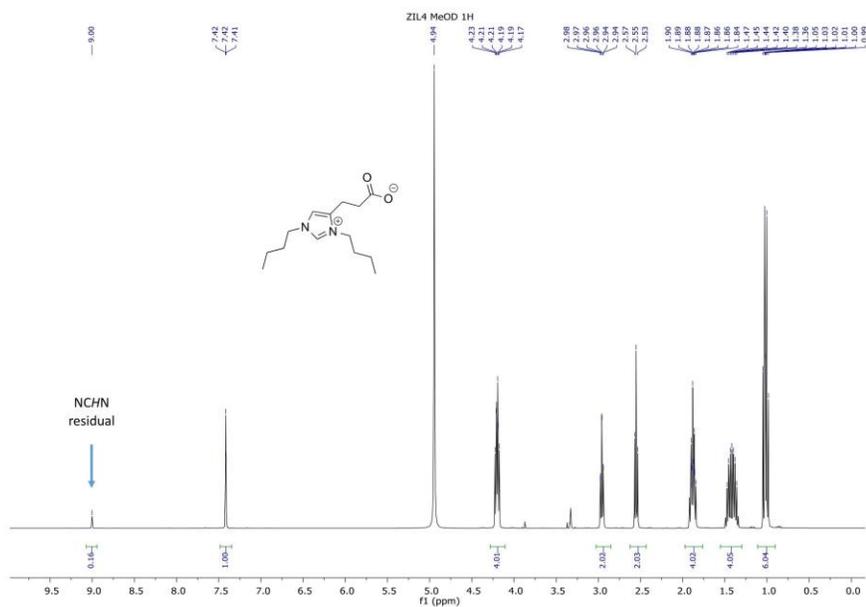
¹³C NMR of compound **ZIL2**



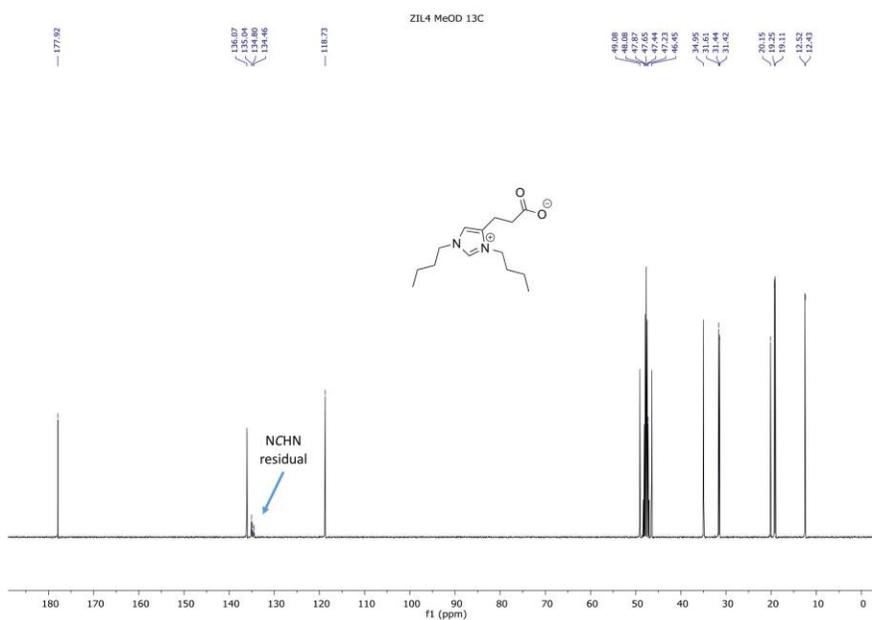
¹H NMR of compound **ZIL3**



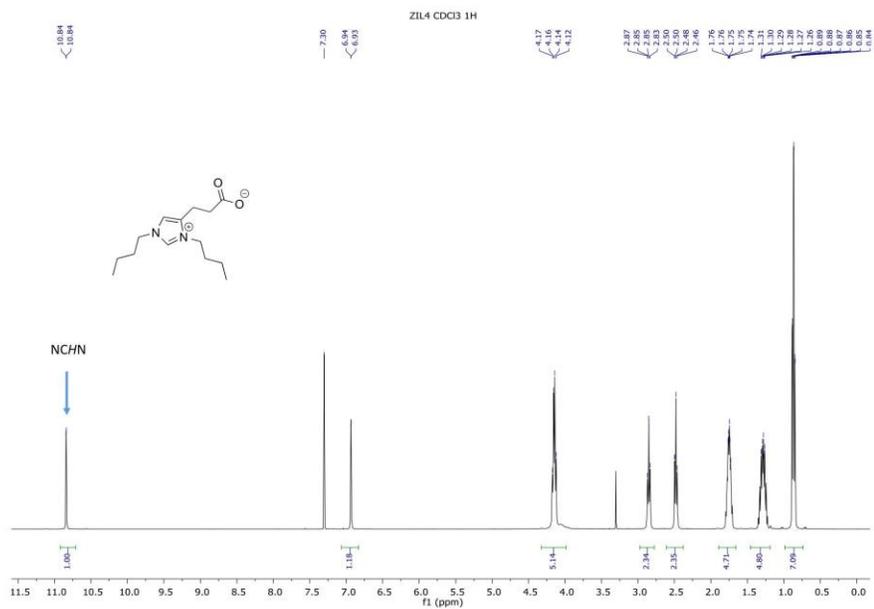
¹³C NMR of compound **ZIL3**



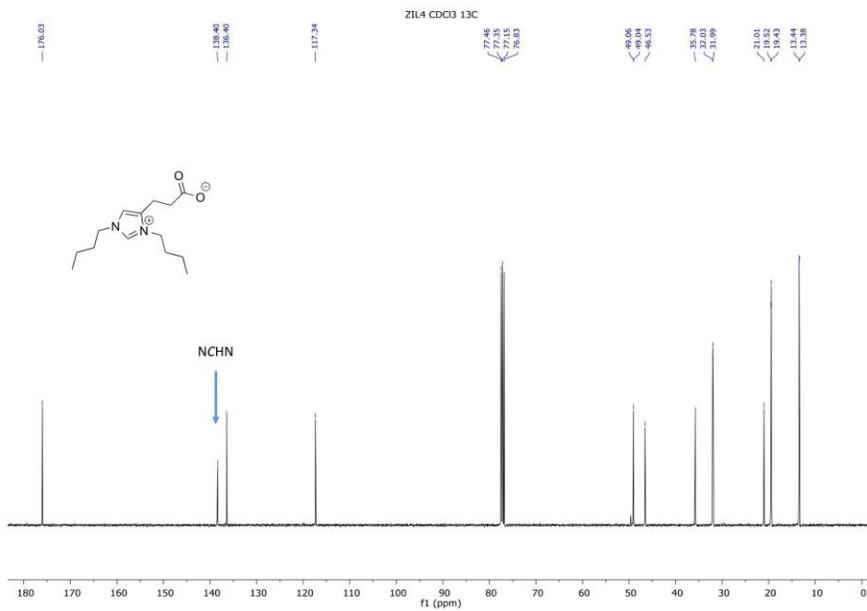
¹H NMR of compound **ZIL4** (MeOD)



¹³C NMR of compound **ZIL4** (MeOD)



¹H NMR of compound **ZIL4** (CDCl₃)



¹³C NMR of compound **ZIL4** (CDCl₃)

Résultats :

- G. Huet, M. Araya Farias, R. Alayoubi, S. Laclef, B. Bouvier, I. Gosselin, C. Cézard, R. Roulard, M. Courty, C. Hadad, E. Husson, C. Sarazin and A. Nguyen Van Nhien; **New Biobased-Zwitterionic ionic liquids: Efficiency and biocompatibility for the development of sustainable biorefinery processes**. Green Chemistry, 2020, **22**, 2935-2946. (DOI : [10.1039/D0GC01002B](https://doi.org/10.1039/D0GC01002B))

I. Discussion et conclusions

Le premier aspect abordé est l'efficacité d'une famille de liquides ioniques appelée ZILs à prétraiter et à solubiliser les biomasses chitineuses par rapport à l'utilisation d'un liquide ionique à motif imidazolium couramment utilisé. Malheureusement, les expériences de solubilisation de la chitine par les ZILs n'ont pas été concluantes et, par conséquent, aucune amélioration de l'hydrolyse enzymatique de la chitine n'a été observée. En effet, les rendements en oligosaccharides (DP1) lors des hydrolyses enzymatiques sont du même ordre de grandeur que pour la chitine non-prétraitée et restent bien inférieurs à ceux obtenus après prétraitement par [C₂mim][OAc] (Figure II.8). La solubilisation de la biomasse chitineuse nécessite des liquides ioniques possédant un paramètre Kamlet-Taft élevé. Ainsi, certains des LIs pouvant être utilisés pour le prétraitement de la BLC ne pourront pas être employés sur des biomasses chitineuses. Il est donc important de bien sélectionner à l'avance une combinaison biomasse/liquide ionique adaptée pour le succès des prétraitements. Toutefois, afin de valoriser cette nouvelle famille de LIs, nous avons testé l'efficacité de nos liquides ioniques zwitterioniques sur différentes biomasses lignocellulosiques.

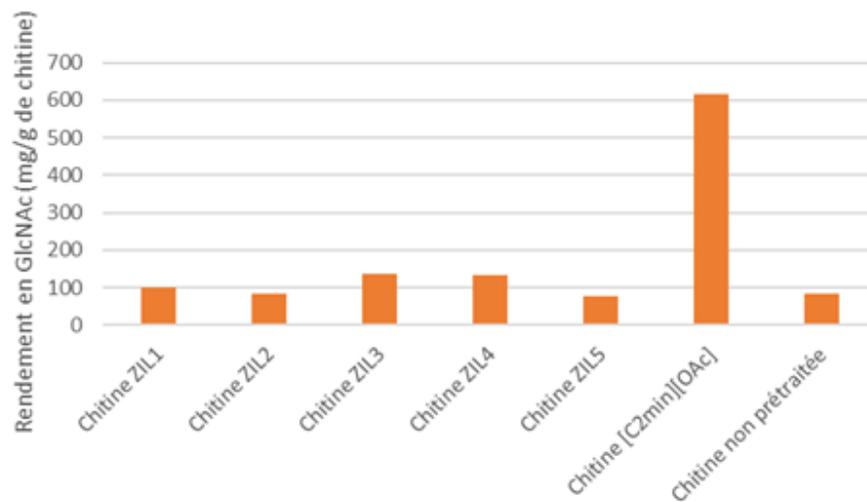


Figure II.8 : Rendements en *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) de la chitine commerciale non-traitée et prétraitée aux ZILs, ou au [C₂min][OAc] après hydrolyse enzymatique catalysée par des chitinases extraites de *T. viride*.

Deux biomasses lignocellulosiques, d'origines différentes mais de compositions cellulose/lignine similaires (cellulose : 44 %, lignine : 25 %) ont été sélectionnées : *Miscanthus x giganteus* (culture dédiée) et la sciure de bois de chêne (résidus forestiers pré-collectés) (Auxenfans, Buchoux, Husson, et al. 2014; Auxenfans, Buchoux, Larcher, et al. 2014). Malgré cette similitude en termes de composition chimique globale, il est à noter que les motifs structuraux, constitutifs de leurs fractions lignines (alcools trans-p-coumarique, trans-conniférylique et trans-sinapique) et hémicellulose, sont respectivement différentes. Ceci pourrait induire une différence de sensibilité aux prétraitements.

Ces deux biomasses ont été prétraitées par les ZIL1 à 5 et [C₂min][OAc]. L'efficacité du prétraitement a été étudiée *via* la détermination des rendements en glucose, obtenus en fin d'hydrolyses enzymatiques catalysées par des cellulases issues de *Trichoderma reesei*. La Figure 7 de l'article résume l'ensemble des rendements en glucose obtenus avec ou sans prétraitement des deux biomasses lignocellulosiques. Les saccharifications enzymatiques des deux biomasses non prétraitées ont conduit à de faibles rendements en glucose (5.74 g pour 100 g de matière sèche pour les deux biomasses). Ce résultat confirme la nature récalcitrante de ces BLCs. Les

prétraitements aux ZILs ont permis d'augmenter les rendements des saccharifications (Figure 7, (Gaël Huet et al. 2020)). Il est à noter que la longueur des chaînes alkyles, présentes sur le noyau imidazolium du ZIL, impacte considérablement le rendement de saccharification. Parmi les 5 longueurs de chaîne testées, le prétraitement au ZIL2 (R = éthyl) semble le plus efficace puisque les rendements en glucose obtenus à partir des 2 biomasses sont les plus élevés. La saccharification de la biomasse de *Miscanthus x giganteus* prétraitée au ZIL2, donne lieu à un rendement en glucose de $12,96 \pm 1,97$ % et dans le cas de la sciure de bois, le rendement s'élève à $24,92 \pm 1,97$ %. La source de la biomasse et donc la composition structurale des polymères de lignine et hémicellulose semblent donc influencer l'efficacité des prétraitements aux ZILs. Les saccharifications effectuées pour des biomasses prétraitées au [C₂min][OAc] ont conduit à des rendements supérieurs avec $24,53 \pm 0,76$ % pour le *Miscanthus x giganteus* et $27,96 \pm 1,98$ % pour la sciure de chêne. Le prétraitement au [C₂min][OAc] semble donc fonctionner efficacement sur tout type de BLC. Néanmoins, les rendements des saccharifications de la sciure de chêne prétraitée au ZIL2 ou au [C₂min][OAc] restent du même ordre de grandeur.

Les micrographies MEB, réalisés sur *Miscanthus x giganteus* prétraitée au ZIL2, expliqueraient les plus faibles rendements obtenus puisqu'aucun changement structural n'a été observé. En revanche, après prétraitement au ZIL2, les micrographies MEB de la sciure de chêne montrent, quant à eux, une structure fibrillaire et expansée similaire aux biomasses ayant subi un prétraitement au [C₂min][OAc] (Figure 8, (Gaël Huet et al. 2020)). L'influence du prétraitement aux ZILs sur la BLC dépend aussi de la nature de la source.

L'impact des prétraitements sur la BLC a aussi été étudié par diffraction aux rayons X (DRX) et analyse thermogravimétrique (ATG). Les diffractogrammes, obtenus à partir de la sciure de chêne, permettent de déterminer la cristallinité de la cellulose (Figure 9, (Gaël Huet et al. 2020)). La cristallinité de la sciure de chêne non prétraitée est estimée à 51 % contre 46 % pour la sciure de chêne prétraitée par le ZIL2. Cette baisse mineure de la cristallinité suggère que les changements cristallins liés au prétraitement au ZIL2 seraient peu significatifs. En revanche, le prétraitement au [C₂min][OAc] permet de fortement diminuer l'indice de cristallinité, puisqu'il passe de 51 % à 33 %. Combiné à cela, un déplacement du principal pic caractéristique de la

cellulose de 22 ° à 20 °, permet de suggérer une transformation de la cellulose de la forme I à la forme II. La forme II a des feuillets de cellulose plus espacés les uns par rapport aux autres. Cette différence structurale permettrait d'expliquer la meilleure digestibilité lors des hydrolyses.

Les résultats des analyses thermogravimétriques sont regroupés Figure 10 et dans le Tableau 3 de l'article, avec T_{1max} , représentant la température de dégradation maximale de l'hémicellulose et T_{2max} , la température de dégradation maximale de la cellulose. L'augmentation de T_{2max} , pour la sciure de chêne prétraitée au ZIL2, amène à une meilleure stabilité thermique, engendrée par une nouvelle conformation de la cellulose. Cette nouvelle conformation serait due à la déminéralisation de la biomasse. A l'inverse, la sciure de chêne prétraitée au $[C_{2min}][OAc]$ voit sa T_{2max} diminuer ce qui indique une dégradation des composantes de la biomasse.

En mettant en corrélation, les données fournies par ATG et DRX, le prétraitement au ZIL2 préserverait la structure supramoléculaire de la biomasse et éviterait que des dépolymérisations partielles aient lieu, tout en augmentant sa digestibilité aux enzymes en expansant la biomasse ce qui faciliterait l'accès des enzymes au substrat. Le traitement au $[C_{2min}][OAc]$, quant à lui, changerait la nature de la cellulose de la forme I à II et augmenterait l'écart entre les différents feuillets, accroissant ainsi sa digestibilité. Cette étude démontre que les deux prétraitements augmentent, tous deux, la digestibilité de la biomasse bien que leur effet respectif sur les propriétés structurales soit différent.

L'intérêt du prétraitement aux ZILs, comme alternative au LI à noyau imidazolium, a été étudié vis-à-vis de leur cytotoxicité sur différents microorganismes (bactéries, levures, moisissures). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des différents ZILs et de $[C_{2min}][OAc]$ ont été déterminées. Enfin, la fermentation éthanolique du glucose par *S. cerevisiae* a été étudiée en présence de différentes concentrations en ZIL 2 et de $[C_{2min}][OAc]$ pour mesurer l'impact des LIs sur la production de bioéthanol. Ces résultats ont été confrontés aux résultats de dynamique moléculaire concernant les interactions ZILs/membrane de *S. cerevisiae*.

Les CMI des différents ZILs et de $[C_{2min}][OAc]$ sont répertoriées dans le Tableau 2 de l'article (Gaël Huet et al. 2020). De manière générale, les ZILs se sont montrés moins toxiques

que [C₂min][OAc] pour les microorganismes à l'exception du ZIL5 sur *A. brasiliensis*. Les valeurs sont plus élevées pour les ZILs que pour [C₂min][OAc] démontrant ainsi une meilleure biocompatibilité. La cytotoxicité des ZILs est généralement inférieure à celle de [C₂min][OAc] sauf pour ZIL5 sur les moisissures. La cytotoxicité des différents ZILs n'est pas équivalente et semble dépendre de la longueur des chaînes alkyles. En effet, les valeurs de CMI augmentent lorsque les chaînes alkyles diminuent. Le ZIL, le moins cytotoxique, est le ZIL2 qui détient les CMI les plus élevées, quels que soient les microorganismes testés. La toxicité paraît être corrélée à la longueur des chaînes alkyles. Notons que pour les LIs à base d'imidazolium, il est admis qu'une chaîne alkyle inférieure à 4 carbones permet au LI d'obtenir une cytotoxicité acceptable (Romero et al. 2008).

Les résultats de dynamique moléculaire, modélisant les interactions des ZILs sur une membrane lipidique de *S. cerevisiae*, montrent que ZIL1, n'a pas d'effet sur la membrane mais qu'il interagit de manière transitoire avec celle-ci. Les ZIL2 et ZIL3 n'ont plus aucun effet sur les membranes mais les interactions transitoires durent bien plus longtemps que celles de ZIL1. Les résultats sur ZIL4 et ZIL5 montrent qu'ils pénètrent profondément dans la membrane lipidique jusqu'à potentiellement la déstabiliser, voire la rompre. Les ZILs, ayant une chaîne alkyle suffisamment longue, s'inséreraient dans la membrane grâce à leur caractère lipophile. Les molécules ZIL4 et ZIL5 ont tendance à s'agréger une fois dans la membrane. Lorsque le regroupement de molécules de ZIL est trop important, la membrane se désorganise. Ce phénomène est lié à l'augmentation de la densité lipidique de la membrane combinée à la répulsion des dipôles des têtes des phospholipides. De plus, cet effet est amplifié par la nature dipolaire des ZILs. Les résultats sur [C₂min][OAc] démontrent que celui-ci s'insère également facilement dans la membrane lipidique. La grande présence de [C₂min][OAc] dans la membrane ne conduira pas à sa perforation mais induire une augmentation de la porosité en raison de la perte d'homogénéité des lipides dans celle-ci. Un autre effet peut également expliquer la cytotoxicité supérieure de [C₂min][OAc]. L'interaction du cation du liquide ionique avec la membrane entraîne sa dissociation avec l'anion. Une importante charge positive s'agrège à la surface de la membrane ce qui perturberait les transporteurs transmembranaires. La présence

de [C₂min][OAc] peut aussi perturber le fonctionnement métabolique des microorganismes le rendant encore plus cytotoxique.

La biocompatibilité du ZIL2 et de [C₂min][OAc], à différentes concentrations en présence de levures, a ensuite été testée lors de la fermentation du glucose en éthanol (Tableau 4 (Gaël Huet et al. 2020)). La fermentation sans [C₂min][OAc] et sans ZIL2 permet d'obtenir des rendements en éthanol de 84,2 ±1,6 %. Des rendements similaires de 81,5 ±4,1 % ont été obtenus avec 0,5% de [C₂min][OAc] dans le milieu. En augmentant le pourcentage à 2 % de [C₂min][OAc] dans le milieu, le rendement de fermentation chute drastiquement. En ce qui concerne les fermentations réalisées en présence de ZIL2, elles ont permis d'atteindre des rendements en éthanol de 83,7 ±0,6 % avec 2 % de ZIL2 dans le milieu, de 80,9 ±0,6 % avec 5 % de ZIL2 et enfin de 69.1±0.6% avec 10 % de ZIL2 dans le milieu. Ces résultats démontrent donc une meilleure tolérance de *S. cerevisiae* au ZIL2 par rapport au [C₂min][OAc].

II. Conclusions :

Les prétraitements aux ZILs ont permis d'augmenter les rendements de la saccharification des différentes biomasses lignocellulosiques. ZIL2 s'est montré plus efficace que les autres ZILs, à des niveaux comparables au [C₂min][OAc], pour la saccharification de la sciure de chêne prétraitée. Le [C₂min][OAc] est efficace quelle que soit la biomasse utilisée contrairement aux ZILs qui ont été moins performants sur *Miscanthus x giganteus*. Lors de l'utilisation des ZILs, le choix de la biomasse reste important. Cependant le frein majeur des LIs est leur importante cytotoxicité combinée à leur non biodégradabilité. En revanche les ZILs ont montré des qualités supérieures dans ce domaine.

La toxicité des ZILs sur différents microorganismes est bien inférieure à celle de [C₂min][OAc], particulièrement, lorsque les chaînes alkyles substituées du ZIL sont courtes. En revanche, la toxicité des ZILs tend à augmenter avec la longueur des chaînes alkyles qui s'agrègeraient et s'insèreraient dans la membrane lipidique de *S. cerevisiae*, créant ainsi des lésions. La biocompatibilité du ZIL2 est aussi largement supérieure à celle de [C₂min][OAc]. En effet, au-delà d'une concentration en [C₂min][OAc] de 0,5 % v/v aucun développement microbien n'est observé, alors que pour des concentrations équivalentes en ZIL2, la croissance de *S.*

cerevisae et la production d'éthanol ne sont pas affectées. Au niveau structural, les ZILs et [C₂min][OAc] n'affectent pas la biomasse de la même manière. [C₂min][OAc] modifierait la structure supramoléculaire de la BLC de la forme I à la forme II, en augmentant l'écart entre les différents feuillets. Cependant, une dépolymérisation partielle de la fraction cellulosique semble inéluctable avec ce type de LIs. A l'inverse, les traitements au ZIL2 ne semblent pas compromettre l'intégrité structurale de la cellulose, la rendant plus stable thermiquement mais tout aussi digestible par voie enzymatique. La famille des liquides ioniques zwitterioniques (ZIL) représente une classe de composés prometteurs pour le prétraitement ménagé de la BLC car elle permet, sur certaines biomasses, d'obtenir des performances de saccharification compétitives et résout le problème majeur des liquides ioniques lié à leur forte cytotoxicité.

Chapitre 3 : Liquides ioniques *versus* solvants eutectiques profonds : Impact des prétraitements sur l'obtention de chitosanes purs et hautement fonctionnalisables.

Partie A : État de l'art

I. Le chitosane

Le chitosane est un polymère, composé de motifs glucosamines, reliés entre eux par des liaisons osidiques β 1-4 (Figure 1 de l'Introduction générale). Il détient d'excellentes propriétés biologiques (antibactériennes et antifongiques) et compte parmi les biopolymères à haut potentiel, pour l'industrie pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire (Ravi and Majesti 2000) avec de multiples applications déjà décrites dans la préface de cette thèse.

Contrairement à la chitine, le chitosane est soluble en milieu acide aqueux grâce à la présence de fonctions amines qui, par protonation, entraînent la solubilisation du polymère et dans certaines conditions spécifiques (poids moléculaire, concentration et degré d'acétylation), à la formation d'un gel. Ce pouvoir gélifiant trouve un intérêt dans des applications nécessitant la création d'objets à 2D ou 3D, en particulier, dans les domaines de l'énergie, de la dépollution ou encore du biomédical (Adiera et al. 2020; Francis Suh and Matthew 2000; Gerente et al. 2007). Le chitosane est, par exemple, utilisé pour sa capacité à accélérer le processus de cicatrisation de plaies ouvertes (Bonferoni et al. 2014).

Bien que le chitosane soit un polymère biodégradable, biocompatible, non toxique et ayant de bonnes propriétés biologiques (Xia et al. 2011), il reste de nombreux efforts à fournir pour abaisser son coût de fabrication, contrôler sa pureté, son degré de désacétylation et son poids moléculaire. Le chitosane peut s'obtenir de deux manières : (i) par extraction de la paroi de certains champignons ou (ii) par désacétylation de la chitine (Chen et al. 2017; Rane and Hoover 1993). Pour une valorisation au niveau industriel, l'extraction du chitosane n'est pas encore envisageable puisque la quantité présente dans la paroi des champignons est généralement faible (1 à 2 % de la matière sèche) (Dhillon et al. 2013). En revanche, l'obtention

du chitosane, à partir de biomasses animales, est possible et consiste, tout d'abord, en l'extraction de la chitine des carapaces de crustacés ou de cuticules d'insectes suivie d'une réaction de désacétylation, en présence de soude concentrée (40 à 50 % (w/v)) à haute température. Toutefois, le procédé reste coûteux et non respectueux de l'environnement puisque son efficacité est faible et doit être répété plusieurs fois. Cette technique génère des effluents qui doivent être traités pour ne pas polluer l'environnement. De plus, il est important de préciser que pour obtenir des chitosanes avec de faibles DAs, il est souvent nécessaire de répéter la réaction de désacétylation ce qui a des conséquences sur la structure du polymère (faible DP par exemple) (Sivashankari and Prabakaran 2016). Dans le but de préserver la structure du chitosane, certains groupes de recherche se sont tournés vers l'optimisation de cette réaction.

II. Méthodes de désacétylation de la chitine

1. Réaction de désacétylation assistée par micro-ondes

La désacétylation de la chitine, assistée par micro-ondes, est aussi réalisée avec de la soude caustique (40 à 45 % (w/v)) mais permet de considérablement réduire le temps de réaction, tout en augmentant l'efficacité de la réaction. Il est alors possible d'obtenir un meilleur degré de désacétylation, plus rapidement, tout en conservant un haut poids moléculaire (Tableau III.1). Cette technique a notamment permis d'obtenir un chitosane à partir de nanocristaux de chitine, normalement résistants aux méthodes de désacétylations classiques. De plus, la durée de cette réaction passe de 21h à seulement 3h (15 % de DA et un PM allant de 85kDa à 147kDa en 6h de réaction en fonction de la concentration en soude) limitant ainsi le coût de la réaction et la rendant moins polluante (Sahu, Goswami, and Bora 2009; Lertwattanaseri et al. 2009).

2. Réaction de désacétylation catalysée par des désacétylases

Cette méthode, dite verte, permettrait de conserver le poids moléculaire du chitosane puisque ces enzymes sont des hydrolases spécialisées dans le clivage des liaisons C-N. Cette technique permet d'obtenir une bonne répartition des motifs désacétylés, le long des chaînes saccharidiques. Cependant, de nombreuses limitations existent comme (i) l'insolubilité de la chitine, qui ne permet pas aux enzymes de désacétyler correctement le polymère, (ii) un indice de cristallinité de la chitine trop élevé qui peut empêcher l'accès des désacétylases aux

groupements amides et (iii) le cout des enzymes qui reste élevé (Sivashankari and Prabakaran 2016 ; Aspras, Jaworska, and Górak 2017).

3. Réaction de désacétylation par explosion à la vapeur

Cette méthode est assez unique, puisqu'elle n'utilise pas directement la soude pour désacétyler la chitine. Elle est considérée comme une méthode verte. Le principe consiste à amener à haute pression et haute température, la chitine. Cette étape est appelée la compression. Une décompression est ensuite réalisée en ramenant brusquement l'enceinte à pression atmosphérique. La vapeur produite éclatera ainsi la chitine et générer de la porosité dans la structure du polymère. Une baisse du DA a été observée sur les chitines ayant subi ce procédé (DA \geq 57%) (1) (Tan et al. 2015). Cependant, les DAs restent élevés et cette technique est réalisée sous haute pression et peut présenter un risque d'explosion.

4. Désacétylation dans une enceinte pressurisée

Cette méthode consiste à introduire la chitine dans une solution de soude concentrée, placée dans une enceinte pressurisée à haute température et à haute pression, pour accélérer la réaction de désacétylation et obtenir de faibles DA (9.6%) (Tableau III.1). Plusieurs brevets et publications utilisent des systèmes pressurisés comme des autoclaves ou des bombes Parr. Cette méthode a pour avantage de réduire le temps de réaction et d'obtenir de faibles DA. Les auteurs ont également montré qu'il était possible d'abaisser la quantité de soude nécessaire à la réaction en allongeant modérément le temps de contact. Cette méthode est efficace, applicable sur de grosses quantités, et industrialisable (No et al. 2000; He et al. 2016).

Tableau III.1: Comparaison des méthodes classiques et non classiques de désacétylation de la chitine.

MÉTHODE	SOURCE	DA	PM	RÉFÉRENCE
ALCALINE	Carapaces de crevette	18 %	Faible PM	Sivashankari and Prabakaran 2016
MICRO-ONDES	Carapaces de crevettes	15 %	85 kDa à 147 kDa	Sahu et al. 2009
DÉSACÉTYLASES	ND	Entre 99.5 % et 5 % (dépend de la solubilité)	ND	Aspras et al. 2017
EXPLOSION À VAPEUR	Carapaces de crevettes	57 %	ND	Tan et al. 2015
ENCEINTE PRESSURISÉE	Carapaces de crevettes	9.6 %	1560 kDa	No et al. 2000

III. Les solvants eutectiques profonds (DES)

Les solvants eutectiques profonds (DES) sont composés d'un mélange d'acide et de base de Lewis ou de Brønsted qui, dans les bons ratios molaires, formeront un liquide. Ce ratio est appelé « point eutectique » Figure III.1. De par leur nature, les DES sont des composés similaires aux liquides ioniques et sont même parfois considérés comme une sous classe de liquides ioniques.

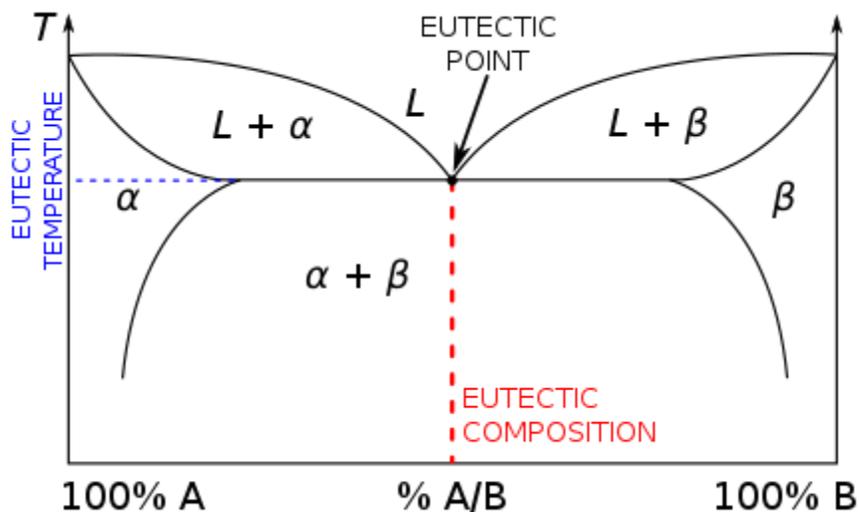


Figure III.1 : diagramme de phase d'un mélange chimique binaire. Figure extraite de : https://www.wikiwand.com/fr/Solvant_eutectique_profond

En effet, les propriétés physiques des DES sont proches de celles des ILs avec leur faible pression de vapeur et une viscosité assez proche. Ils sont considérés ininflammables, thermiquement et chimiquement stables (Zdanowicz, Wilpiszewska, and Szychaj 2018). Ils sont aussi relativement faciles à synthétiser puisqu'il s'agit de mélanger deux ou plusieurs composés au bon ratio et à une température minimale pour atteindre le point eutectique (cf figure III.1). Au point eutectique, le mélange devient un liquide uniforme qui se comporte comme un corps pur. Les DES, contrairement aux liquides ioniques, ne nécessitent pas d'étape de purification supplémentaire. Cependant, les propriétés chimiques des DES diffèrent de celles des ILs. Cette différence serait due à la grande taille des ions et au volume relativement libre dans le système ionique. Les DES sont de manière générale, chimiquement moins inertes que les liquides ioniques, ce qui peut ouvrir ou fermer des champs d'applications. Les DES ont généralement une plus haute viscosité et une plus faible conductivité. Cela n'a rien de surprenant puisque la viscosité est reliée à la température, elle-même reliée à la conductivité électrochimique. Bien que tous les DES ne soient pas non toxiques, les types III (Tableau III.2) détiennent généralement une faible toxicité et sont souvent composés d'urée, de glycérol, d'éthylène glycol et de fructose. Certains de ces composants sont aussi facilement synthétisables et même produits par des procédés industriels de l'agroalimentaire.

La formule générale des DES peut être réduite à l'équation suivante :



Où Cat^+ est en principe un cation ammonium, phosphonium ou sulfonium et X^- une base de Lewis (généralement un ion halogénure). Le complexe se forme entre X^- et « y » qui représente l'acide de Lewis ou de Brønsted. « z » correspond au nombre de molécules en interaction avec l'anion. D'après cette formule générale, quatre catégories de DES sont déterminées et répertoriées dans Le Tableau III.2. Des exemples de couples couramment utilisés et pouvant former des DES sont regroupés Figure III.2. Les DES de types III sont souvent formés à partir de chlorure de choline et d'un donneur d'hydrogène. Ils sont simples à préparer, réagissent peu avec l'eau, sont biodégradables et peu coûteux. La grande variété des donneurs d'hydrogène

disponibles rend ce type de DES très adaptable dans leur utilisations (Smith, Abbott, and Ryder 2014).

Tableau III.2 : Classification générale des DES (Smith et al. 2014).

TYPE	FORMULE GÉNÉRALE	TERMES
TYPE I	$Cat^+X^-zMCl_x$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In
TYPE II	$Cat^+X^-zMCl_x.yH_2O$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe
TYPE III	Cat^+X^-zRZ	Z = CONH ₂ , COOH, OH
TYPE IV	$MCIX + RZ = MCl_{x-1} + RZ + MCl_{x+1}$	M = Al, Zn et Z=CONH ₂ , OH

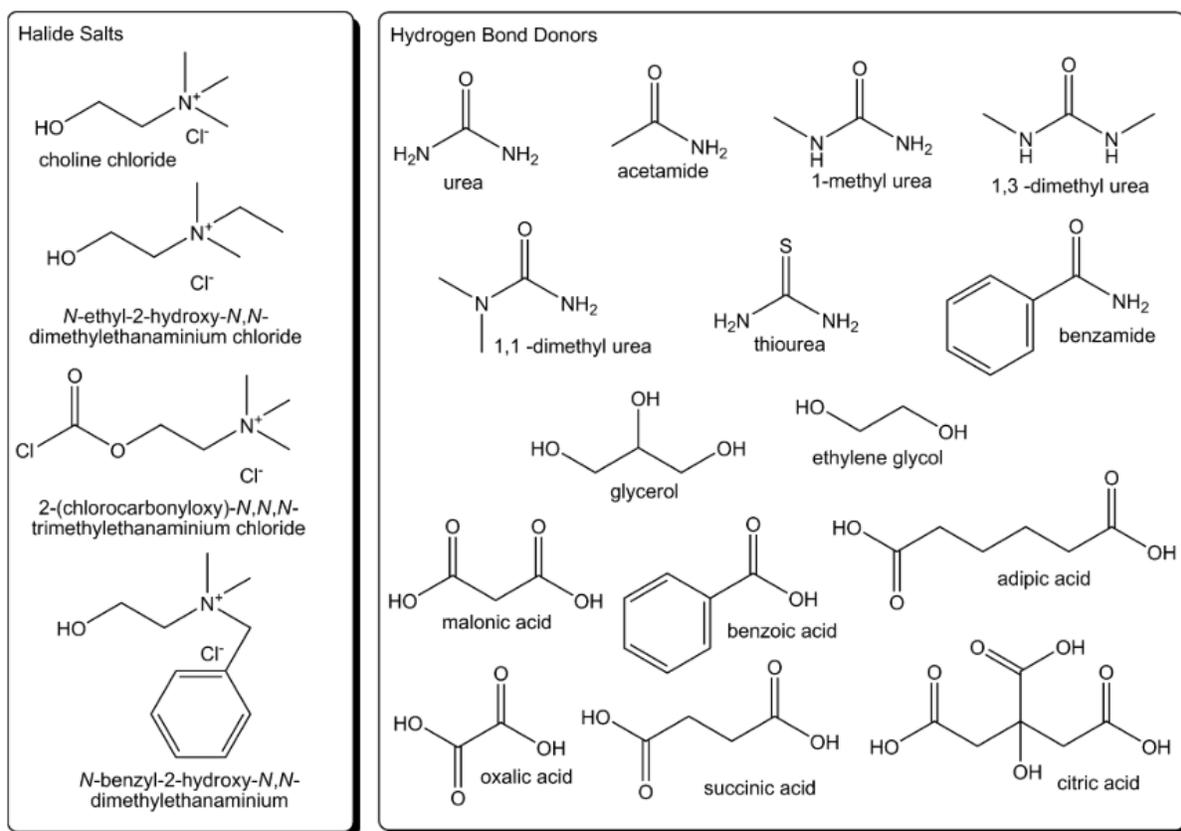


Figure III.2 : Structures de certains sels d'halogénures et de donneurs d'hydrogène couramment utilisés dans la synthèse des DES (Smith et al. 2014).

Les DES ont été beaucoup étudiés, pour leur capacité à remplacer l'eau, dans certains procédés industriels de traitement des métaux (Smith et al. 2014). En effet, les DES sont plus

efficaces que l'eau pour solubiliser des ions métalliques. Ils peuvent être utilisés pour les procédés d'électro-déposition de métal, pour l'extraction de métal ou pour polir des métaux (Smith et al. 2014). Ils ont également été utilisés dans différentes réactions de synthèse organique. Des réactions de Diels-Alder, et d'annulation d'indole Fischer ont ainsi été étudiées (Abbott et al. 2002; Morales et al. 2004). Même si les DES sont moins conducteur que les liquides ioniques, Ils restent de bons conducteurs et peuvent être employés en électrochimie (Ruggeri et al. 2019). Des biotransformations comme des transestérifications ont aussi été réalisées dans des DES à l'aide d'enzymes (Gorke and Kazlauskas 2008; Zhao, Baker, and Holmes 2011). Leur utilisation dans divers champs de la chimie a été déjà largement étudiée et semble une alternative moins onéreuse et moins toxique pour l'environnement que les méthodes dites classiques.

Récemment, les DES ont été étudiés pour leur propriétés de solubilisation/solvatation, pour la délignification et pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique (Lynam, Kumar, and Wong 2017 ; Jablonský, Andrea, and Kamenská 2015 ; Liu et al. 2017 ; Z. Chen and Wan 2018 ; Zhang 2016 ; Atikah et al. 2016 ; Xu et al. 2016 ; Ren et al. 2016 ; Karimi et al. 2016; Sirviö, Ukkola, and Liimatainen 2019 ; Suopajärvi, Sirviö, and Liimatainen 2017 ; Laitinen 2017). Des travaux similaires, sur l'utilisation des DES sur des biomasses chitineuses, ont rapidement vu le jour. Certains DES semblent ainsi pouvoir solubiliser la chitine (entrée 1, Tableau III.3). Les DES de type III ayant démontré leur pouvoir de solubilisation, sont généralement des DES à base de choline chloride. Le couple « Choline chloride : urée » est le DES ayant montré le plus fort pouvoir de solubilisation, avec un pourcentage de 8 % (entrée 1, Tableau III.3). De plus, le caractère acide de certains DES permet d'éliminer les minéraux de la biomasse chitineuse et certains DES, comme « CC : acide Malonique », sont également capables d'éliminer une grande fraction de protéines (entrée 3, Tableau III.3). Enfin, l'utilisation de certains DES (Choline chlorure : acide lactique, CC :LA) permet d'extraire des nanofibres ou des nanocristaux de chitine (entrées 2 et 4, Tableau III.3).

Tableau III.3: Utilisation des DES sur la biomasse chitineuse.

ENTRÉE	EFFET DU DES	DES	RATIO MOLAIRE	RÉSULTAT	RÉFÉRENCE
1	Dissolution	CC : urée	1 : 2	Solubilité à 8 % dans CC : urée (100°C)	Sharma, Mukesh, Mondal, & Prasad, 2013
		Choline bromide : urée	1 : 2		
		CC : thiocarbamide betaine	1 : 2		
		hydrochloride : urea	1 : 4		
2	Extraction de nanocristaux	CC : éthylène glycol	1 : 2	O-acylation des nanocristaux	Yuan, Hong, Lian, Zhang, & Liimatainen, 2020
		CC : acide lactique			
		CC : acide malonique			
		CC : acide citrique monohydrate			
3	Extraction de la chitine	CC : acide DL-malique	1 : 2	Déminéralisation, déprotéinisation et dépolymérisation	Hong, Yuan, Yang, Zhu, & Lian, 2018
		CC : acide oxalique dihydraté			
		CC : acide lactique			
		CC : acide malique			
4	Extraction des nanofibres de chitine	CC : acide levulinique	1 : 2	Production de nanofibres d'α-chitine	Mukesh, Mondal, Sharma, & Prasad, 2014
		CC : urée			
		CC/Bromide : urée			

Bien que les DES aient prouvé leur efficacité à solubiliser, à extraire la chitine et ses nanofibres/nanocristaux, l'effet des DES, en tant que prétraitement de la chitine est encore peu étudié. Il existe, à ce jour, un seul article qui traite du prétraitement aux DES de la chitine, dans le but de faciliter la réaction de désacétylation. Dans cette étude, CC : AL semble être un prétraitement efficace pour obtenir un chitosane fortement désacétylé, tout en utilisant de la soude caustique à plus faible concentration (30 % (w/v))(Vicente et al. 2020). Toutefois, aucune étude comparative, portant sur l'impact d'un prétraitement au LI classique par rapport à un prétraitement au DES sur l'efficacité de la réaction de désacétylation, n'a encore été reportée. Le chitosane est un produit d'intérêt et faciliter son obtention par l'utilisation de prétraitements peu onéreux et peu polluant pour l'environnement serait un atout majeur pour généraliser son utilisation.

IV. Fonctionnalisation du chitosane

1. Agents de greffages

Le chitosane détient une réactivité chimique supérieure et supplémentaire à la chitine, grâce à la fonction amine disponible. En effet, en plus des réactions d'estérification possibles en position C6 majoritairement et C3 minoritairement, il est possible de réaliser des réactions de couplage sur les amines libres. Les réactions de fonctionnalisation sur la chitine ne sont pas aisées, puisque la cristallinité et l'insolubilité des polymères de chitine peuvent empêcher l'obtention de bons rendements. La solubilité du chitosane peut permettre de faciliter les réactions et la fonction amine du chitosane offre une fonctionnalisation supplémentaire, d'un point de vue chimique. La littérature suggère que les rendements des réactions de greffage, effectuées sur le chitosane, dépendent de son degré de polymérisation ainsi que de sa solubilité dans le milieu réactionnel (Aytekin, Morimura, and Kida 2011).

Les réactions de *N*-acylation entre un acide carboxylique et le groupement amine du chitosane se fait généralement en présence d'agents de couplage. En milieu aqueux, le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) et la *N*-hydroxysuccinimide (NHS) sont couramment utilisés. Les synthèses organiques, en milieu aqueux, permettent de limiter la pollution générée car le traitement des déchets est moins lourd. Il est également possible de réaliser des réactions d'estérification en présence d'EDC, toutefois, dans le cas du chitosane, la formation de la liaison peptidique sera généralement privilégiée grâce à la plus grande nucléophilicité de la fonction amine (Hermanson 2013). Le mécanisme de la réaction de couplage, entre un acide carboxylique et une amine en présence d'EDC et de la NHS est présenté Figure III.3.

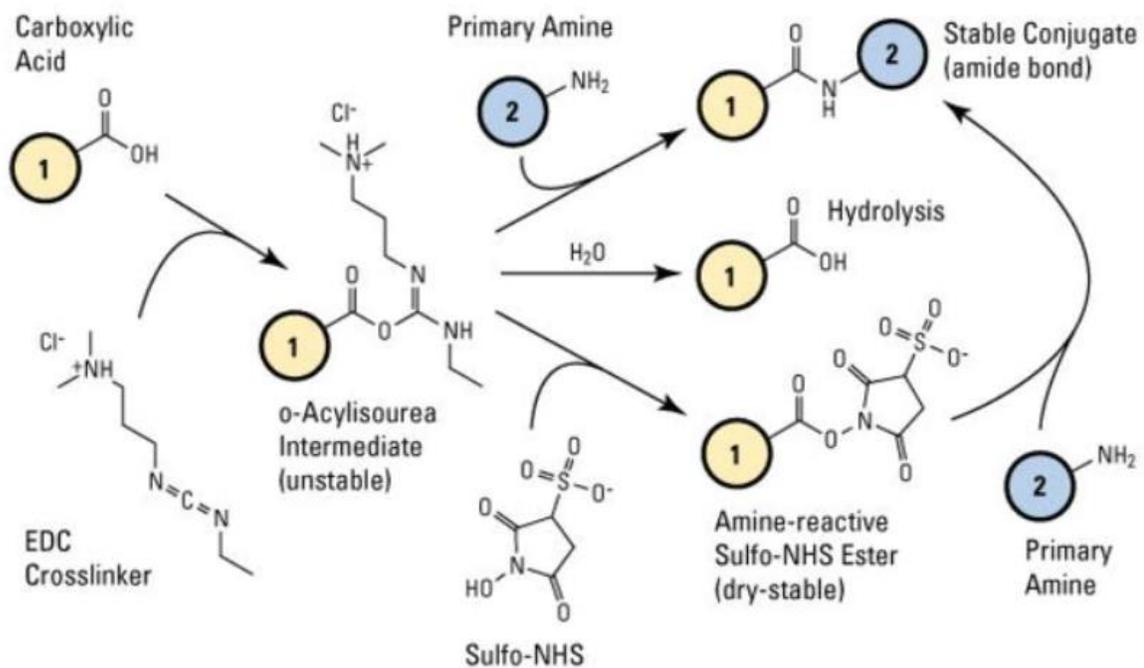


Figure III.3 : Mécanisme de la réaction de couplage entre un acide carboxylique et une amine primaire en présence d'EDC et de NHS (tiré de <https://www.fishersci.fr>).

2. Propriétés des acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaînes aliphatiques, dont la longueur varie et peut atteindre 36 atomes de carbone. Les acides gras peuvent être dit saturés, mono-insaturés ou poly-insaturés en raison de l'absence, ou de la présence, d'une ou de plusieurs doubles liaisons sur la chaîne aliphatique. Dans le cas des acides gras insaturés, les molécules peuvent adopter une configuration dite *cis* ou *trans* (Figure III.4).

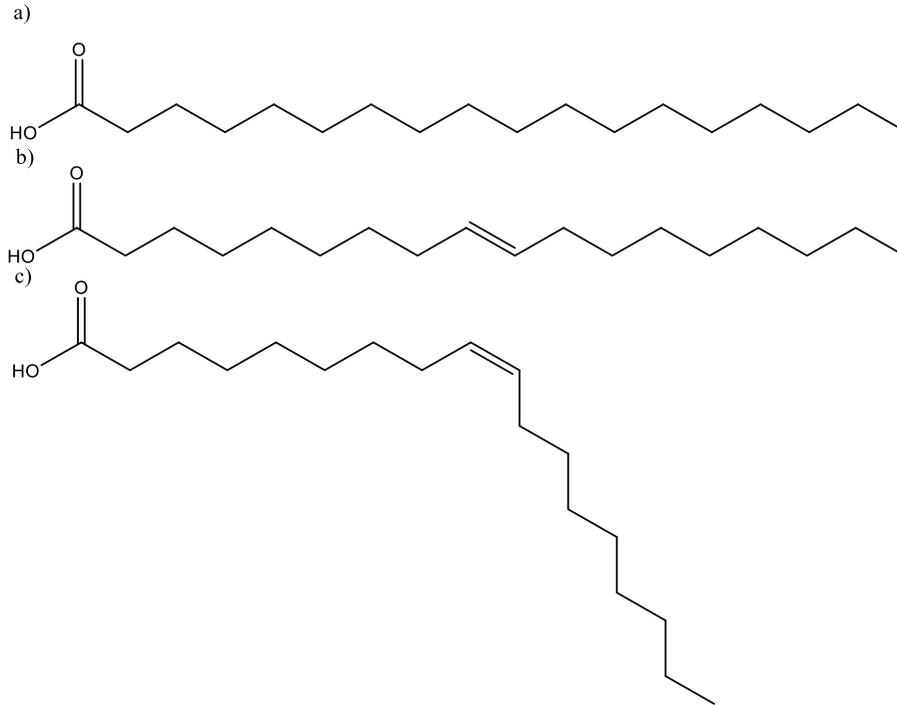


Figure III.4 : Représentations chimiques de (a) l'acide stéarique, (b) l'acide élaïdique (conformation Trans) et (c) l'acide oléique (conformation Cis).

La solubilité des acides gras dépend de la nature de la chaîne aliphatique, plus celle-ci est longue, plus il est difficile de les solubiliser en milieu aqueux. C'est donc cette chaîne carbonée qui confère aux acides gras, leur caractère hydrophobe. Cependant, la fonction carboxylique est polaire et donne lieu à des interactions avec les solvants aqueux. Le caractère amphiphile des acides gras peut permettre, à la bonne concentration et à certains pH, la formation d'émulsion et donc de micelles et de vésicules. Cette propriété est similaire à la formation des membranes cellulaire à base de phospholipide (Figure III.5). En effet, les micelles sont les regroupements des chaînes d'acides gras sur elles-mêmes, exposant ainsi la fonction carboxylique vers l'extérieur au contact de la solution aqueuse. Les vésicules se présentent comme une membrane mais ont la forme d'une micelle. Les têtes des acides gras sont concentrées vers l'extérieur mais aussi vers l'intérieur.

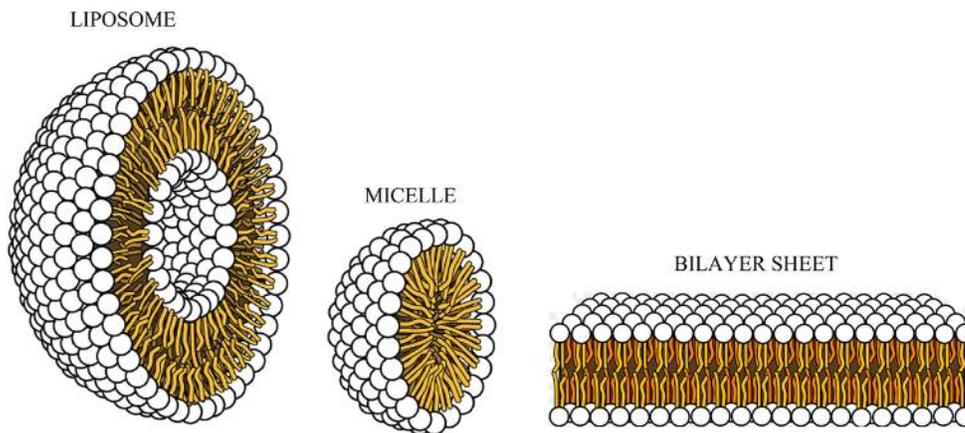


Figure III.5 : Représentations schématiques d'une vésicule (liposome), d'une micelle et d'une bicouche de membrane à partir de phospholipide (Extrait de <https://www.lipolife.co.za/>).

Les liposomes ou vésicules peuvent être très utiles dans le transport de principes actifs. Elles sont susceptibles d'encapsuler des molécules et de les libérer lorsque le pH de l'environnement déstabilisera la bicouche lipidique (Figure III.6).

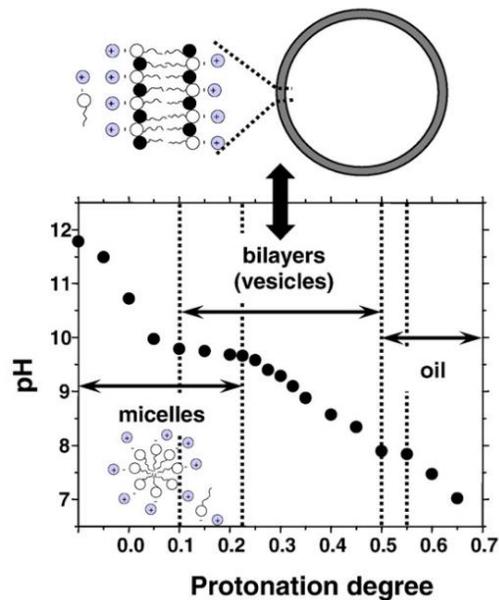


Figure III.6 : Schéma représentant la formation de micelles ou de vésicules en fonction du pH et du degré de protonation (titration d'une solution à 80mM d'acide oléique et de sodium oléate)(extrait de (Morigaki and Walde 2007)).

3. Applications des chitosanes fonctionnalisés

Les chitosanes, greffés avec des acides gras, peuvent être utilisés dans le domaine biomédical par le biais de films, en raison de leurs propriétés antibactériennes et régénératrices (El Fray, Niemczyk, and Pabin-Szafko 2012; Sharma and Singh 2017; Srinivasa, Ramesh, and Tharanathan 2007). De plus, contrairement aux films obtenus à partir de chitosane non modifié, ceux obtenus à partir de chitosane fonctionnalisé par des chaînes grasses, présentent une meilleure résistance à l'eau et seront plus résistants à leur environnement (Srinivasa, Ramesh, and Tharanathan 2007; Maria Vargas et al. 2009). Le greffage d'acide gras sur le chitosane commence à être étudié pour répondre à des besoins très spécifiques. Ainsi, ce type de greffage a permis la fabrication de cathéter qui sont plus résistants à l'humidité et plus biocompatibles (Niemczyk et al. 2019). Les chitosanes greffés ont aussi la capacité de former des micelles utilisables dans des applications biomédicales. Ainsi, les solutions, contenant des micelles de chitosane greffé, peuvent être utilisées directement pour accélérer les processus de guérison de tissus endommagés (Bonferoni et al. 2014). Des micelles, obtenues à partir d'oligosaccharides de chitosane greffés à de l'acide linoléique, ont permis de transporter la doxorubicine, utilisée pour traiter les cancers, à l'intérieur des cellules (Du et al. 2009; Bonferoni et al. 2014).

Dans le domaine de l'agroalimentaire, les films de chitosane peuvent aussi servir à recouvrir les aliments. L'intérêt de ce genre de films repose sur leur propriété antibactérienne, permettant ainsi une meilleure conservation des aliments tout en étant comestible (Elsabee and Abdou 2013). Ces films conservateurs sont également résistants à l'eau.

V. Objectif de nos travaux

L'impact du prétraitement au DES, sur l'efficacité de la réaction de désacétylation de la chitine, a été décrit une seule fois sur une chitine pure, en poudre, et issue de carapaces de crevettes (Vicente et al. 2020). Une comparaison du prétraitement de la biomasse chitineuse brute par les LI *versus* celui réalisé par les DES n'a, à ce jour, jamais été reportée. L'objectif principal de cette étude est d'étudier l'impact du prétraitement sur l'efficacité de la réaction de désacétylation. Cette étude a également été étendue à trois biomasses chitineuses (*Bombyx eri*, *Hermetia illucens* et *Crangon Crangon*) à différentes étapes d'extraction (Figure III.6).

Les chitosanes obtenus par cette méthode seront ensuite modifiés chimiquement par réaction de couplage peptidique, en milieu aqueux, avec l'acide oléique et en présence d'EDC.HCl, dans le but d'augmenter la résistance à l'eau des chitosanes modifiés. L'efficacité du greffage a donc été étudiée en fonction de la source, du prétraitement effectué au préalable de la désacétylation et de la pureté (biomasses brutes/biomasses déprotéinisées et déminéralisées).

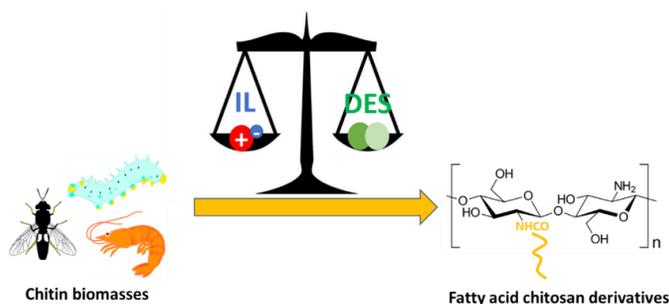


Figure III.6 : LI *versus* DES : impact du prétraitement sur l'efficacité de la réaction de désacétylation.

Partie B : Article, résultats et discussion

Article 4

IL *versus* DES: Impact on chitin pretreatment to afford high quality and highly functionalizable chitosan

Gaël Huet,^a Caroline Hadad,^a Jose M. González-Domínguez,^b Matthieu Courty,^c Arash Jamali,^d Dominique Cailleu^e and Albert Nguyen van Nhien^{*a}

^a Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - UFR des Sciences – 80039 Amiens cedex, France.

^b Group of Carbon Nanostructures and Nanotechnology, Instituto de Carboquímica (ICB-CSIC), C/Miguel Luesma Castán 4, 50018 Zaragoza (Spain).

^c Laboratoire de Réactivité et Chimie des Solides, UMR CNRS 7314, Université de Picardie Jules Verne, HUB de l'Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

^d Plateforme de Microscopie Electronique – Université de Picardie Jules Verne, HUB de l'Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

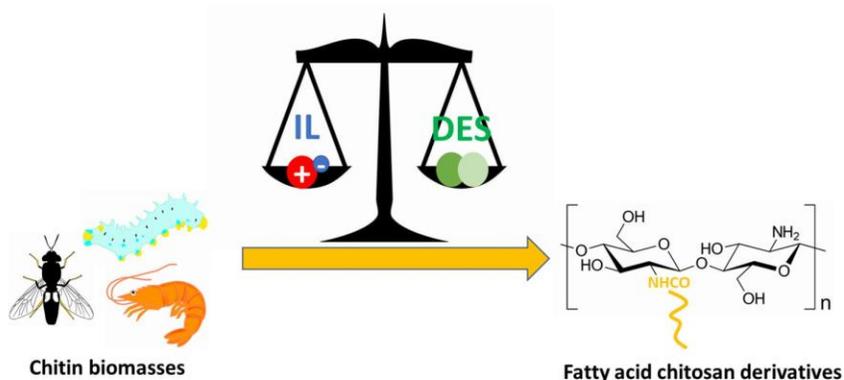
^e Plateforme analytique, Université de Picardie Jules Verne, UFR des Sciences Bâtiment Serres-Transfert Rue Dallery - Passage du sourire d'Avril 80039 AMIENS Cedex 1, France.

*E-mail : albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

ABSTRACT

Chitin is mainly extracted from crustaceans, but this resource is seasonally dependent and can represent a major drawback to satisfy the traceability criterion for high valuable applications. Insect resources are valuable alternatives due to their lower mineral content. However, the deacetylation of chitin into chitosan is still an expensive process. Therefore, we herein compare the impact of both DES/IL-pretreatments on the efficiency of the chemical deacetylation of chitin carried out over two insect sources (*Bombyx eri*, BE and *Hermetia illucens*, HI). The results showed that chitosans obtained from IL-pretreated chitins from BE larva, present lower acetylation degrees (13-17%) than DES-pretreated samples (18-27%). A selective *N*-acylation reaction with oleic acid has also been performed on the purest and most deacetylated chitosans leading to high substitution degrees (up to 26%). The overall approach validates the proper chitin source and processing methodology to achieve high quality and highly functionalizable chitosan.

GRAPHICAL ABSTRACT



KEYWORDS

Chitin, chitosan, room temperature ionic liquid, deep eutectic solvent, functionalization, fatty acid.

INTRODUCTION

Chitosan, a biopolysaccharide composed of glucosamine units linked together by β -1,4 bonding, is usually produced by deacetylation of chitin, which is mainly extracted from crustacean shells, insect cuticles or other microorganisms such as bacteria, fungus and mycetes (Hamed, Özogul, and Regensteinst 2016). Both, chitin and chitosan, are biocompatible, biodegradable and non-toxic. In addition to being soluble in acidic media, chitosan also presents versatile biological activity and has gained considerable interests for biomedical applications. Indeed, thanks to its antimicrobial activity and good antioxidant properties, its wound healing properties can prevent infection, allowing good oxygen permeation (Altiok, Altiok, and Tihminlioglu 2010). Chitosan is also a promising biopolymer for drug delivery systems to treat diseases such as cancer, optical diseases, and colon diseases (Pan et al. 2002, Elgadir et al. 2015). Another field of application is related to the use of modified chitosan in fuel cells. Modified chitosan could represent an environmentally friendlier and economically better alternative to the currently used polymer electrolytes in hydrogen fuel cell (Ma and Sahai 2013). The adsorption/biosorption process for the removal or recovery of heavy metal ions and/or radionuclides from wastewater using naturally occurring chitosan, modified chitosan and chitosan composites have also been widely reported (Wang and Chen 2014). Even if those properties are well known and promising in various scientific fields, some drawbacks stand against its development: (i) the extraction and purification of chitin is costly and environmentally burdening due to the huge amount of waste water produced during both processes (Khanafari, Marandi, and Sanathei 2008); (ii) chemical treatments used to obtain chitosan from chitin adversely affect the physical and chemical properties of these biopolymers (Gadgery and Bahekar 2017, Bajaj, Winter, and Gallert 2011); and (iii) the use of chitosan in its original

form is a limitation for many applications (i. e. poor solubility at physiological pH, low mechanical strength) and modifications are needed.

Due to its generally high crystallinity index, chemical deacetylation of chitin through concentrated alkali treatment has a low success rate to obtain a highly deacetylated chitosan in only one cycle of reaction. Therefore, the reaction must be repeated several times, significantly increasing the cost and the polluting nature of this process as well as entailing a molecular weight heterogeneity. To overcome these issues, Aspra et al. proposed the use of chitin deacetylase as a greener method to perform the deacetylation reaction (Aspras, Jaworska, and Górak 2017). However, the efficiency of the process depends on chitin solubility to obtain a high molecular weight chitosan as the solubility decreases strongly for high molecular weight chitin and the chitin deacetylase might stop working. Mechanical treatments such as grinding or ultrasonication in the presence of NaOH are efficient techniques to obtain low molecular weight chitosan with short reaction times and low acetylation degrees but with low yields and concomitant depolymerization during the reaction (Anwar, Anggraeni, and Amin 2017). The authors also studied the maceration technique, which can be an option to redress the low yields but it needs longer reaction times for the deacetylation step. Recently, the work of Di Nardo et al. has demonstrated that the maceration technique combined with ball milling leads to chitosan with a high degree of deacetylating and high molecular weight (Di Nardo et al. 2019). However, this deacetylation technique is costly in terms of time.

In a recent work, we have demonstrated that chitin extracted from *Bombyx eri* (BE) insect larvae can be a very good alternative for the chitin production, as this insect's cuticle contains less minerals and possesses a lower degree of crystallinity than the commercial shrimp source (Huet et al. 2020). We also demonstrated that an ionic liquid (IL) pretreatment on insect chitin at different purity degrees enhanced its digestibility by chitinase, leading to high yields of mono and chito-oligomers (Husson et al. 2017). In addition, ionic liquids such as 1-ethyl-3-methyl imidazolium [C₂min][OAc] was not only able to solubilize chitin by disrupting the hydrogen bonding between the fibers making chitin less crystalline, but it could also eliminate residual proteins contained in the raw chitin biomasses while maintaining a high molecular weight (Shamshina et al. 2016). Given that controversy still exists on the IL toxicity and its degradability, deep eutectic solvents (DES) have attracted the attention of the scientific community as an alternative to ionic liquids, especially in the solubilization of recalcitrant biomasses such as lignocellulosic biomasses. DES are composed of at least one hydrogen donor and one hydrogen acceptor at a different ratio. They share similar properties with ILs such as a low melting point, a low vapor pressure, both are non-inflammable and have good dissolving abilities. DES are usually claimed as less toxic than ILs because they can be composed of non-toxic natural compounds (NADES) and can be produced at a cheapest price compared to ILs (Zdanowicz, Wilpiszewska, and Sychaj 2018). Various applications in (bio)chemistry as catalysis (Zdanowicz, Wilpiszewska, and Sychaj 2018, Singh, Lobo, and Shankarling 2012), electrochemistry (Ruggeri et al. 2019) and nanomaterials production (Zhao et al. 2018) have been found for DES. Recently, DES based on choline

chloride have been studied in the extraction of chitin even if their acidity generally leads to the production of chitin with low molecular weights (Hong et al. 2018). The use of DES for the pretreatment has been hardly ever reported to date. To the best of our knowledge, there is only one recent work which clearly deepens into the impact of DES pretreatment on the efficiency of the chitin deacetylation reaction. The authors studied four DES with distinct characteristics for chitin dissolution prior to the deacetylation reaction. They showed that DES were able to disrupt chitin's strong hydrogen bonding while facilitating the NaOH penetration and, consequently, the deacetylation. However, contrary to the present work, commercially available chitin powder was used for the aforementioned study. Therefore, a gap still exists on the DES performance over other chitin sources, and the comparison with other dissolving agents, such as ILs in order to unravel the best processing route from raw chitin to high quality chitosan (Vicente et al. 2020).

Therefore, herein, we propose to study and compare the impact of both DES and IL pretreatments on the efficiency of the chitin chemical deacetylation, carried out on different sources (crustaceans and insects), and purity degrees (Chart 1). The obtained chitosans are functionalized with oleic acid under mild conditions (water/ethanol solvent, room temperature) by using *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) as the coupling agent. Even if grafting fatty acids to chitosan is a known procedure, it is rare to have a full characterization of the formed amide bond, as esterification can be a competitive side reaction. Oleic acid has been selected for its wound healing properties as it enhances the production of cytokines that help the healing process, and also for its hydrophobic nature (Young-Hee et al. 2008). Indeed, it is essential to have an appropriate hydrophilic/hydrophobic balance to ensure both cell-affinity and biocompatibility (Menzies and Jones 2010, Iacob et al. 2018).

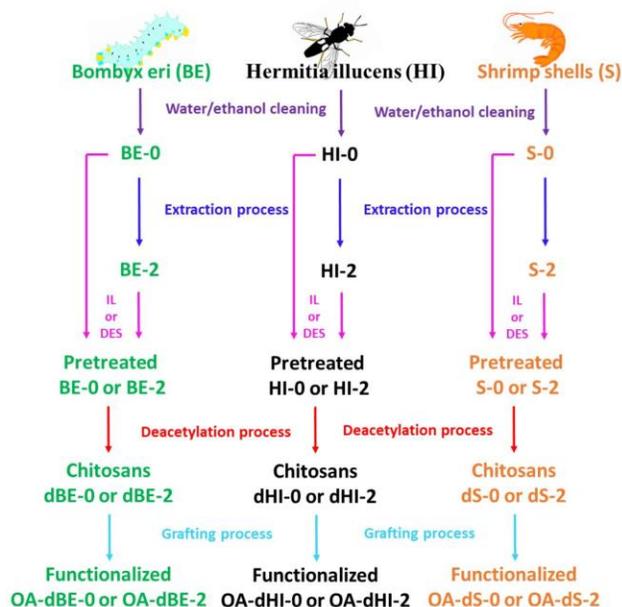


Chart 1. From raw chitin biomasses to functionalized chitosans.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chitin sources

Three sources of chitin have been used in this study: (i) larvae from *Bombyx eri* provided by LepidUP company (Amiens, France), (ii) larvae from *Hermitia illucens* provided by SFly company (Grenoble, France) and (iii) shrimps shells from *Crangon Crangon* bought in a local market (Amiens, France).

2.2 Chemicals

All minerals acids and bases were used in their highest concentration possible available from VWR Europe (Briare, France) and Fischer Chemical (UK). Deionized water with a resistivity of 18.3MΩ cm, Barnsted Easy Pure RF, was used for all the experiments. 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetate ([C₂mim][OAc], >98%) was purchased from Proionic (Grambach, Austria). Choline chloride, lactic acid and *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) were supplied by Sigma-Aldrich (Streinheim, Germany). Oleic Acid (99%) was supplied by TCI Europe (Paris, France).

2.3 Instrumental analysis

CP-MAS ¹³C NMR spectrum was obtained at 125 MHz using a Bruker AVANCE III HD spectrometer 500MHz. The pulse sequence was based on cross-polarization technique. The rotation frequency of

sample was 15 kHz and the contact time was optimized to 2 ms with a 5 seconds delay between scans to observe correctly all the carbons of chitin. The probe used allowed the use of a 2.5 mm rotor. Acetylation degrees were determined by integration of the *N*-acetyl carbon atom divided by the sum of the intensities of the D-glucopyranosyl carbon ring atoms. X-Ray powder diffraction (XRD) patterns were acquired using a Bruker D8 Endeavor diffractometer equipped with a Cu anti-cathode ($K\alpha$ radiation, operating at 40 kV–40 mA). Patterns were collected in the 2θ range of 10–60° with a step size of 0.03° and using a low background silicon holder (Bruker AXS, C79298A3244B261). The experimental conditions used for the measurement did not allow us to observe correctly the band below 10°. Crystallinity indexes (CrI) were calculated from the X-ray diffractograms using the difference of intensity between the amorphous area at $2\theta = 16^\circ$ and the crystallinity area whose peak at its highest intensity is near $2\theta = 20^\circ$ (Liu et al. 2012). The followed formula was: $CrI = ((Intensity_{max} - Intensity_{amorph})/Intensity_{max}) * 100$. Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine the microstructure of untreated and pretreated extracted chitins, as synthesized and functionalized chitosans. A small amount of dried samples (powder or flakes) was placed on double-sided carbon tape adhered to aluminum SEM stubs. These were then coated with a 20 nm layer of gold and examined using a Quanta 200 FEG scanning electron microscope (FEI Co., USA). The micrographs were obtained with a secondary electron detector at an accelerating voltage of 2 or 5 kV. Infrared spectra were obtained by using a Fourier-transform infrared (FT-IR) spectrometer (IRaffinity-1S, Shimadzu) and ATR method with a germanium prism (MIRacle 10, Shimadzu). Spectra were obtained in a range between 700 cm^{-1} and 4000 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} with 64 scans. Thermogravimetric analysis (TGA) was recorded on a Netzsch STA 449C Jupiter thermal analyser instrument equipped with a differential analysis microbalance coupled to a QMS 403 Aëolos mass spectrometer with a stainless-steel capillary and a Secondary Electron Multiplier (SEV) detector (Channeltron). The counting time for the mass spectrometer was 20 ms per (m/z) value (scanning width: $m/z=10-150$ amu) with a resting time of 1 s. The samples (approximately 20 mg of each compound) were heated in an alumina crucible under argon, by equilibrating at 25 °C, and followed a ramp at 5 °C/min up to 800 °C and an isotherm under air atmosphere for 30 min (Flow rate: 50 mL/min). Elemental (C, H, N, S) characterization was performed in a Thermo Flash 1112 analyzer. Samples were placed in Ag capsules and pyrolyzed at 1070 °C under a He flow. The produced gases flowed through a reducing bed of carbon black that transforms all CO_x into CO. Subsequently, the gases flowed through a polar chromatographic column that separates CH_4 from CO and the latter is detected and quantified using a thermal conductivity detector calibrated with sulphanilamide.

2.4 Extraction of chitin from insect and shrimp sources

Bombyx eri larvae were frozen alive overnight. Then *Bombyx eri* larvae were boiled and extruded with a household juice extractor to separate the solid biomass composed mainly of chitin, minerals and proteins and a liquid composed mainly of proteins and lipids. After filtration, the solid fraction was

washed with Milli-Q water, ethanol and then acetone to obtain *Bombyx eri* larvae cuticles (**BE-0**). Although the extraction of shrimp's carapaces and *Hermitia illucens*'s cuticles was not done by ourselves, similar extraction procedures were applied on both sources. *Bombyx eri* larvae cuticles, shrimp shells and *Hermitia illucens* powder were washed several times with water followed by ethanol and acetone and dried under vacuum to obtain unpurified chitin called **BE-0**, **S-0** and **HI-0** respectively. These unpurified chitin biomasses were first demineralized with a 1M hydrochloric acid solution at 95° for 35 minutes and neutralized with Milli-Q water until neutral pH. Then, the obtained demineralized chitins were deproteinized with 1M NaOH solution at 80 °C for 24 h, neutralized with Milli-Q water, washed with ethanol and acetone and then dried under vacuum to obtain purified chitin called **BE-2** (yield:25.2%), **S-2** (yield: 26.7%) and **HI-2** (yield: 25.5%) respectively.

2.5 Nitrogen content using Kjeldahl method

Nitrogen contents of the chitin samples before and after [C₂mim][OAc]- and DES-pretreatment were determined using the Kjeldahl method adapted from the literature (Díaz-Rojas et al. 2006). In brief, 100 mg of chitin biomasses was dissolved in 10 mL of concentrated sulfuric acid in presence of Kjeldahl catalyst (9 % CuSO₄.5H₂O). After heating at high temperature (>350 °C) until the solution became transparent without white smoke, the solution was cooled at room temperature. 70 mL of distilled water and 70 mL of a solution of NaOH 40 % (w/w) were added and distilled. The distillate was trapped in a 30 mL of Tashiro indicator solution and finally titrated with a solution of HCl 0.1M until the solution became violet. Chitin and protein contents determination are detailed in the electronic supporting information.

2.6 RTIL-pretreatment of chitin

BE-0, **BE-2**, **HI-0**, **HI-2**, **S-0** and **S-2**, have been pretreated with [C₂min][OAc] as already described by some of us (Huet et al. 2020, Husson et al. 2017). In brief, 5 g of chitin biomass was introduced in 250 mL of [C₂min][OAc] (0.2 % w/v) at 110 °C for 40 minutes under stirring. Then, 250 mL of MQ water was added to regenerate chitins. After filtration, the resulting solid was washed by a repetition of filtration and sonication with MQ water and lyophilized. Chitin obtains were called **BE-0-IL**, **BE-2-IL**, **HI-0-IL**, **HI-2-IL**, **S-0-IL**, and **S-2-IL** respectively. Yields are summarized in Table 1.

2.7 DES-pretreatment of chitin

Choline chloride (CC) was mixed with lactic acid (LA) in a molar ratio of 1:2 inside a glass bottle. The mixture was stirred overnight at 50°C to homogenize the solution before use. Then, **BE-0**, **BE-2**, **HI-0**, **HI-2**, **S-0** and **S-2** were pretreated with CC/LA DES. In brief, 2 g of chitin biomass was introduced in 100 mL of DES (0.2 % w/v) at 110 °C for 2 h under stirring. Then, 250 mL of Milli-Q water was added and filtered. The resulting solid was washed by a repetition of filtration and sonication with Milli-Q

water and finally lyophilized. Chitins obtained were called **BE-0-DES**, **BE-2-DES**, **HI-0-DES**, **HI-2-DES**, **S-0-DES** and **S-2-DES** respectively. Yields are summarized in Table 1.

2.8 Deacetylation of chitin

In a typical experiment, 500 mg of chitin from **BE**, **HI** or **S** sources was added to 25 mL of a solution of NaOH (50 % w/v) and the mixture was heated overnight (16 h) at 100°C under stirring. The solid was filtered and washed with MQ water until neutral pH. The recovered solid was then sonicated in MQ water and filtrated, this step was repeated 5 times. The resulting chitosan was finally washed successively with ethanol and acetone and dried under vacuum pump. Yields of **dBE**, **dHI** and **dS** are summarized in Table S1 (ESI) and Figure 3.

2.9 Oleic acid-grafted chitosan

Before chemical modification, all chitosan samples were grinded with a ball milling RETSCH MM400 (150W) in a 50mL stainless steel bowl (1.4112) with a stainless ball of 25mm diameter during 2min at 25Hz. The grafting has been processed using a slightly modified method reported by Niemczyk et al (Agata Niemczyk et al. 2019). In a typical experiment 600 mg of chitosan were solubilized into 60mL solution of 0.1M hydrochloric acid and ethanol 2:1 (v/v) and stirred for 3 hours at room temperature to ensure a complete solubilization of the chitosan. The pH was then raised between 5 and 6. In parallel, 1.2g of EDC.HCl and 2mL of oleic acid were mixed with ethanol (20 mL), stirred for 3h at room temperature and added dropwise to the chitosan solution. The mixture was stirred for 24h at room temperature and the solvents were then eliminated under reduced pressure. The residual solid was filtered and washed several times with hot ethanol. The functionalized chitosan was then stirred in hot cyclohexane for a day and then sonicated, filtered and dried under vacuum to remove all traces of adsorbed oleic acid.

2.10 Degrees of substitution

Degrees of substitution (DS) of chitosan samples have been evaluated thanks to the data obtained from the elemental analysis and following the Inukai's equation adapted to oleic acid: $DS = ((C/N) - (C/N)_{initial})/n$. (Inukai et al. 1998) Where (C/N) is the ratio between the carbon and nitrogen content of the product after grafting and (C/N)_{initial} is the ratio of carbon and nitrogen content of the chitosan before grafting. "n" represents the number of carbons added to one glucosamine unit by grafting oleic acid which is 18 in this case. The degrees of substitution (DS) of **OA-dBE-0-IL**, **OA-dBE-2**, **OA-dBE-2-IL**, **OA-dBE-2-DES**, **OA-dS-2-IL** are summarized in Table 2.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Extraction process, composition and purity

Chitins have been extracted using the classical chemical method involving two steps, demineralization and deproteinisation reactions, respectively (Huet et al. 2020). Two insect sources have been selected: (i) *Bombyx eri* larvae (**BE**) for which the extraction has already been reported by some of us (Huet et al. 2020) and (ii) the black fly soldier larvae *Hermetia illucens* (**HI**), one of the most promising insects studied as a new source of proteins/lipids for fish farming (Nogales-Mérida et al. 2019). Insects are also promising alternative for chitin/chitosan production as their breeding can be controlled and can produce homogenous chitin quality. Moreover, chitin biomass from insects contains less minerals than that of crustaceans (<6%) which means that at an industrial level, this difference results in a beneficial reduction in the cost, in the duration of the process and in the pollution caused by the wastewater treatment during the demineralization step. For comparison, this extraction has also been realized on shrimp shells (**S**). The samples were labelled “0” for the clean raw chitin biomasses (**BE-0**, **HI-0**, **S-0**) and “2” for the extracted chitins after the consecutive deproteinization and demineralization steps (**BE-2**, **HI-2** and **S-2**). The chitin purity, ash and protein contents for all samples are reported Table 1. Indeed, chitin contents of **BE-2**, **HI-2** and **S-2** are 93.3, 95.0 and 90.5 % respectively. These results show that this extraction, adapted for crustacean biomass, is also working on both insect biomasses for whom the ash and protein contents are lower than 0.5%. In addition, as shown in our first study, the demineralization step is not always required on insect biomass and could be skipped; however, in order to better compare **S-2** with **BE-2** and **HI-2**, the demineralization step was done for all samples (Huet et al. 2020).

Table 1. Characterization data of raw biomasses, extracted chitins and pretreated samples from insect cuticles and shrimp shells sources.

Chitin source	Water ^a (%)	Lipid ^b (%)	Ash content ^a (%)	Protein ^c (%)	Chitin purity ^c (%)	CrI ^d (%)	Yield ^e (%)
<i>Bombyx eri</i>							
BE-0	6.0	0.3	1.9	45.8	45.0	ND	-
BE-0-IL	8.3	ND	0.4	31.8	59.5	ND	60
BE-0-DES	4.2	ND	1.5	34.1	60.2	ND	45
BE-2	4.0	0	0.3	0	93.3	78	-
BE-2-IL	6.9	ND	1.0	0	99.0	76	93
BE-2-DES	2.5	ND	0.3	0.3	96.8	92	65
<i>Hermitia illucens</i>							
HI-0	4.8	1.14	1.8	60.3	33.0	ND	-
HI-0-IL	3.9	1.14	1	45.6	48.4	ND	50
HI-0-DES	5.0	ND	0.0	52.2	42.8	ND	55
HI-2	4.5	0.46	0.5	0.1	95.0	84	-
HI-2-IL	5.5	ND	0.2	0	94.2	76	95
HI-2-DES	4.1	ND	0.7	0	100.0	90	68
<i>Shrimp shells</i>							
S-0	9.2	0	30.4	47.8	22.9	ND	-
S-0-IL	11.0	0	34.0	20.6	36.2	ND	79
S-0-DES	8.13	ND	12.6	24.8	54.5	ND	56
S-2	7.0	ND	0.5	2.0	90.5	82	-
S-2-IL	8.7	0	0.4	2.3	91.2	77	92
S-2-DES	7.1	0	0.03	0	96.6	92	65

(a) determined using thermogravimetric analysis under nitrogen atmosphere from 50 to 800 °C followed by an isotherm at 800 °C under air for 30 minutes; (b) determined using the Soxhlet extraction method; (c) evaluated using the Kjeldahl method and using the methodology described by Diaz-Rojas et al. (Díaz-Rojas et al. 2006); (d) calculated using X-Ray diffractograms and the amorphous subtraction region method; (e) the yield of chitin was determined according to the weight difference of the raw material and extracted/pretreated chitin. ND: Not determined.

3.2 Impact of the pretreatment: IL versus DES

Among the imidazolium-based ILs, [C₂min][OAc] is probably one of the most efficient to solubilize chitin under mild conditions (110 °C for 40 min). It has already been demonstrated that [C₂min][OAc] can modify the supramolecular structure by disrupting the hydrogen network in the chitin structure leading to a slight decrease in the crystallinity indexes (Table 1 and see also ESI, Figures S1-S3). Since the raw biomasses **BE-0**, **HI-0** and **S-0** contain a large amount of proteins and minerals, the crystallinity indexes CrI, before and after pretreatment were not evaluated. This supramolecular modification by IL depends on the β parameter of the Kamlet Taft parameters either called neat basicity which must be superior to 0.5 (Shamshina 2019). The higher the β Kamlet-Taft parameter is, the higher the IL will be able to solubilize recalcitrant polymers such as chitin. Purified chitins **BE-2**, **S-2** and **HI-2** were partially soluble in [C₂min][OAc] whereas the raw biomasses (**BE-0**, **S-0** and **HI-0**) were not soluble. This result can be firstly explained by the presence of a large amount of proteins in the raw biomasses making it difficult for the IL to access the fibers. Secondly, the physico-chemical properties of the biopolymer such as the molecular weight (MW), or the DA are also of great importance and will

affect its solubility (Julia L. Shamshina 2019). Indeed, as depolymerization occurred during the 2-step extraction process, the MW of the purified chitin should be lower than the one contained in the raw biomasses. α -Chitin organizes itself with an anti-parallel pattern between fibers, which can be seen on FTIR spectra by the 2 characteristic peaks at 1660 cm^{-1} and 1620 cm^{-1} of the C-O bonding of the amide function (Figure 1). As described in our previous studies, [C₂min][OAc] pretreatment partially solubilizes chitin, breaking hydrogen bonds and disrupting its supramolecular structure. The chitin α -pattern is not observable anymore on the FTIR spectrum (Figure 1). Similar trends were observed on **BE-2-IL**, **S-2-IL** and **HI-2-IL** suggesting that the pretreatment was effective on all those sources. Due to the large amount of residual proteins in the raw materials, it was difficult to draw any conclusion from the FTIR spectra concerning the impact of the pretreatment and structural changes on **BE-0-IL**, **S-0-IL** and **HI-0-IL**. Indeed, peptide bonding of proteins also appears at 1660 cm^{-1} (See supporting information figure S4). However, we have previously demonstrated that an IL pretreatment on raw biomasses (**BE** and **S** sources), prior to enzymatic hydrolyses, leads to higher yields in *N*-acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose, suggesting a better access to the fibers than untreated materials, thus such pretreatment entailing an impact on the supramolecular structures of the chitin fibers (Huet et al. 2020). The ratio chitin/proteins/minerals for all samples were then evaluated using thermogravimetric analysis and the Kjeldahl method (Díaz-Rojas et al. 2006). The obtained data from the raw materials and listed Table 1, indicate the partial removal of some proteins, especially in the case of shrimp shells source where 56% of the proteins were eliminated. On the contrary, no effect on the minerals content is observed, regardless of the source.

DES based on choline chloride as a hydrogen bond acceptor, and organic acids (i.e. malonic acid, malic acid or lactic acid) as hydrogen bond donors are interesting solvents for polysaccharides dissolution and extraction processes of biomasses (Chen and Mu 2019). Chitin can be successfully extracted using organic acid based DES under mild conditions and short reaction times compared to the traditional chemical method (Zhu et al. 2017). However, depolymerization collaterally occurs, and these fast extractions using organic acid based DES generally lead to low molecular weight chitins depending on the nature of the organic acid, the temperature and the duration of the reaction (Bradić, Novak, and Likozar 2020). In this study, choline chloride-lactic acid (CC:LA) in a 1:1 ratio was chosen to pretreat both marine and insect raw materials, as well as pure chitins. 2h of pretreatment was used for the maximum preservation possible of the molecular weight of the polymer, and contrary to the majority of related literature, our samples were not ground. The FTIR spectrum before and after pretreatment of raw materials and extracted chitins were performed and are reported in Figure 1 (extracted chitins) and in the ESI Figure S4 (raw materials). Contrary to the IL-pretreatment, the α -pattern in chitin has been preserved during the pretreatment, since the two characteristic peaks at 1660 cm^{-1} and 1620 cm^{-1} of the amide C-O bonding are still observed on the FTIR spectrum of the DES-pretreated extracted chitin. However, similarly to IL-pretreated raw materials, DES-pretreated raw materials still contain a huge amount of proteins, hindering these two characteristic peaks. Contrary to IL-pretreatments, DES-

pretreatments on pure chitins induce a significant increase of the CrI due to the acidic nature of the DES, partially removing the amorphous regions. CrI are listed in Table 1. It is worth noting that the **BE-2-DES**, **HI-2-DES** and **S-2-DES** CrI are higher than 90 %. These values are similar to the one owned by chitin nanocrystals (Gueye et al. 2016). These results are fully in line with those obtained by FTIR where α -structures are maintained for these samples after the DES pretreatment. The amorphous regions removal can be also confirmed with the yields of pretreatment summarized in Table 1. By comparison to the obtained yields after IL pretreatment of the extracted chitins (**BE-2-IL**, **HI-2-IL** and **S-2-IL**) and the one obtained after DES pretreatment (**BE-2-DES**, **HI-2-DES** and **S-2-DES**), important differences can be observed. For example, a yield of 93 % has been calculated for **BE-2-IL** whereas only a 65 % has been determined for **BE-2-DES**. Since **BE-2** does not contain minerals and proteins, the observed loss in mass necessarily comes from the elimination of the amorphous regions. This is also the case for **HI-2** and **S-2** samples (95 % *versus* 68 % and 92 % *versus* 65 % respectively). The ratio chitin/proteins/minerals for all DES-pretreated samples were also evaluated and data are listed in Table 1. The obtained data indicate a lower effectiveness of the DES pretreatment to remove proteins. Indeed, a 48 % of the proteins were eliminated in the case of shrimp shells source versus a 56% after the IL-pretreatment. However, due to the acidic nature of the DES, almost 60% of the mineral content of the shrimp shell samples were eliminated.

Although both pretreatments are able to partially extract chitins from biomasses these data also suggest that DES and IL do not act in the same way. Indeed, from our previous study, it has been reported that [C₂min][OAc] pretreatment creates delaminated structures, detached thin sheets and, occasionally, separated microfibrils, from a denser and smoother untreated chitin material, as observed by SEM images (Figure 2 and see also ESI Figure S5) (Huet et al. 2020, Husson et al. 2017). On the contrary, SEM images corresponding to DES-pretreated extracted chitins (Figure 2) or DES-pretreated raw materials (Figures S5) do not show real changes in morphology compared to untreated chitins.

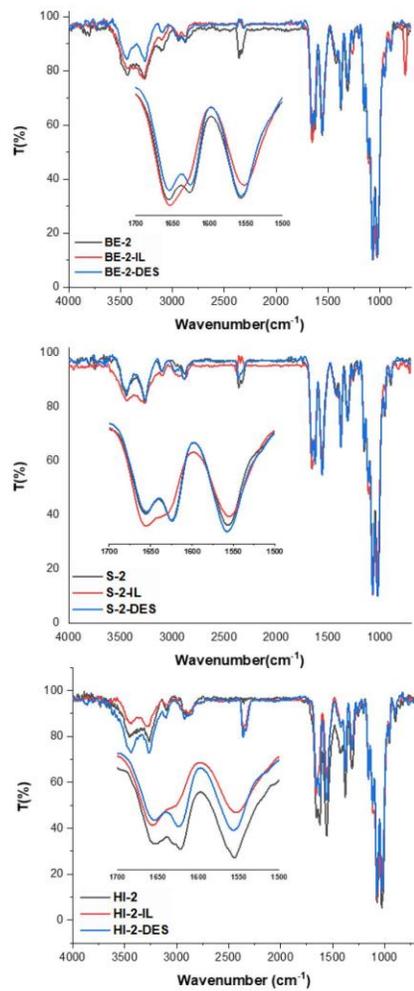


Fig. 1 ATR-FTIR spectra of extracted chitins (black lines), IL-pretreated extracted chitins (red lines) and DES-pretreated extracted chitins (blue lines) from BE, HI and S sources. Insets: Zoom of the 1700-1500 cm⁻¹ range.

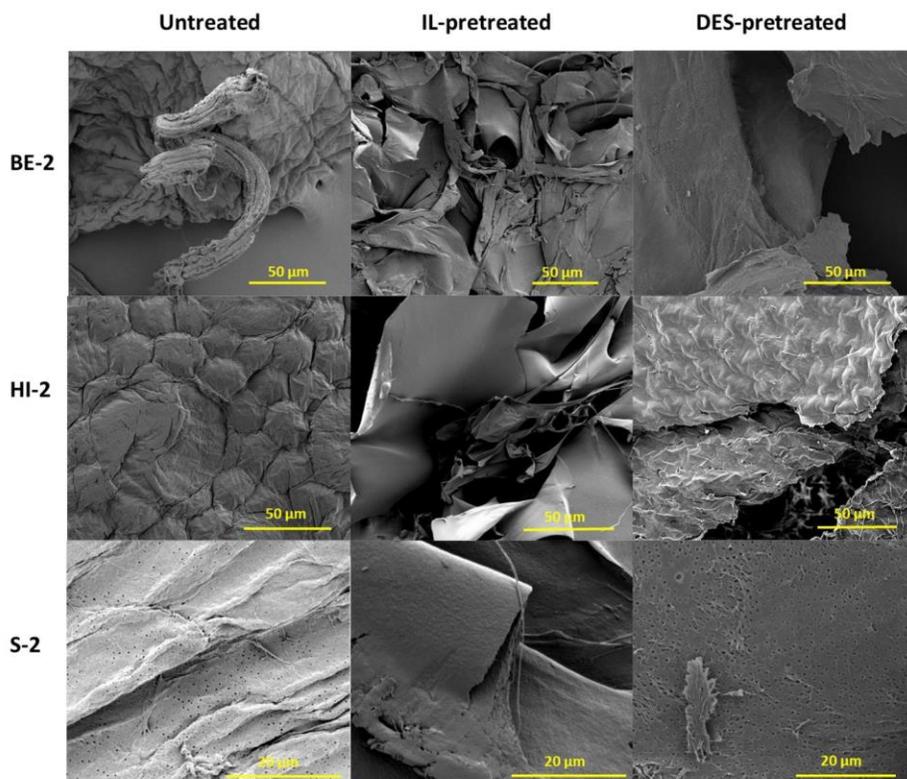


Fig. 2 SEM images of extracted chitins, IL-pretreated extracted chitins and DES-pretreated extracted chitins from BE, HI and S sources.

3.3 Synthesis of chitosans

The reaction effectiveness is strongly dependent on the polymer crystallinity and complete deacetylation is difficult to achieve without a specific procedure. Indeed, it has been shown that a highly crystalline chitin leads preferentially to a low deacetylation degree (Dhillon et al. 2013). By opening the crystalline structure of chitin, it is possible to make it more permeable to alkaline solutions, increasing the accessibility of the acetylated units to the alkali and facilitating their deacetylation. It is also important to underline that the chitosan quality also depends on the raw materials. In this study, chitosan preparations were carried out using heterogeneous conditions and the classical alkali deacetylation in concentrated NaOH (50 %, w/v) at 100 °C for 16 h, in one cycle of reaction. The determination of the degree of acetylation (DA) has been used to compare the ability of both pretreatments to enhance the efficiency of the reaction. This parameter is one of the most important since it affects the chitosan properties. DAs have been determined using solid-state CP-MAS ^{13}C NMR and data are reported in the ESI Figures S6-S11 (see also ESI, table S1). The impact of the pretreatment has been correlated with

the obtained DA values after deacetylation of **S-2** and IL/DES pretreated **S-2**. Indeed, chitosan from **S-2** presents a DA of 62 % while chitosans obtained from **S-2-IL** and **S-2-DES** were of 16 % and 38 % respectively. This tendency was significantly less marked with the two others sources: the DA value after deacetylation of **BE-2** was of 35 % while after IL and DES pretreatment the values were of 13% and 27 % respectively; and the DA value after deacetylation of **HI-2** was of 48 % while after IL and DES pretreatment the values were of 24 % and 40 % respectively. These results suggest that (i) the deacetylation efficiency is strongly dependent on the raw biomasses sources and seem to be more favorable without pretreatment, in the case of extracted chitins from insect sources; and (ii) the IL-pretreatment considerably enhances the deacetylation efficiency whatever the sources (Figure 3). This last observation is consistent with the slight decrease of the CrI. However, contrary to what is stated in the literature, our DES-pretreated samples have the highest CrI (>90%) together with lower DA values than the untreated samples. These results can be attributed to the fact that the DES-pretreatment removed part of the amorphous regions leading to low MW chitins, more sensitive to the deacetylation process. On the other hand, deacetylation reactions performed on raw biomasses **S-0** and IL/DES-pretreated **S-0** provided DA values of 14%, 19% and 20% respectively. Pretreatments do not seem to have any impact on the deacetylation efficiency when working with unpurified chitins. However, even though DA values are very low, high ash contents determined by TGA are still present on chitosan samples (up to 28%, see ESI Table S1). Same results can be observed in the case of the raw **BE** biomass. Indeed, after deacetylation of the untreated **BE-0**, a DA value of 23% was obtained, while after IL and DES pretreatment DA values of 17% and 18% were achieved. But, contrary to chitosan obtained from the **S-0** source, TGA data of untreated and pretreated **BE-0** samples (Table 1) together with solid state ¹³C NMR spectra (See ESI Figure S6) indicated that there were no impurities in the chitosan obtained from IL and DES-pretreated **BE-0**. Finally, solid-state CP-MAS ¹³C NMR spectra of deacetylated raw biomasses **HI-0** and IL-pretreated **HI-0** displayed higher DA values (43% and 44% respectively) than deacetylated DES-pretreated **HI-0** (24%). However, solid-state CP-MAS ¹³C NMR spectra also reveal the presence of a large amount of impurities with a broad peak in the 30-40 ppm range as already observed by Song and co-worker during the deacetylation of extracted chitin from blowfly (Song et al. 2013). These impurities were also present in the solid-state CP-MAS ¹³C NMR spectra of deacetylated **HI-2** and IL/DES-pretreated **HI-2**.

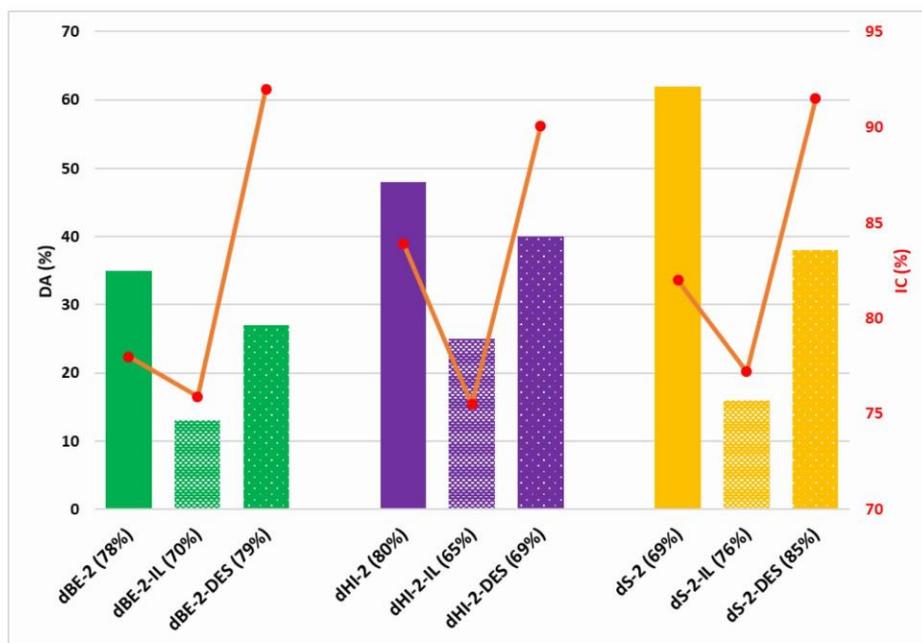


Fig. 3 Impact of IL/DES pretreatment on chitosan synthesis: DA values (bars) and CrI (red dots) for extracted **BE-2** (green), **HI-2** (purple) and **S-2** (yellow) sources. Values in parenthesis indicate the yield of deacetylation reactions.

The obtained yields based on the recovered mass after deacetylation of the extracted chitins and IL/DES-pretreated extracted chitins (**BE-2**, **HI-2** and **S-2**) are between 65 and 85 % and are listed Table S1 (ESI). These values are consistent with the calculated DAs, purity degrees of each starting material and the mass loss corresponding to the *N*-acetyl groups. In the cases of untreated and IL/DES-pretreated **BE-0** raw biomasses, as expected lower yields have been obtained (25, 35 and 51 % respectively). These results are mostly due to the lower chitin contents (between 45 and 60 %) and the removal of the proteins. Yields obtained from untreated and IL/DES-pretreated **HI-0** and **S-0** raw biomasses are slightly higher than **BE-0** sources due to the presence of impurities and minerals detected by solid state ^{13}C NMR and TGA respectively.

Since the solubility in acidic media together with the viscosity are strongly dependent on the MW and the DA, chitosans obtained from untreated and IL/DES-pretreated chitins were solubilized in 1 % acetic acid at a concentration of 10 mg/mL. Pictures of the solution have been reported Figure S12 (ESI). It is important to stress that the solubility study was performed on non-milled samples. As expected, and due to the large amount of impurities together with relatively high DA (up to 48 %), chitosans from **HI** (raw material and extracted chitins) were not soluble in acidic media. In addition, DES pretreatment does not enhance the solubility of the obtained chitosan compare to untreated samples

despite their lower DA values. This is probably due to the high CrI of the chitin after pretreatment. Among all the synthesized chitosans, **dB-E-2-IL** offers the highest transparency followed by **dS-2-IL**. These results can be ascribed to a very high sample purities and to low DA values (13 % and 16 % respectively). In addition, compared to **dB-E-0-IL** and **dS-0-IL** samples, **dB-E-2-IL** and **dS-2-IL** were synthesized from extracted chitins that underwent partial depolymerization during the extraction procedure leading to lower MW chitosans.

3.4 Selective amidation of chitosan with fatty acid

Considering the previous results and taking into account their purity and solubility properties, amidation reactions were performed on chitosans **dB-E-2**, **dB-E-2-IL**, **dB-E-2-DES**, **dB-E-0-IL** and **dS-2-IL**. A fatty acid has been selected for the chitosan modification since it is well known that chitosan-fatty acid derivatives are considered as amphiphilic products, suitable for biomedical applications (Agata Niemczyk et al. 2019, Bonferoni et al. 2014, Du et al. 2009). Indeed, these derivatives possess unique physico-chemical properties, including high thermal stability, antimicrobial activity or improved lubricity (Agata Niemczyk, El Fray, and E. Fraklin 2015, A Niemczyk et al. 2016). The grafting has been processed using a modified method reported by Niemczyk et al (Agata Niemczyk et al. 2019) in the presence of EDC activation enabling the carboxylic groups to react with a nucleophile by controlling the pH. Given that $-NH_2$ groups are stronger nucleophiles than $-OH$ groups, the *N*-acylation is favored and the *O*-acylation become almost impossible. The authors have demonstrated that by controlling the pH of the reaction (4.5-5), it was possible to partially protect the amino groups leading to *O*- and *N*-acylated chitosan. They have also reported a correlation between the fatty acid saturation (chain mobility) and the degree of substitution. Therefore, oleic acid, a mono-unsaturated omega-9 fatty acid, was chosen for this study and the pH of the reaction was raised to 6 in order to promote the *N*-acylation. To improve the reaction and facilitate its solubility in the reaction medium, chitosan samples were milled into powder. In addition, to provide reliable degrees of substitution, adsorbed oleic acid on the chitosan surface was eliminated by washing abundantly the final product with hot ethanol, followed by cyclohexane washing aided by ultrasounds.

FTIR spectra of chitosans and chitosan-fatty acid derivatives obtained from **BE** and **S** sources are presented in Figure 4 and Figures S13 to S16 in the ESI. As shown in Figure 4, concerning **dB-E-2-IL** and **OA-dB-E-2-IL** IR spectra, the formation of the amide bond has been highlighted by the increased intensity of the band at 1648 cm^{-1} (C=O stretching vibration) and the presence of the band 1553 cm^{-1} (NH bending vibration, amide II band). A significant increase in absorption centered at 2935 and 2849 cm^{-1} together with the presence of the low bands at 1458 and 1419 cm^{-1} corresponding to the alkyl chain are also observed. In addition, no band around 1740 cm^{-1} as described by Le Tien et al. (Le Tien et al. 2003) was observed suggesting that the *O*-acylation did not occur during the reaction. Same results have been observed for the functionalized chitosans **OA-dB-E-0-IL** and **OA-dS-2-IL** (ESI, figures S13 and

S16), while in the case of the grafting performed with **dB**E-2 and **dB**E-2-DES (ESI, Figures S14 and S15), the reaction seems to be less efficient.

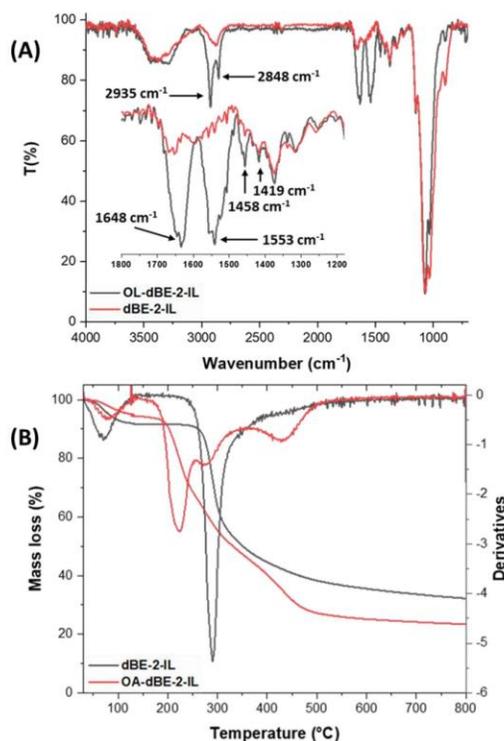


Fig. 4 (A) FTIR spectra of **dB**E-2-IL (black line) and **OA-dB**E-2-IL (red line). Inset: zoom of the 1200-1800 cm^{-1} region. (B) Thermogravimetric and differential thermal analysis **dB**E-2-IL (black line) and **OA-dB**E-2-IL (red line) under argon atmosphere from 50 to 800 °C.

Thermal degradation of **dB**E-IL-2 and **OA-dB**E-IL-2 was studied using thermogravimetric analysis performed between room temperature and 800 °C (Figure 4B). As described in the literature, the thermal decomposition of chitosan occurs in 2 stages. The first one, at lower temperature (<130 °C), is assigned to releasing of adsorbed water and the second one ranging from 200 to 530 °C is related to the chitosan degradation, mainly deacetylation and depolymerization reactions occurring through the cleavage of glycosidic bonds (dehydration and deamination) (Moussout, Aazza, and Ahlafi 2020, Marroquin, Rhee, and Park 2013). It was clearly observed that chitosan fatty acid derivative (**OA-dB**E-IL-2) exhibited 4 stages of degradation, the first one, below 130 °C corresponding to the loss of adsorbed water, the second from 155 °C to 250 °C is related to the OA moiety degradation, the following stage is

related to the polysaccharide degradation, and nearly coincident with that of the starting chitosan, while the last stage (centered at about 450°C) is the degradation of pyranose rings into short-chain organic acids (Marroquin, Rhee, and Park 2013). This is something previously observed in alkyl-functionalized chitosans, in which the dangling groups may form free radicals capable of reacting with the remaining chitosan backbone (Ziegler-Borowska et al. 2016). The obtained data confirm that the introduction of the alkyl chains in our chitosan derivative reduces its thermal stability and induces a different degradation pathway.

Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of **dBE-IL-2** and **OA-dBE-IL-2** are represented Figure 5A and 5B respectively. Concerning the chitosan, in the 50-110 ppm region, a typical resonance corresponding to the anomeric carbons, the one attached to amino group and the one of the rings, are observed. In addition, the carbonyl and methyl groups of *N*-acetylglucosamine units are found at 175.0 ppm and 23.7 ppm respectively (Duarte et al. 2001, A Niemczyk et al. 2016). After functionalization, additional peaks can be observed (blue-shaded regions, Figure 5B) at 131.0 ppm and in the 10-40 ppm range, and can be assigned to the C=C and to the CH₃/CH₂ of the oleic acid monounsaturated chain. The shift and the increase in the intensity of the peak at 178.6 ppm can be attributed to the amide formation between chitosan and the carboxylic group of oleic acid. Similar results were observed for **OA-dBE-0-IL** and **OA-dS-2-IL** (Figures S17 and S17, ESI) while no additional peaks were observed in the other cases.

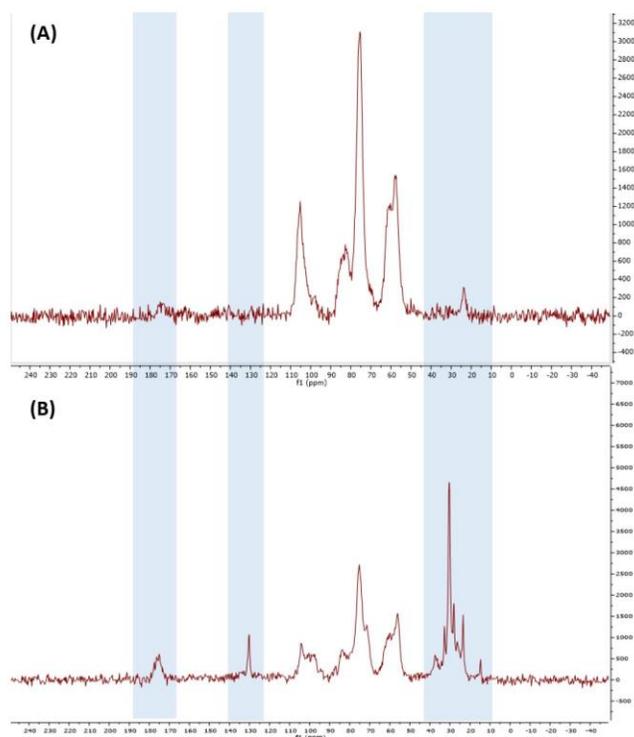


Fig. 5 Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of **dBE-IL-2** (A) and **OA-dBE-IL-2** (B).

Degrees of substitution (DS) of chitosan samples were evaluated thanks to the data obtained from the elemental analysis and following the Inukai's equation adapted to oleic acid (Inukai et al. 1998, Lago et al. 2011). Elemental composition (weight %C, %H and %N) and DS are summarized Table 2. The results clearly demonstrated that the reaction performed on IL-pretreated chitosans (**dBE-0-IL**, **dBE-2-IL** and **dS-2-IL**) leads to higher DSs (24.5%, 27.4% and 17.2 % respectively) compared to those obtained after reaction on untreated chitosan **BE-2** or **dBE-2-DES** (0.9% and 0.4% respectively). These data are in correlation with the FTIR spectra and solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of the OA-chitosan derivatives. Another interesting point concerns the DS value of **OA-dBE-0-IL** very close to one of **OA-dBE-2-IL** suggesting that this biomass without any further demineralization and deproteinization step offers a sufficient chitin quality to obtain chitosan almost devoid of impurities that could interfere in the coupling between oleic acid and chitosan.

Table 2. Microanalysis data (%C, %H and %N) and DS.

compounds	%C	%H	%N	DS (%)
<i>Bombyx eri</i>				
<i>dBE-0-IL</i>	43.2	6.7	7.6	-
<i>OA-dBE-0-IL</i>	52.7	8.1	5.2	24.5
<i>dBE-2</i>	43.2	6.7	7.7	-
<i>OA-dBE-2</i>	45.1	7.3	6.2	0.9
<i>dBE-2-IL</i>	43.0	6.9	7.7	-
<i>OA-dBE-2-IL</i>	51.6	8.0	4.9	27.4
<i>dBE-2-DES</i>	42.9	6.5	7.4	-
<i>OA-dBE-2-DES</i>	44.0	7.1	6.8	0.5
<i>Shrimp shells</i>				
<i>dS-2-IL</i>	43.0	6.9	7.8	-
<i>OA-dS-2-IL</i>	50.5	8.1	5.1	17.2

4. CONCLUSIONS

IL and DES solvent became very popular in the field of polysaccharides for their strong ability to extract and to dissolve these biopolymers, particularly for chitin. Therefore, it can be hard to distinguish the real advantages of using IL or DES in the treatment of chitin biomasses. The comparative study conducted in this manuscript highlights that even if both solvents are able to remove proteins from raw biomasses, IL seems to be more efficient (up to 56% for shrimp biomass). The acidic nature of DES solvent can also remove a large mineral content (42%, **S-0-DES**) for shrimp shells whereas IL remains inefficient. In addition, IL and DES do not have the same impact on the chitin's supramolecular structure. Indeed, the α -pattern is not anymore observable on the FTIR spectrum of extracted chitin whatever the sources, suggesting the high ability of IL to modify the chitin's structure whereas the α -polymorphism remains present with the DES-pretreatment. The high CrI (> 90%) for the purified chitin **BE-2-DES**, **HI-2-DES** and **S-2-DES** indicates the removal of amorphous region and consequently a strong depolymerization process leading to low molecular weight. On the contrary, IL has less effect on the chitin depolymerization and is a suitable solvent to keep chitin with a high molecular weight (Wineinger et al. 2020) than DES. The slight decrease in the CrI value for **BE-2-IL**, **HI-2-IL** and **S-2-IL** compared to untreated biomass has a direct impact on the deacetylation step suggesting that chitin amorphization is one key to afford chitosan with low acetylation degree. With the highest CrI value, DES-samples also led to chitosan with higher deacetylation degree than untreated samples but inferior to IL-pretreatment. Keeping in mind that amorphization is one key-step to obtain chitosan with low DA, it should be expected a higher DA for all DES-samples. The low molecular weight combined to the fact that the acidic DES was able to protonate the few NH_2 groups present in chitin and hence repelling the fibers by offering a better accessibility to NaOH is a reasonable explanation (Mukesh et al. 2014). Among all the synthesized chitosans, **dB-E-2-IL** presents the better solubility and transparency due to a very high sample purity and low DA. Finally, a selective amidation reaction with oleic acid has been conducted in water media by controlling the pH. The calculated DS demonstrated that chitosan obtained

from chitin IL-pretreatment affords the highest values from 17.2% to 27.4% whereas the grafted oleic acid on chitosan obtained from DES-treatment led to poor DS value (0.4-0.9%).

To sum up, we demonstrated that IL and DES impact differently on chitin in terms of crystallinity, molecular weight and deacetylation step. Despite its toxicity controversy, IL is a suitable solvent for chitin amorphization whereas DES will preserve the α -chitin polymorphism and high crystallinity. These two families of solvents offer different physical and chemical properties to chitin and can cover a vast range for chitin's applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

ANVN thanks the ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche for financial support. J.M.G.-D. greatly acknowledges the Spanish MINEICO for his 'Juan de la Cierva Incorporation' contract, and associated research funds (ref. IJCI-2016-27789), as well as financial support from the regional government of Aragón (Grupo Reconocido DGA T03_17R, FEDER/UE and DGA-T03_20R).

References

- Altıok, Duygu, Evren Altıok, and Funda Tihminlioglu. 2010. "Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21: 2227–36.
- Anwar, Muslih, Ayu Septi Anggraeni, and M. Harisuddin Al Amin. 2017. "Comparison of Green Method for Chitin Deacetylation." *AIP Conference Proceedings* 1823: 020071.
- Aspras, Izabela, Malgorzata M. Jaworska, and Andrzej Górak. 2017. "Kinetics of Chitin Deacetylase Activation by the Ionic Liquid [Bmim][Br]." *Journal of Biotechnology* 251: 94–98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.015>.
- Bajaj, Mini, Josef Winter, and Claudia Gallert. 2011. "Effect of Deproteination and Deacetylation Conditions on Viscosity of Chitin and Chitosan Extracted from Crangon Crangon Shrimp Waste." *Biochemical Engineering Journal* 56: 51–62.
- Bonferoni, M. C. et al. 2014. "Ionic Polymeric Micelles Based on Chitosan and Fatty Acids and Intended for Wound Healing. Comparison of Linoleic and Oleic Acid." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87: 101–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.12.018>.
- Bradić, B, U Novak, and B Likozar. 2020. "Crustacean Shell Bio-Refining to Chitin by Natural Deep Eutectic Solvents." *Green Process Synthesis* 9: 13–25.
- Chen, Yu, and Tiancheng Mu. 2019. "Application of Deep Eutectic Solvents in Biomass Pretreatment and Conversion." *Green Energy and Environment* 4: 95–115. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.01.012>.

- Dhillon, Gurpreet Singh, Surinder Kaur, Satinder Kaur Brar, and Mausam Verma. 2013. "Green Synthesis Approach: Extraction of Chitosan from Fungus Mycelia." *Critical Reviews in Biotechnology* 33: 379–403.
- Díaz-Rojas, Erika I. et al. 2006. "Determination of Chitin and Protein Contents during the Isolation of Chitin from Shrimp Waste." *Macromolecular Bioscience* 6(5): 340–47.
- Du, Yong Zhong et al. 2009. "Preparation and Characteristics of Linoleic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelles as a Carrier for Doxorubicin." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 69: 257–63.
- Duarte, M. L., M. C. Ferreira, M. R. Marvão, and João Rocha. 2001. "Determination of the Degree of Acetylation of Chitin Materials by ¹³C CP/MAS NMR Spectroscopy." *International Journal of Biological Macromolecules* 28(5): 359–63.
- Elgadir, M. Abd et al. 2015. "Impact of Chitosan Composites and Chitosan Nanoparticle Composites on Various Drug Delivery Systems: A Review." *Journal of Food and Drug Analysis* 23: 619–29.
- Gadgey, Kishore Kumar, and Amit Bahekar. 2017. "Studies on Extraction Methods of Chitin from Crab Shell and Investigation of Its Mechanical Properties." *International Journal of Mechanical Engineering and Technology* 8: 220–31.
- Gueye, Serigne et al. 2016. "Chronic Tubulointerstitial Nephropathy Induced by Glucosamine: A Case Report and Literature Review." *Clinical Nephrology* 86: 106–10.
- Hamed, Imen, Fatih Özogul, and Joe M. Regenstein. 2016. "Industrial Applications of Crustacean By-Products (Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides): A Review." *Trends in Food Science and Technology* 48: 40–50.
- Hong, Shu et al. 2018. "Versatile Acid Base Sustainable Solvent for Fast Extraction of Various Molecular Weight Chitin from Lobster Shell." *Carbohydrate Polymers* 201: 211–17. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.059>.
- Huet, Gael et al. 2020. "Straightforward Extraction and Selective Bioconversion of High Purity Chitin from Bombyx Eri Larva : Toward an Integrated Insect Biorefinery." *Carbohydrate Polymers* 228: 115382. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115382>.
- Husson, Eric et al. 2017. "Effect of Room Temperature Ionic Liquids on Selective Biocatalytic Hydrolysis of Chitin via Sequential or Simultaneous Strategies." *Green Chemistry* 19: 4122–31. <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2017/GC/C7GC01471F>.
- Iacob, Andreea Teodora et al. 2018. "Preparation, Characterization and Wound Healing Effects of New Membranes Based on Chitosan, Hyaluronic Acid and Arginine Derivatives." *Polymers* 8(6): 1–19.
- Inukai, Yoshinari et al. 1998. "Selective Separation of Germanium(IV) by 2,3-Dihydroxypropyl Chitosan Resin." *Analytica Chimica Acta* 371: 187–93.
- Khanafari, A, R Marandi, and Sh Sanathei. 2008. "Recovery of Chitin and Chitosan from Shrimp Waste by Chemical and Microbial Methods." *J. Environ. Health* 5: 19–24.

- Lago, M. A. et al. 2011. "Compilation of Analytical Methods to Characterize and Determine Chitosan, and Main Applications of the Polymer in Food Active Packaging." *CYTA - Journal of Food* 9: 319–28.
- Liu, Shaofang et al. 2012. "Extraction and Characterization of Chitin from the Beetle *Holotrichia Parallela* Motschulsky." *Molecules* 17: 4604–11.
- Ma, Jia, and Yogeshwar Sahai. 2013. "Chitosan Biopolymer for Fuel Cell Applications." *Carbohydrate Polymers* 92: 955–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.015>.
- Marroquin, Jason B., K. Y. Rhee, and S. J. Park. 2013. "Chitosan Nanocomposite Films: Enhanced Electrical Conductivity, Thermal Stability, and Mechanical Properties." *Carbohydrate Polymers* 92(2): 1783–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.042>.
- Menzies, Kara L, and Lyndon Jones. 2010. "The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials." *Optometry and Vision Science* 87: 387–99.
- Moussout, Hamou, Mustapha Aazza, and Hammou Ahlafi. 2020. *Chapter 5 : Thermal Degradation Characteristics of Chitin, Chitosan, Al₂O₃/Chitosan, and Benonite/Chitosan Nanocomposites*.
- Mukesh, Chandrakant, Dibyendu Mondal, Mukesh Sharma, and Kamalesh Prasad. 2014. "Choline Chloride – Thiourea , a Deep Eutectic Solvent for the Production of Chitin Nanofibers." *Carbohydrate Polymers* 103: 466–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.082>.
- Di Nardo, Thomas, Caroline Hadad, Albert Nguyen Van Nhien, and Audrey Moores. 2019. "Synthesis of High Molecular Weight Chitosan from Chitin by Mechanochemistry and Aging." *Green Chemistry* 21: 3276–85.
- Niemczyk, A, A Kmiecik, M El Fray, and A Piegat. 2016. 21 Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives *The Influence of C18-Fatty Acids on Chemical Structure of Chitosan Derivatives and Their Thermal Properties*.
- Niemczyk, Agata et al. 2019. "Biofunctional Catheter Coatings Based on Chitosan-Fatty Acids Derivatives." *Carbohydrate Polymers* 225: 115263.
- Niemczyk, Agata, Mirosława El Fray, and Steve E. Franklin. 2015. "Friction Behaviour of Hydrophilic Lubricious Coatings for Medical Device Applications." *Tribology International* 89: 54–61.
- Nogales-Mérida, Silvia et al. 2019. "Insect Meals in Fish Nutrition." *Reviews in Aquaculture* 11(4): 1080–1103.
- Pan, Yan et al. 2002. "Bioadhesive Polysaccharide in Protein Delivery System.Pdf." *International Journal of Pharmaceutics* 249: 139–47.
- Ruggeri, S. et al. 2019. "Chemical and Electrochemical Properties of a Hydrophobic Deep Eutectic Solvent." *Electrochimica Acta* 295: 124–29.
- Shamshina, J. L. et al. 2016. "Pulping of Crustacean Waste Using Ionic Liquids: To Extract or Not to Extract." *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 4: 6072–81.
- Shamshina, Julia L. 2019. "Chitin in Ionic Liquids: Historical Insights into the Polymer's Dissolution and Isolation. A Review." *Green Chemistry* 21: 3974–93.

- Singh, Balvant Shyam, Hyacintha Rennet Lobo, and Ganapati Subray Shankarling. 2012. "Choline Chloride Based Eutectic Solvents: Magical Catalytic System for Carbon-Carbon Bond Formation in the Rapid Synthesis of β -Hydroxy Functionalized Derivatives." *Catalysis Communications* 24: 70–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2012.03.021>.
- Song, Chao et al. 2013. "Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chitosan from the Blowfly *Chrysomya Megacephala* Larvae." *International Journal of Biological Macromolecules* 60: 347–55.
- Le Tien, Canh, Monique Lacroix, Pompilia Ispas-Szabo, and Mircea Alexandru Mateescu. 2003. "N-Acylated Chitosan: Hydrophobic Matrices for Controlled Drug Release." *Journal of Controlled Release* 93: 1–13.
- Vicente, Filipa A., Bojana Bradić, Uroš Novak, and Blaž Likozar. 2020. " α -Chitin Dissolution, N-Deacetylation and Valorization in Deep Eutectic Solvents." *Biopolymers* 111: 1–9.
- Wang, Jianlong, and Can Chen. 2014. "Chitosan-Based Biosorbents: Modification and Application for Biosorption of Heavy Metals and Radionuclides." *Bioresource Technology* 160: 129–41.
- Wineinger, Hannah B. et al. 2020. "A Method for Determining the Uniquely High Molecular Weight of Chitin Extracted from Raw Shrimp Shells Using Ionic Liquids." *Green Chemistry* 22(12): 3734–41.
- Young-Hee, Lee et al. 2008. "Oxidative Stress Resistance through Blocking Hsp60 Translocation Followed by SAPK/JNK Inhibition in Aged Human Diploid Fibroblast." *Cell biochemistry and function* 26: 320–28.
- Zdanowicz, Magdalena, Katarzyna Wilpiszewska, and Tadeusz Spychaj. 2018. "Deep Eutectic Solvents for Polysaccharides Processing. A Review." *Carbohydrate Polymers* 200: 361–80. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.078>.
- Zhao, Xinhui et al. 2018. "Deep Eutectic-Solvothermal Synthesis of Nanostructured Fe₃S₄ for Electrochemical N₂ Fixation under Ambient Conditions." *Chemical Communications* 54: 13010–13.
- Zhu, Ping, Zhongji Gu, Shu Hong, and Hailan Lian. 2017. "One-Pot Production of Chitin with High Purity from Lobster Shells Using Choline Chloride–Malonic Acid Deep Eutectic Solvent." *Carbohydrate Polymers* 177: 217–23. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.001>.
- Ziegler-Borowska, Marta, Dorota Chelminiak, Halina Kaczmarek, and Anna Kaczmarek-Kędziera. 2016. "Effect of Side Substituents on Thermal Stability of the Modified Chitosan and Its Nanocomposites with Magnetite." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 124(3): 1267–80.

IL *versus* DES: Impact on chitin pretreatment to afford high quality and highly functionalizable chitosan

Gaël Huet,^a Caroline Hadad,^a Jose M. González-Domínguez,^b Matthieu Courty,^c Arash Jamali,^d Dominique Cailleu^e and Albert Nguyen van Nhien*^a

^a Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources, UMR CNRS 7378, Université de Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu - UFR des Sciences – 80039 Amiens cedex, France.

^b Group of Carbon Nanostructures and Nanotechnology, Instituto de Carboquímica (ICB-CSIC), C/Miguel Luesma Castán 4, 50018 Zaragoza (Spain).

^c Laboratoire de Réactivité et Chimie des Solides, UMR CNRS 7314, Université de Picardie Jules Verne, HUB de l'Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

^d Plateforme de Microscopie Electronique – Université de Picardie Jules Verne, HUB de l'Energie, 33 rue Saint Leu - 80039 Amiens Cedex, France.

^e Plateforme analytique, Université de Picardie Jules Verne, UFR des Sciences Bâtiment Serres-Transfert Rue Dallery - Passage du sourire d'Avril 80039 AMIENS Cedex 1, France.

*E-mail : albert.nguyen-van-nhien@u-picardie.fr

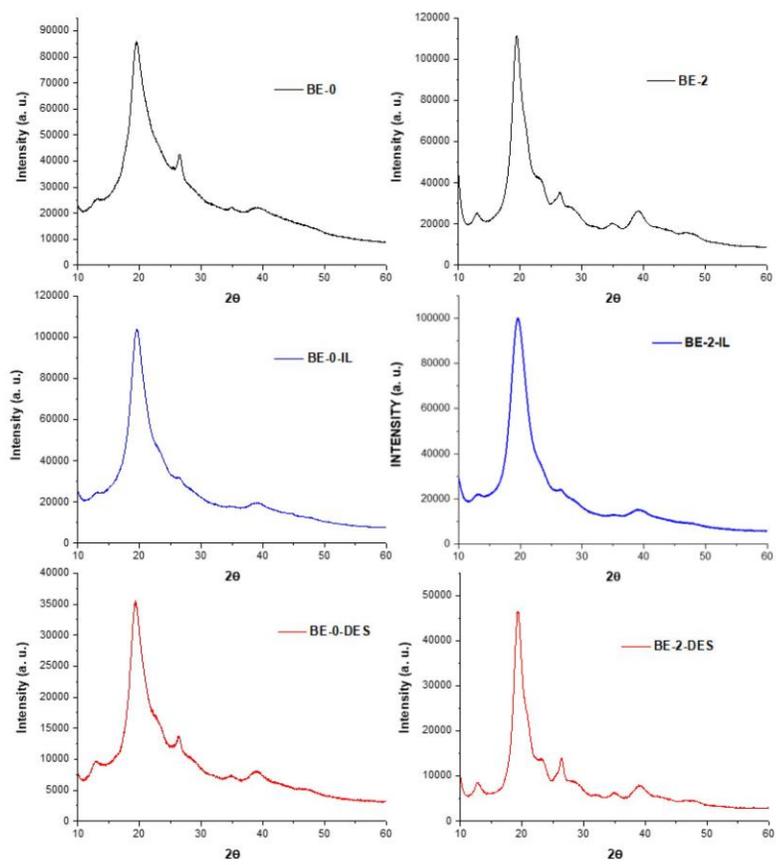


Fig. S1 XRD of raw material and extracted chitin (black lines), IL-pretreated raw material and extracted chitin (blue lines) and DES-pretreated raw material and extracted chitin (red lines) from BE source.

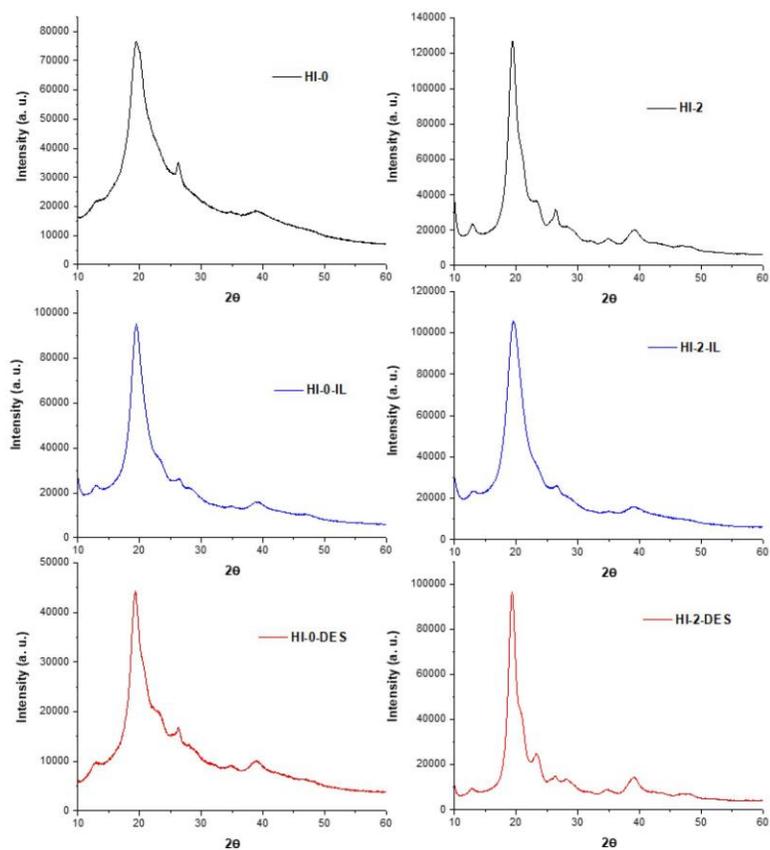


Fig. S2 XRD of raw material and extracted chitin (black lines), IL-pretreated raw material and extracted chitin (blue lines) and DES-pretreated raw material and extracted chitin (red lines) from HI source.

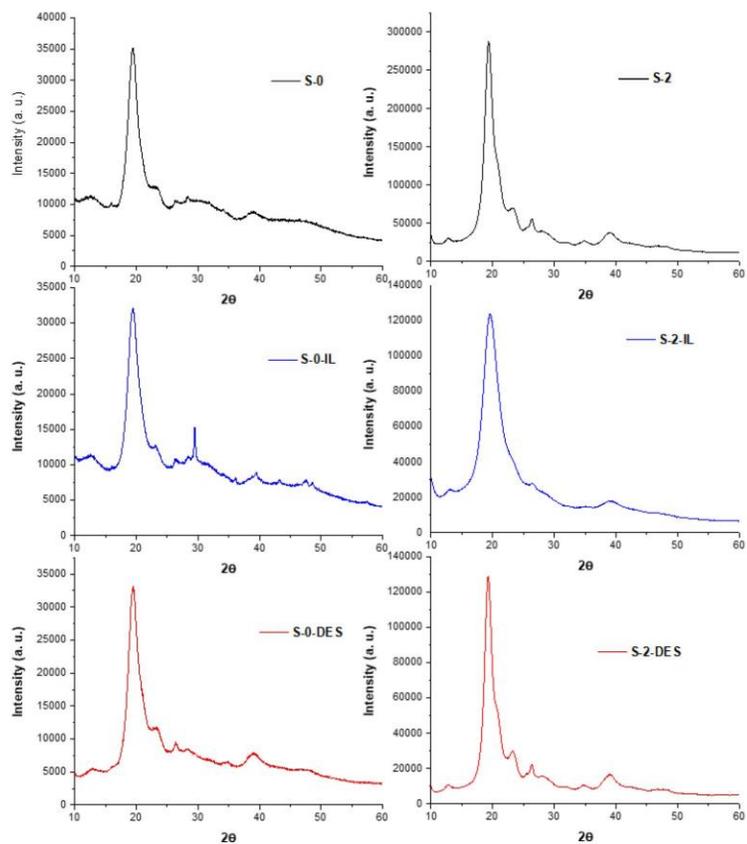


Fig. S3 XRD of raw material and extracted chitin (black lines), IL-pretreated raw material and extracted chitin (blue lines) and DES-pretreated raw material and extracted chitin (red lines) from S source.

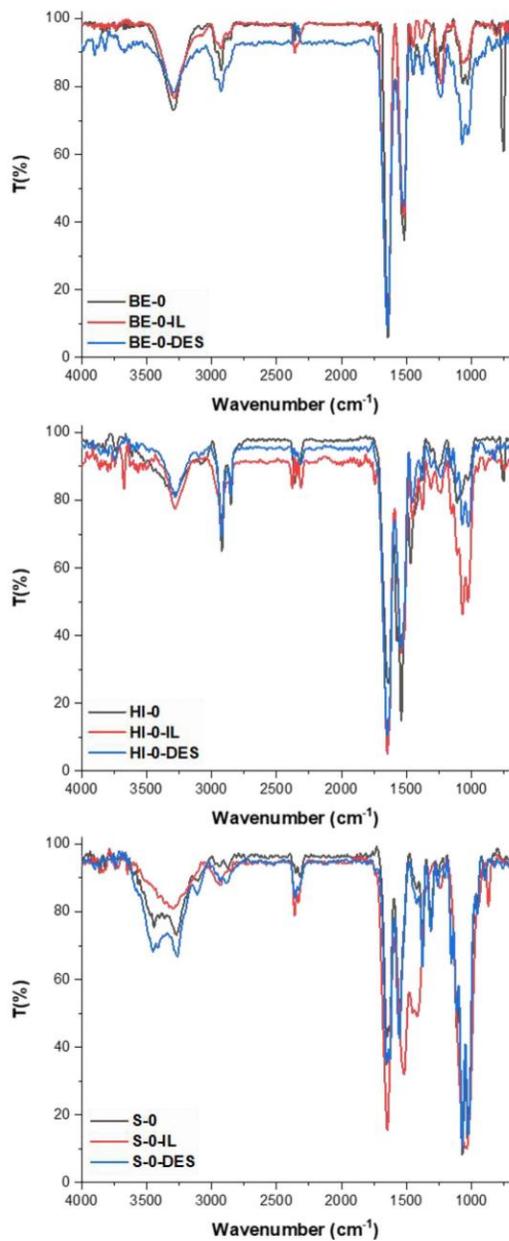


Fig. S4 ATR-FTIR spectra of raw material (black line), IL-pretreated raw material (red line) and DES-pretreated raw materials (blue line) from BE, HI and S sources.

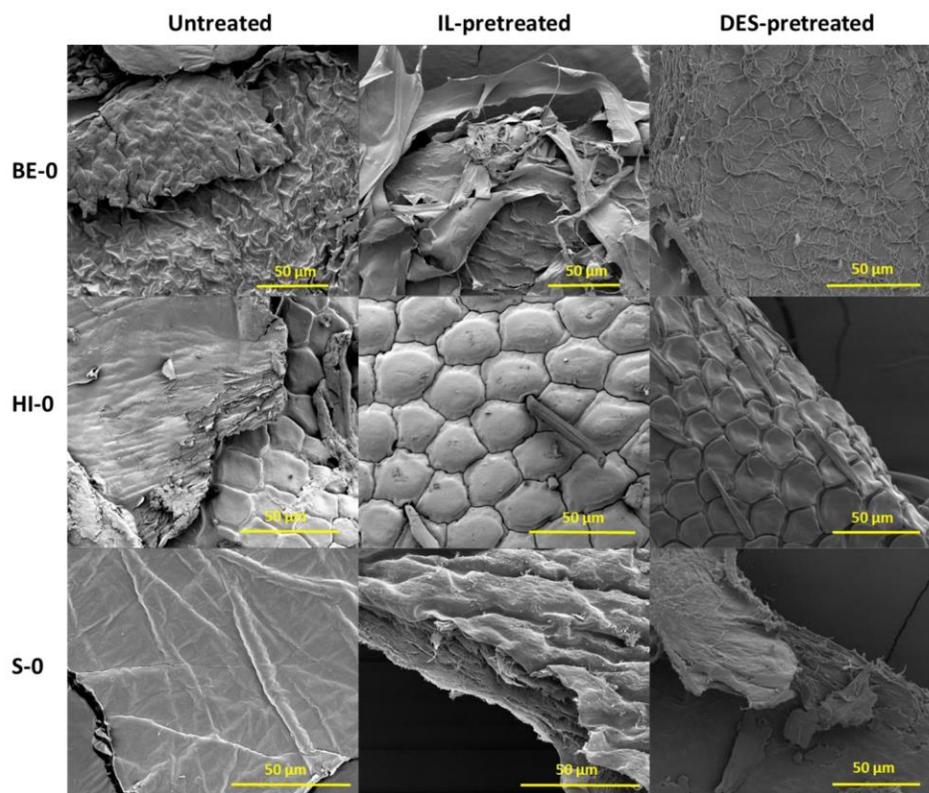


Fig. 5 SEM images of raw materials, IL-pretreated raw materials and DES-pretreated raw materials from BE, HI and S sources.

Table S1. Yields, acetylation degrees (DA) and ash contents of chitosans synthesized from untreated and IL/DES-pretreated BE, HI and S sources.

Chitosan source	Yield ^a (%)	DA ^b (%)	Ash content ^c (%)
<i>Bombyx eri</i>			
<i>d</i> BE-0	25	23 ± 1.2	ND
<i>d</i> BE-0-IL	35	17 ± 0.9	ND
<i>d</i> BE-0-DES	51	18 ± 0.9	ND
<i>d</i> BE-2	78	35 ± 1.8	ND
<i>d</i> BE-2-IL	70	13 ± 0.7	ND
<i>d</i> BE-2-DES	79	27 ± 1.4	ND
<i>Hermitia illucens</i>			
<i>d</i> HI-0	48	43 ± 2.2	ND
<i>d</i> HI-0-IL	48	44 ± 2.2	ND
<i>d</i> HI-0-DES	36	24 ± 1.2	ND
<i>d</i> HI-2	80	48 ± 2.4	ND
<i>d</i> HI-2-IL	65	25 ± 1.3	ND
<i>d</i> HI-2-DES	69	40 ± 2.0	ND
<i>Shrimp shells</i>			
<i>d</i> S-0	38	14 ± 0.7	22.53 ± 0.23
<i>d</i> S-0-IL	45	19 ± 1.0	28.04 ± 0.28
<i>d</i> S-0-DES	49	20 ± 1.0	ND
<i>d</i> S-2	69	62 ± 3.1	3.26 ± 0.03
<i>d</i> S-2-IL	76	16 ± 0.8	0.35 ± 0.01
<i>d</i> S-2-DES	85	38 ± 1.9	ND

(a) The yield of chitosan was determined according to the weight difference of the chitin and the obtained chitosan; (b) evaluated by solid-state CP-MAS ¹³C NMR; (c) determined using thermogravimetric analysis under nitrogen atmosphere from 50 to 800 °C following by an isotherm at 800 °C under air for 30 min. ND = Not determined.

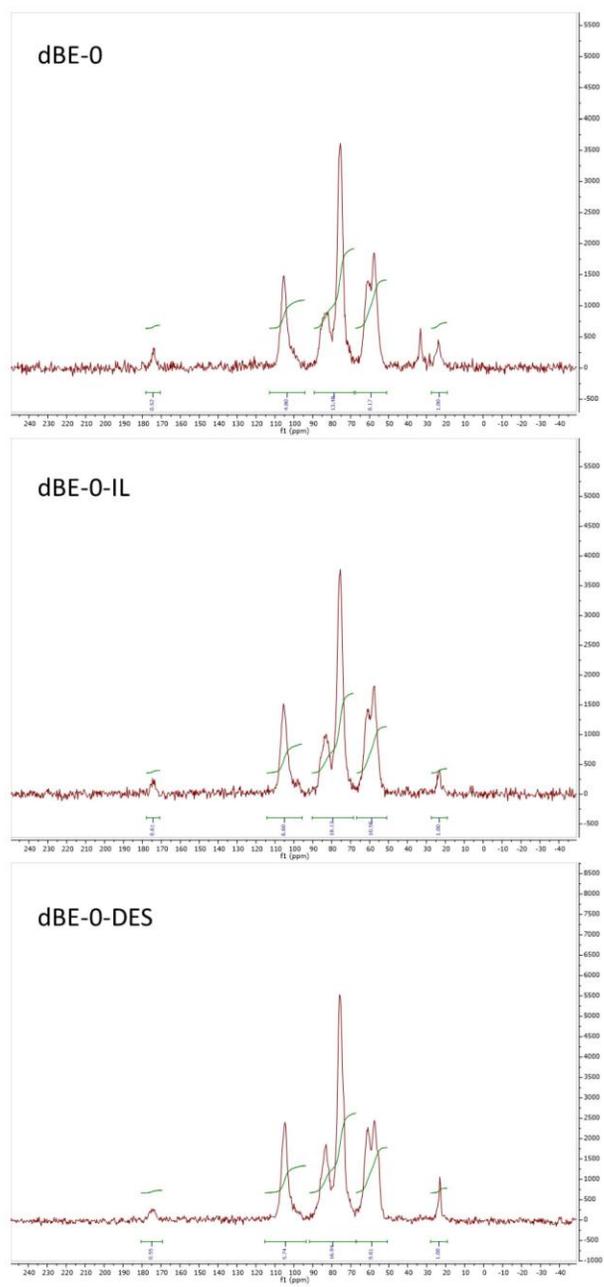


Fig. S6 Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of chitosans from untreated and IL/DES-pretreated BE-0 source.

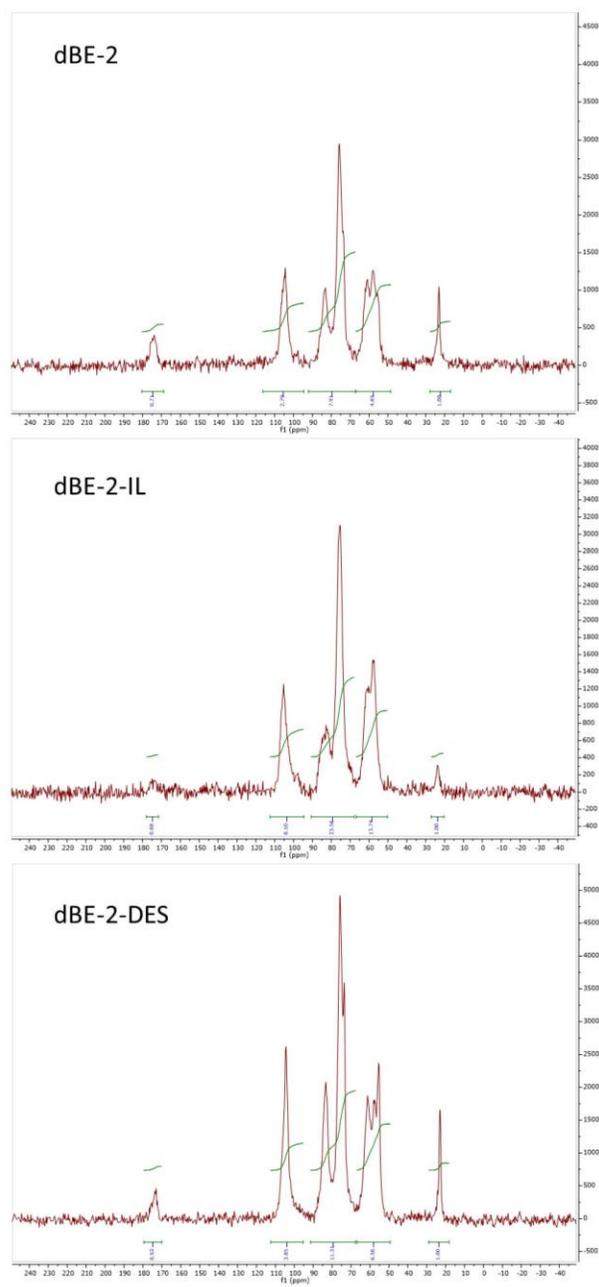


Fig. S7 Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of chitosans from untreated and IL/DES-pretreated BE-2 source.

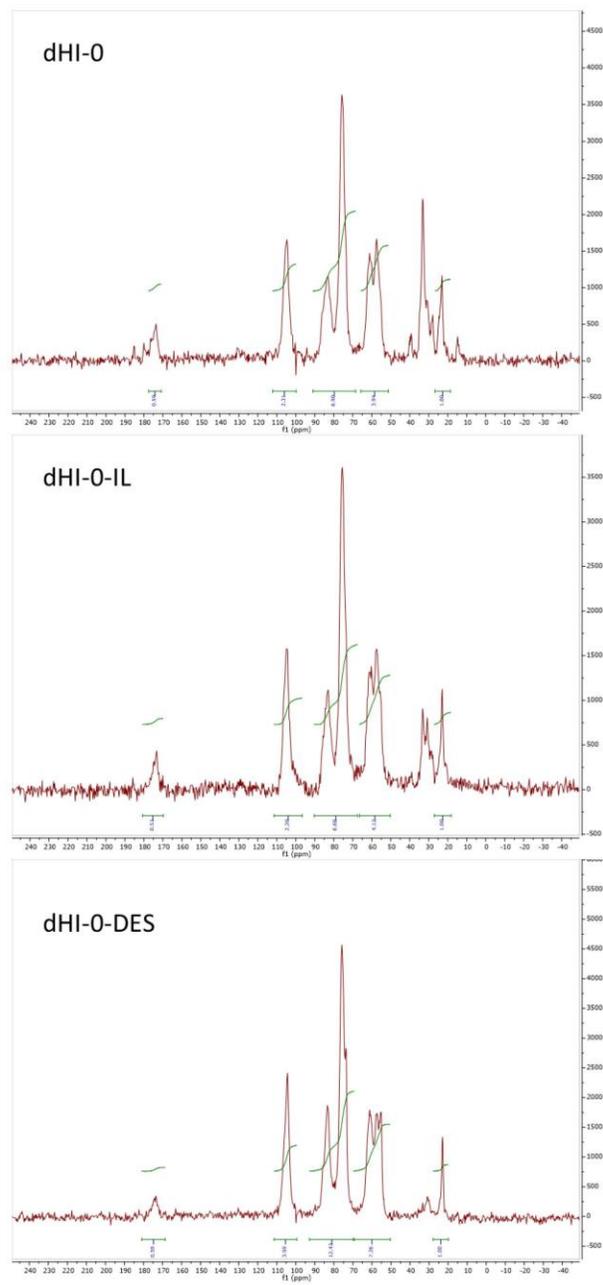


Fig. S8 Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of chitosans from untreated and IL/DES-pretreated HI-0 source.

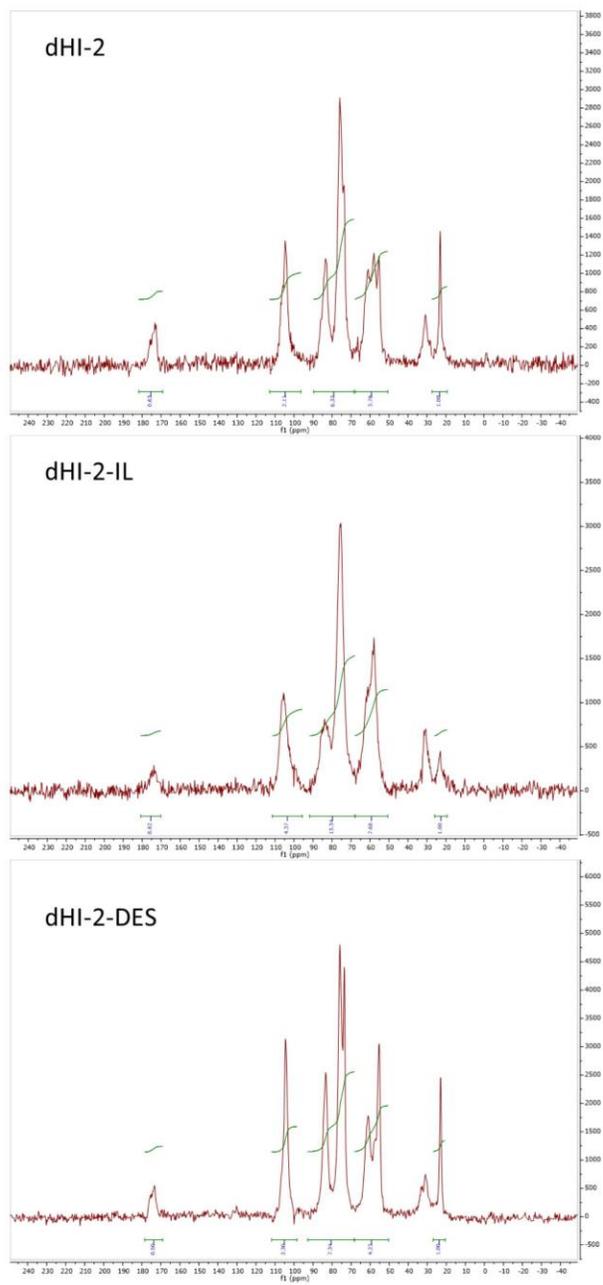


Fig. S9 Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of chitosans from untreated and IL/DES-pretreated HI-2 source.

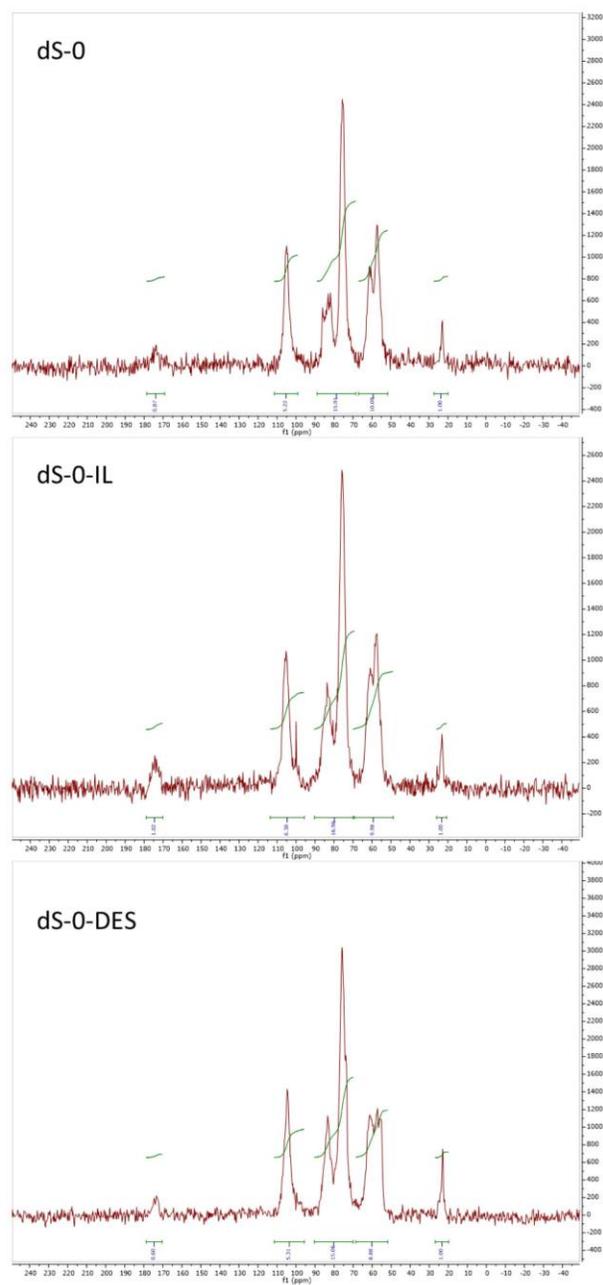


Fig. S10 Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of chitosans from untreated and IL/DES-pretreated S-0 source.

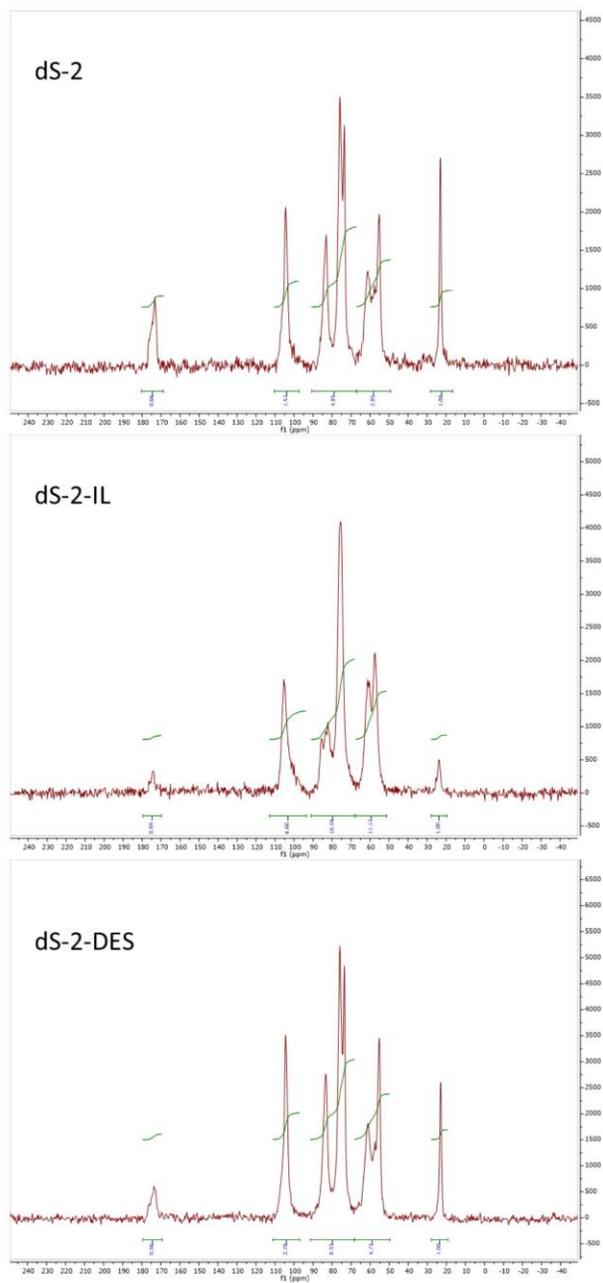


Fig. S11 Solid-state CP-MAS ^{13}C NMR spectra of chitosans from untreated and IL/DES-pretreated S-2 source.

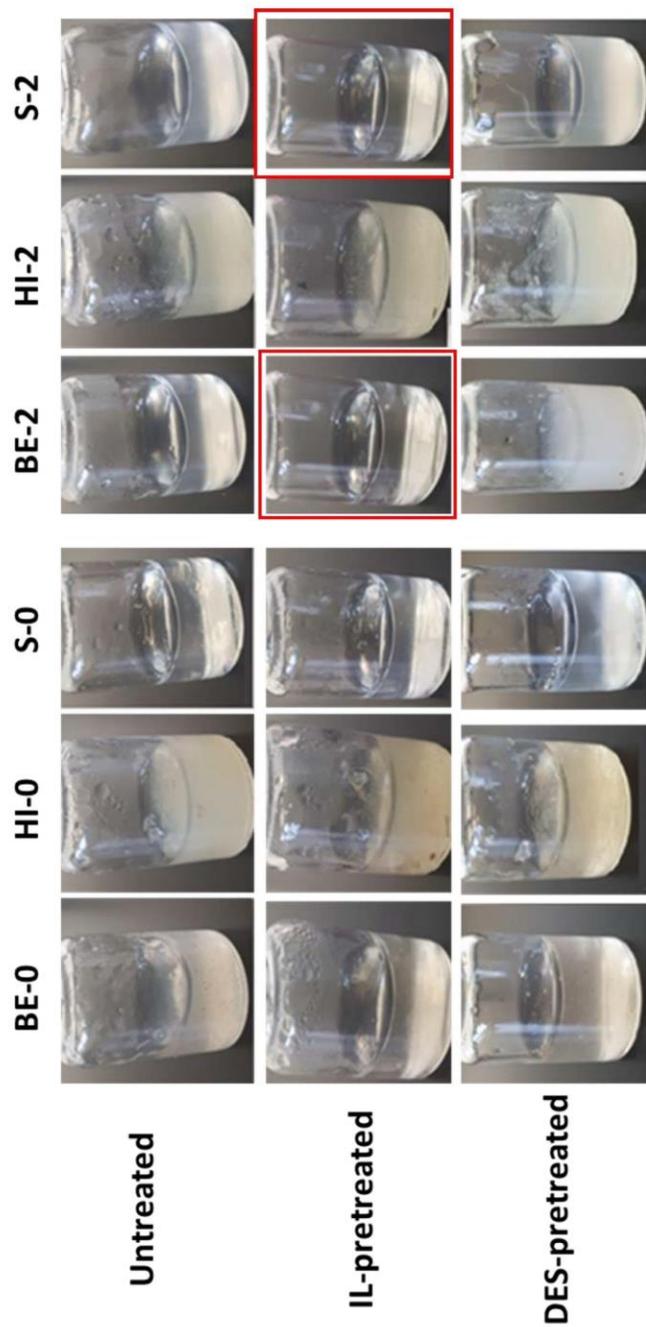


Fig. S12 Solubility tests of chitosans synthesized from untreated and IL/DES-pretreated BE, HI and S sources. Concentration = 10mg/mL in acetic acid (1%).

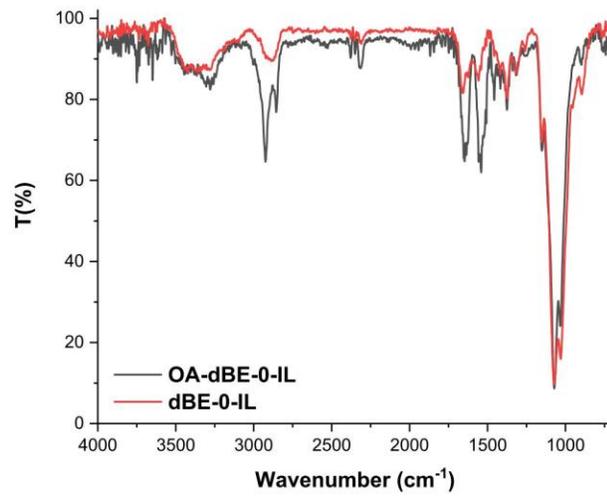


Fig. S13 ATR-FTIR spectra of **dBE-0-IL** (red line) and **OA-dBE-0-IL** (black line).

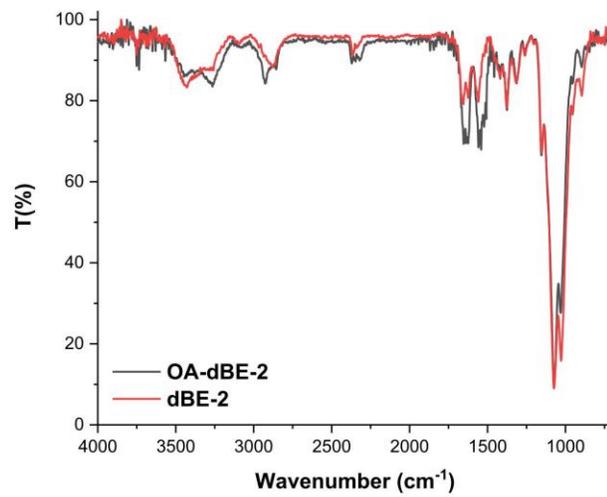


Fig. S14 ATR-FTIR spectra of **dBE-2** (red line) and **OA-dBE-2** (black line).

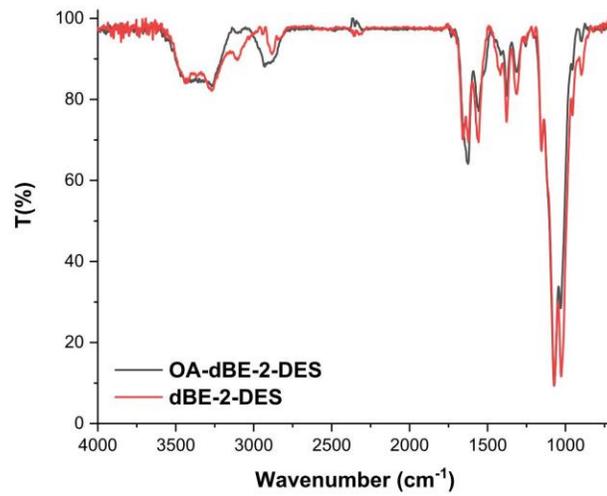


Fig. S15 ATR-FTIR spectra of **dBE-2-DES** (red line) and **OA-dBE-2-DES** (black line).

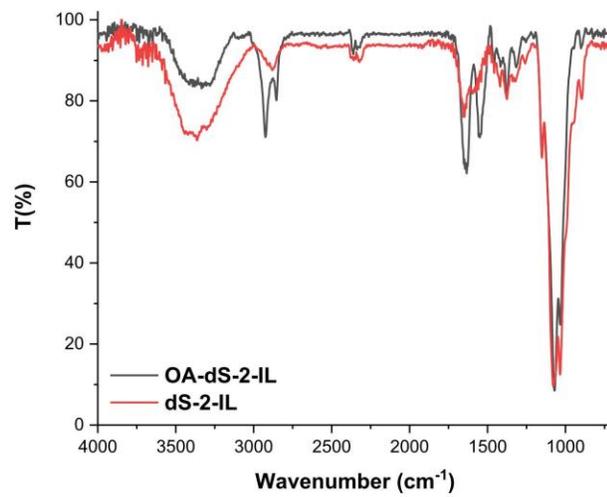


Fig. S16 ATR-FTIR spectra of **dS-2-IL** (red line) and **OA-dS-2-IL** (black line).

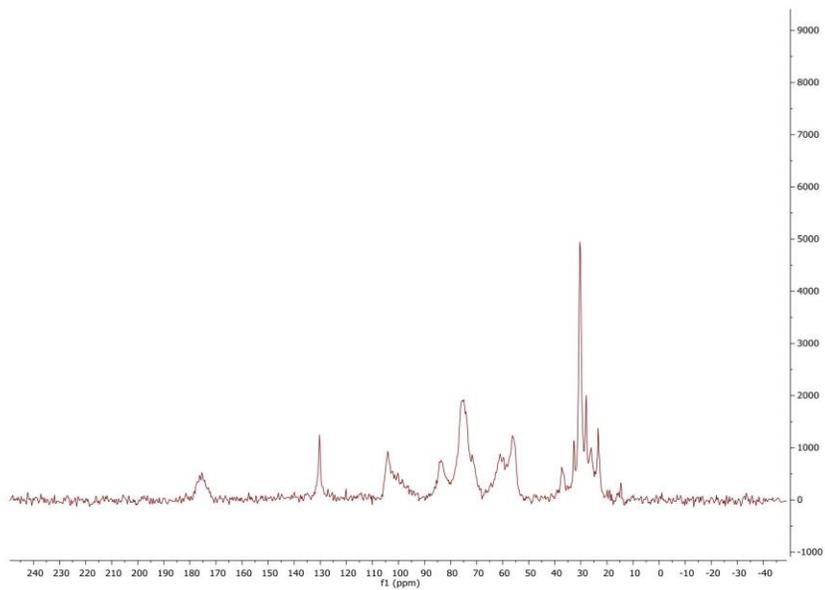


Fig. S17 Solid-state CP-MAS ¹³C NMR spectrum of OA-dBE-0-IL.

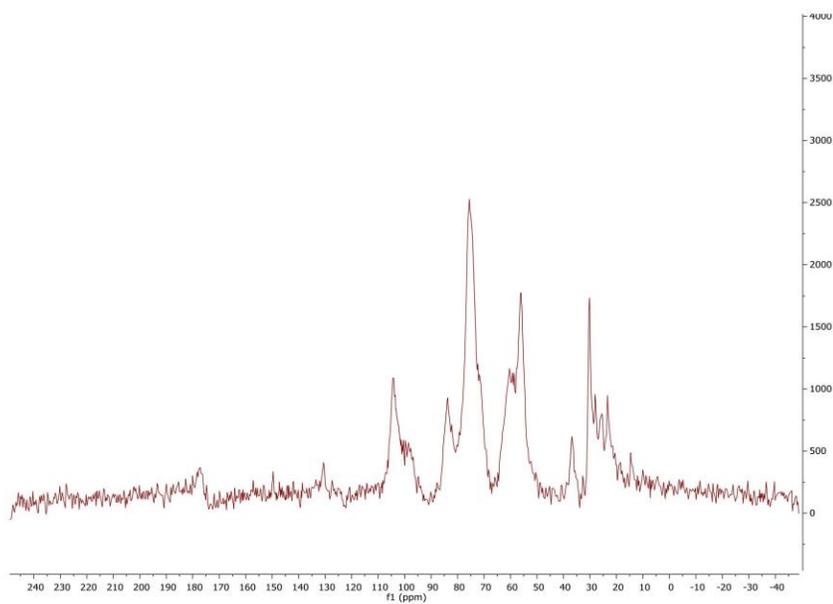


Fig. S18 Solid-state CP-MAS ¹³C NMR spectrum of OA-dS-2-IL.

Résultats

- G. Huet, C. Hadad, J.M. González-Domínguez, M. Courty, Arash Jamali, D. Cailleu, A. Nguyen Van Nhien; **LI versus DES: Impact on chitin pretreatment to afford high quality and highly functionalizable chitosan**. Carbohydrate Polymers, 2021 (soumis en mars 2021)

I. LI versus DES

Dans cette étude, trois sources de chitine ont été utilisées, deux provenant d'insectes, *Bombyx eri* (BE) et *Hermetia illucens* (HI) et une provenant de crustacés, *Crangon crangon* (S). Les cuticules d'insectes sont séparées de la biomasse animale à l'aide d'un extracteur à jus de cuisine et les carapaces de crustacés sont décortiquées manuellement. Les biomasses subissent alors un lavage à l'éthanol et à l'acétone pour éliminer une grande partie des lipides, nous appellerons ces échantillons : **BE-0**, **HI-0** et **S-0**. Ensuite, les deux étapes d'extraction (déméralisation et déprotéinisation) ont été réalisées sur **BE-0**, **HI-0** et **S-0** pour donner les échantillons nommés **BE-2**, **HI-2** et **S-2** possédant une pureté supérieure à 90%.

Chacun de ces échantillons a été prétraité au liquide ionique 1-éthyl-3-méthyl imidazolium ([C₂min][OAc]) ainsi qu'au DES Choline chloride : acide lactique (CC : AL, 1 :2) (Figure III.7) dans les conditions énoncées dans la section expérimentale de notre article. Les réactions de désacétylation ont ensuite été effectuées sur chacun de nos échantillons donnant lieu à des chitosanes de différentes puretés. Les chitosanes de haute pureté et possédant de faibles DAs ont ensuite été fonctionnalisés par des chaînes grasses. Le « chart 1 » de notre article résume l'ensemble des étapes de notre étude.

L'impact des prétraitements à base de LI ou de DES sur l'efficacité de la réaction de désacétylation est, à ce jour, encore peu connu. Nous avons préalablement travaillé sur l'utilisation du LI [C₂min][OAc] pour prétraiter la chitine provenant des sources **S** et **BE** dans le but d'augmenter la digestibilité de la chitine en oligosaccharides par des chitinases (Gael Huet et al. 2020; Husson et al. 2017). Nous avons alors montré que [C₂min][OAc] a le pouvoir de partiellement solubiliser la chitine en rompant le réseau de liaisons hydrogène. Cela se traduit par l'expansion de la structure de la chitine, qui perdra sa structure α , et une baisse de cristallinité

la rendant ainsi plus digestible. Des travaux récents, dans la littérature, ont démontré que les DES dits « acides », c'est-à-dire à base d'acide malonique ou encore d'acide lactique par exemple, ont démontré leur efficacité à solubiliser partiellement les biomasses chitineuses et à en extraire la chitine (Hong et al. 2018). Les compositions chimiques, avec ou sans prétraitements aux LI ou DES, de l'ensemble de nos échantillons sont résumées dans la Tableau 1 de l'article (Huet et al. 2021). Comme attendu, les biomasses d'insectes **BE-0** et **HI-0** possèdent une faible teneur en minéraux avec des taux à 1,9 % et 1,8 % respectivement alors que la biomasse **S-0** contient 30,4 % de minéraux. Bien que la déminéralisation ne soit pas nécessaire dans le cas des sources **BE** et **HI**, cette étape a tout de même été réalisée afin de comparer au mieux l'impact des prétraitements sur des sources pures et ayant subi les mêmes traitements chimiques (**BE-2**, **HI-2** et **S-2**). Le prétraitement des chitines pures (**BE-2**, **HI-2** et **S-2**) au $[C_2min][OAc]$ induit une baisse de l'indice de cristallinité et la perte de la structure cristalline α quel que soit la source. Les clichés MEB des chitines 2 étapes prétraitées au $[C_2min][OAc]$ montrent une structure expansée par rapport aux non prétraitées (Figure 2, (Huet et al. 2021)).

Le prétraitement des biomasses **BE-0**, **HI-0** et **S-0** montre qu'une partie importante des protéines a été éliminée (jusqu'à 51,9 % dans le cas de **S-0-DES**). Toutefois, aucune baisse du pourcentage de minéraux n'a été observée. La présence d'impuretés ne nous permet pas de déterminer avec précision les indices de cristallinité des biomasses même après prétraitement au LI. De plus, ces impuretés « polluent » les spectres IR. Il s'avère difficile de noter les changements structuraux dus au prétraitement, la présence de protéines empêchant probablement l'accès du liquide ionique aux fibres de chitine. Cependant, il est important d'ajouter que la solubilisation de la chitine dépend aussi du poids moléculaire et que l'étape de déminéralisation lors de l'extraction de la chitine est connue pour l'abaisser. Dans le cas des échantillons **BE-0-IL**, **HI-0-IL** et **S-0-IL**, le haut poids moléculaire de la chitine est un facteur supplémentaire dans la non-solubilisation des biomasses non extraites (**BE-0-IL**, **HI-0-IL** et **S-0-IL**). Les protéines résiduelles ne permettent pas de conclure sur la modification de la structure supramoléculaire des biomasses puisqu'elles parasitent les mesures de DRX et d'IRTF.

Les propriétés acides du DES CC : AL (1 :2) permettent de déminéraliser la biomasse chitineuse et d'éliminer des protéines. En effet, la biomasse **S-0 prétraitée** présente seulement 12,6 % de teneur en minéraux contre 30,4 % pour la **S-0 non prétraitée** et 24,8 % de protéines contre 47,8 %. Des résultats similaires ont été obtenus sur les biomasses d'insectes **BE** et **HI**. Toutefois, le caractère acide du DES pourrait engendrer une hydrolyse des zones amorphes du polymère, entraînant une augmentation de l'indice de cristallinité et des rendements aux alentours de 65 %. A l'inverse du prétraitement au [C₂min][OAc], celui réalisé avec le DES n'implique pas de changement de structure supramoléculaire de la chitine comme nous pouvons l'observer sur le spectre IR (Figure 1 , (Huet et al. 2021)) et sur les clichés MEB (Figure 2, (Huet et al. 2021)).

II. Réaction de désacétylation

Les réactions de désacétylation ont été réalisées sur l'ensemble de nos échantillons en présence de NaOH (50 %), à 100 °C et pendant 16 h. Les degrés de désacétylation ont ensuite été mesurés par RMN du solide (¹³C) pour étudier l'impact du prétraitement sur l'efficacité de la réaction.

Le prétraitement au [C₂min][OAc] permet d'expanser la structure de la chitine et d'obtenir ainsi une désacétylation facilitée. En effet, les DAs obtenus, pour les chitosanes issus des chitines pures prétraitées au LI, sont plus faibles que ceux obtenus pour les chitines pures non prétraitées (Tableau S1 e l'ESI, (Huet et al. 2021)). Le prétraitement rendrait la chitine plus perméable à la soude caustique et permettrait une désacétylation plus en profondeur quelle que soit la source. Contrairement aux données de la littérature, qui montrent que la désacétylation s'avère compliquée à mettre en œuvre dans le cas de chitine possédant un indice de cristallinité assez élevé, les DAs des chitosanes obtenus après désacétylation de chitines pures prétraitées au DES et possédant des ICs proches de 90 % sont plus faibles que ceux des chitosanes obtenus sans prétraitement (Tableau 1, (Huet et al. 2021)). Cela peut être lié au fait que l'élimination des zones amorphes, entraîne une baisse considérable de la MM et une meilleure accessibilité aux

groupements acétamides par la soude. Ces valeurs restent tout de même plus élevées que dans le cas du prétraitement au LI.

Les prétraitements ne semblent pas avoir d'impact sur l'efficacité de la désacétylation lorsque l'on travaille avec des chitines non purifiées (**BE-0**, **HI-0** et **S-0**). En effet, les valeurs de DA sont très faibles, particulièrement dans le cas des sources **BE-0** et **S-0**. Il est toutefois important de préciser que les spectres RMN du solide (^{13}C) et les analyses thermogravimétriques montrent que les chitosanes, obtenus à partir de **BE-0**, **BE-0-IL** et **BE-0-DES**, sont purs alors que ceux obtenus à partir des sources **S-0** et **HI-0** (traitées et non traitées) contiennent des pourcentages importants d'impuretés ce qui restreint fortement les domaines d'applications.

La solubilité des chitosanes dépend en grande partie du DA et du poids moléculaire, eux-mêmes dépendants de la source, de la méthode d'extraction utilisée et de la méthode de désacétylation. Seuls, les échantillons **dBE-2-IL** et **dS-2-IL**, sont solubles en milieu acide (acide acétique 1 %). Ils possèdent les plus bas DAs et ont également subi une étape de déminéralisation, connue pour réduire la MM du polymère de chitine.

III. *N*-acylation des chitosanes de haute pureté

Le greffage de l'acide oléique a été réalisé sur les chitosanes de haute pureté (**dBE-2-IL**, **dBE-0-IL**, **dS-2-IL**, **dBE-2** et **dBE-2-DES**). Le contrôle du pH lors de la réaction, nous a permis de réaliser sélectivement des réactions de *N*-acylation (versus *O*-acylation) et un lavage intensif de nos chitosanes fonctionnalisés a été effectué pour éliminer toutes traces d'acide oléique susceptibles d'être absorbées à la surface du polymère.

Les analyses IRTF effectuées sur l'échantillon **OA-dBE-2**, Figure 4 de l'article, confirment la sélectivité de la réaction puisqu'aucune bande caractéristique du groupement ester n'est observée. Les mêmes constatations ont été faites pour les chitosanes fonctionnalisés **OA-dBE-0-IL** et **OA-dS-2-IL** (Figures S13 et S16 de l'ESI, (Huet et al. 2021)). En revanche, les greffages entrepris sur **dBE-2** et **dBE-2-DES** semblent selon les spectres IRTF moins efficaces (Figures S14 et S15 de l'ESI). Ces résultats ont été confirmés par RMN (Figures 5 de l'article) et les degrés de

substitution ont été calculés à partir des pourcentages respectifs en C, H and N (Tableau 2, (Huet et al. 2021)).

IV. Conclusion

Même si le liquide ionique [C₂min][OAc] et le DES (CC : AL) sont capables de solubiliser tous les deux partiellement la chitine, ils impactent la structure supramoléculaire de la chitine de façon différente. Le prétraitement au [C₂min][OAc] permet l'expansion de la structure de la chitine, engendre la perte de sa structure α et facilite la réaction de désacétylation, indépendamment de la source. Toutefois, même si le prétraitement au LI permet l'élimination d'une partie des protéines, il n'a aucun effet sur les minéraux. A l'inverse, le prétraitement par le DES permettrait la conservation de la structure cristalline α du polymère, tout en éliminant les zones amorphes et une partie importante des minéraux et des protéines. Le prétraitement aux DES hydrolyse donc la chitine en fibres hautement cristallines, rendant l'accès de la soude caustique plus facile aux fonctions amides.

Les chitosanes obtenus après prétraitement au LI sont de haute pureté et possèdent des DAs faibles. La fonctionnalisation covalente, effectuée sur ces échantillons, donne lieu à des degrés de substitution assez élevés alors que les greffages n'ont pas été concluants dans le cas des chitosanes obtenus sans prétraitement ou après prétraitement au DES.

Le poids moléculaire des chitosanes reste à être déterminé mais le manque de solubilité des chitosanes obtenus rend les mesures de viscosités difficiles à effectuer. Les propriétés des chitosanes fonctionnalisés comme leur caractère antibactérien, antifongique, régénérant ainsi que l'augmentation de leur résistance à l'eau, doivent être évalués.

Conclusion et perspectives

Conclusions

Bien que la chitine ait été découverte depuis près de deux siècles, de nombreux problèmes empêchent son exploitation à son plein potentiel. Ses atouts majeurs, comme sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa non-toxicité, ne compensent pas le coût monétaire ou environnemental induit par son extraction. De nouvelles méthodes d'extraction et de valorisation plus vertes doivent être mises au point et c'est dans cette optique que cette thèse a été menée.

Quatre articles, dans des journaux internationaux, ont été publiés au cours de ma thèse :

-Deux articles portent sur la valorisation de la chitine en oligosaccharides (Chapitre I) (Gael Huet et al. 2020; Husson et al. 2017).

-Un article est dédié à la valorisation de la biomasse lignocellulosique (Chapitre II) (Gaël Huet et al. 2020).

-Enfin, le dernier article compare l'impact de deux prétraitements en milieux non conventionnels, sur l'efficacité de la réaction de désacétylation de la chitine en chitosane. La modification chimique du chitosane par des chaînes grasses est aussi reportée (Chapitre III) (Huet et al. 2021).

Le lien, entre ces différents chapitres, est l'étude de l'impact d'un prétraitement de la biomasse chitineuse (ou BLC) sur l'obtention de ses différents composés et la comparaison entre les différents milieux non conventionnels utilisés (LI, ZIL ou DES). L'objectif principal étant d'atteindre des rendements de synthèse élevés, en prenant en considération différents paramètres comme le coût de l'extraction ou des synthèses et la toxicité des milieux non conventionnels utilisés.

La transformation de la biomasse chitineuse en oligosaccharides, par hydrolyse enzymatique, est un défi compte-tenu de la nature récalcitrante de la chitine. Plusieurs liquides ioniques ont été testés pour améliorer la digestibilité de la chitine. Deux stratégies de prétraitement, par voies dites séquentielle et simultanée, ont été mises au point. La voie séquentielle est la plus efficace pour hydrolyser la chitine et les rendements en DP1 sont

concurrentiels à ceux reportés dans la littérature. Toutefois, la voie simultanée a permis de démontrer qu'il est possible, pour les enzymes, d'hydrolyser la chitine, en présence d'une quantité de liquide ionique relativement élevée (20 % (v/v) maximum). La méthode a ensuite été transposée à une source de chitine, issue de cuticules d'insectes (*Bombyx eri*). Cette dernière s'est révélée être une source de choix pour obtenir des rendements en COS élevés (DP1 et DP2) mais aussi pour la facilitation de l'extraction. En effet, sa faible teneur en minéraux nous dispense de l'étape de déminéralisation, réduisant ainsi le coût global de son extraction. Les mono-oligosaccharides, provenant des hydrolysats, ont ensuite pu être fermentés en bioéthanol. Ces résultats sont une preuve de concept pour une future bioraffinerie d'insecte.

Deux facteurs sont à prendre en considération dans cette première étude : (i) le coût des liquides ioniques à base d'imidazolium et (ii) la toxicité de ces derniers. Pour cela, une nouvelle famille de liquides ioniques a été synthétisée au laboratoire, les liquides zwitterioniques. Leurs synthèses ont été optimisées et les rendements sont excellents. Aucune étape de purification par chromatographie n'est nécessaire, réduisant ainsi considérablement le coût des synthèses.

Malheureusement, le prétraitement de la biomasse chitineuse, par les liquides zwitterioniques synthétisés, n'a pas augmenté les rendements en DP1 et DP2 en comparaison aux rendements obtenus, à partir d'une chitine non traitée. Ils sont même très nettement inférieurs à ceux obtenus à partir de la biomasse prétraitée au [C₂min][OAc]. Nous avons alors transposé cette méthode à la biomasse lignocellulosique. Les prétraitements aux ZILs sur certaines BLC, comme la sciure de chêne, ont permis d'obtenir des rendements comparables aux prétraitements réalisés avec [C₂min][OAc]. Cependant, les prétraitements sur *Miscanthus x giganteus* n'ont pas permis une saccharification au niveau de celle réalisée avec [C₂min][OAc]. Les ZILs sont donc moins polyvalents que [C₂min][OAc] mais peuvent permettre d'atteindre des rendements similaires si la biomasse à prétraiter est correctement choisie. Il est important de préciser que [C₂min][OAc] et les ZILs n'affectent pas le BLC de la même manière. [C₂min][OAc] affectera la structure supramoléculaire de la cellulose, en changeant sa conformation de la forme I à la forme II ou en écartant les feuillets de cellulose des uns des autres. Les ZILs, quant à eux,

ne changent pas la structure supramoléculaire de la cellulose mais permettent, tout de même, d'augmenter la digestibilité du polymère.

Ce nouveau type de liquide ionique présente une faible toxicité par rapport au [C₂min][OAc]. La présence de ZIL, dans le milieu de fermentation, en présence de *S. cerevisiae*, n'affecte pas les rendements obtenus en éthanol. La toxicité des LIs à base d'imidazolium et des ZILs dépend de la longueur de leurs chaînes alkyles qui peuvent s'insérer dans les membranes lipidiques et engendrer des perturbations importantes. Nous avons donc montré que les ZILs, avec des petites chaînes alkyles (éthyle), sont très peu toxiques, comparativement à [C₂min][OAc]. Les ZILs semblent donc être d'excellents candidats pour remplacer les LIs classiques, comme prétraitement de la BLC, au préalable, des réactions de saccharification.

Enfin, dans notre dernière étude, nous avons comparé l'impact des prétraitements au LI ([C₂min][OAc]) et au DES (CC :AL) sur l'efficacité des réactions de désacétylation de la chitine en chitosane. Nous avons mis en évidence un comportement différent des biomasses de chitine vis-à-vis de ces deux solvants. En effet, [C₂min][OAc] est capable de rompre le réseau de liaisons hydrogène de la chitine ce qui se traduit par une baisse de l'IC et une structure supramoléculaire plus expansée. En revanche, le prétraitement au DES induit une augmentation de la cristallinité du polymère. Le prétraitement par le DES permettrait la conservation de la structure cristalline α du polymère, tout en éliminant les zones amorphes et une partie importante des minéraux et des protéines. Les chitosanes, obtenus après prétraitement au LI, sont de haute pureté et possèdent des DAs faibles. La fonctionnalisation covalente, effectuée sur ces échantillons, donne lieu à des degrés de substitution assez élevés alors que les greffages n'ont pas été concluants, dans le cas des chitosanes obtenus sans prétraitement ou après prétraitement au DES.

Perspectives

Les travaux de thèse ont permis de valoriser la chitine sous de nombreux aspects, avec notamment, la dépolymérisation de la chitine pouvant conduire à l'obtention d'oligosaccharides, à la fonctionnalisation du chitosane mais aussi de l'extraction de nanocristaux de chitine. Bien que cette thèse ait amené à la publication de quatre articles scientifiques, de nombreux points restent encore à étudier dans les différents domaines explorés.

La preuve de concept sur l'intérêt d'un prétraitement chimique par des liquides ioniques a permis d'augmenter significativement les rendements en DP1 et DP2 obtenus à partir de la chitine. L'accès à des oligosaccharides de DP supérieurs est encore un verrou. Deux stratégies sont envisagées pour la suite de ce travail. La première consiste à trouver des microorganismes pouvant générer un mixte de chitinase capable d'hydrolyser la chitine en oligosaccharides de taille supérieure. La seconde stratégie consiste à étudier la synergie des chitinases existantes afin d'orienter les réactions vers un type spécifique d'oligosaccharides.

La désacétylation des chitines préalablement prétraitées au LI ou au DES, a permis d'obtenir des chitosanes fortement désacétylés en un seul cycle de désacétylation classique à la soude. La pureté des chitosanes a pu être augmentée mais elle est également dépendante de la source de chitine. Cependant les poids moléculaires des chitosanes obtenus n'ont pu être déterminés. Il reste encore un énorme travail à réaliser à ce sujet. La détermination du poids moléculaire peut se faire à l'aide d'un viscosimètre capillaire ainsi que par SEC MALLS. Le viscosimètre capillaire permet de mesurer un temps de chute, directement relié à la viscosité intrinsèque qui est elle-même reliée au poids moléculaire. Cependant, ces techniques sont dépendantes de la solubilisation du chitosane dans le solvant utilisé. Or les chitosanes obtenus ne sont pas totalement solubles, dans la plupart des cas. Lors des tests effectués, les impuretés et la solubilité partielle des chitosanes de très haut poids moléculaire empêchent une bonne mesure du temps de chute. De plus, il est difficile de réaliser une gamme étalon du poids moléculaire du chitosane puisqu'il existe peu de chitosanes commercialement disponibles présentant un poids moléculaire précis. Des travaux récents semblent indiquer que les Lis

peuvent être utiles dans la détermination du poids moléculaire de la chitine. Il est envisageable de transposer cette méthode aux chitosanes.

Bien que le chitosane fonctionnalisé avec de l'acide oléique ait été développé avec l'idée de former des films de chitosane détenant une résistance à l'eau supérieure, ses propriétés n'ont pas été testées. La continuité de l'étude serait donc de tester les capacités antibactériennes et antifongiques des films de chitosane. Dans un second temps il serait nécessaire de réaliser des expériences permettant d'observer les propriétés régénératrices des films de chitosane. Et enfin il serait indispensable d'effectuer des mesures d'angle de contact pour pouvoir caractériser l'augmentation de la résistance à l'eau des films.

Enfin, bien que le prétraitement au DES CC : AL n'ait pas permis une désacétylation aussi efficace sur la chitine extraite par rapport au prétraitement au [C₂mim][OAc], il n'est pas impossible que d'autres DES soit tout aussi efficaces ou plus que [C₂mim][OAc], dans le cadre d'un prétraitement avant la désacétylation. D'autres DES biosourcés peuvent être testés, comme le mixte de chlorure de choline et l'acide malonique qui a aussi fait ses preuves dans la solubilisation de la chitine.

Références

- Abbott, Andrew P., Glen Capper, David L. Davies, and Ray K. Rasheed. 2002. "Quaternary Ammonium Zinc- or Tin-Containing Ionic Liquids : Water Insensitive , Recyclable Catalysts for Diels – Alder Reactions." *Green Chemistry* 4:24–26.
- Adiera, Nur, Hanna Rosli, Kee Shyuan Loh, Wai Yin Wong, Rozan Mohamad Yunus, Tian Khoon Lee, Azizan Ahmad, and Seng Tong Chong. 2020. "Review of Chitosan-Based Polymers as Proton Exchange Membranes and Roles of Chitosan-Supported Ionic Liquids." *International Journal of Molecular Sciences Review* 21:632.
- Aklog, Yihun Fantahun, Tomone Nagae, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, Hiroyuki Saimoto, and Shinsuke Ifuku. 2017. "Effect of Grinder Pretreatment for Easy Disintegration of Chitin into Nanofiber." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 17:5037–41.
- Alayoubi, Ranim, Nasir Mehmood, Eric Husson, Achraf Kouzayha, Mohamad Tabcheh, Ludovic Chaveriat, Catherine Sarazin, and Isabelle Gosselin. 2020. "Low Temperature Ionic Liquid Pretreatment of Lignocellulosic Biomass to Enhance Bioethanol Yield." *Renewable Energy* 145:1808–16.
- Altiok, Duygu, Evren Altiok, and Funda Tihminlioglu. 2010. "Physical, Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Incorporated with Thyme Oil for Potential Wound Healing Applications." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21:2227–36.
- Anderson, J. W., R. J. Nicolosi, and J. F. Borzelleca. 2005. "Glucosamine Effects in Humans: A Review of Effects on Glucose Metabolism, Side Effects, Safety Considerations and Efficacy." *Food and Chemical Toxicology* 43:187–201.
- André Pinkert, Kenneth N. Marsh, Shusheng Pang, Mark P. Staiger. 2009. "Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose." *Chemical Reviews* 109:6712–28.
- Angell Austen, Charles, Younes Ansari, and Zuofeng Zhao. 2012. "Ionic Liquids : Past , Present and Future." *Faraday Discussions* 154:9–27.

- Aspras, Izabela, Malgorzata M. Jaworska, and Andrzej Górak. 2017. "Kinetics of Chitin Deacetylase Activation by the Ionic Liquid [Bmim][Br]." *Journal of Biotechnology* 251:94–98.
- Atikah, Nur, Wan Aida, Wan Mustapha, and Osman Hassan. 2016. "Deep Eutectic Solvent (DES) as a Pretreatment for Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) in Sugar Production." *Procedia Chemistry* 18:147–54.
- Aunkham, Anuwat, Michael Zahn, Anusha Kesireddy, Karunakar Reddy Pothula, Albert Schulte, Arnaud Baslé, Ulrich Kleinekathöfer, Wipa Suginta, and Bert Van Den Berg. 2018. "Structural Basis for Chitin Acquisition by Marine Vibrio Species." *Nature Communications* 9:220.
- Auxenfans, Thomas, Sébastien Buchoux, Eric Husson, and Catherine Sarazin. 2014. "Efficient Enzymatic Saccharification of Miscanthus: Energy-Saving by Combining Dilute Acid and Ionic Liquid Pretreatments." *Biomass and Bioenergy* 62:82–92.
- Auxenfans, Thomas, Sébastien Buchoux, Dominique Larcher, Gérard Husson, Eric Husson, and Catherine Sarazin. 2014a. "Enzymatic Saccharification and Structural Properties of Industrial Wood Sawdust : Recycled Ionic Liquids Pretreatments." *Energy Conversion and Management* 88:1094–1103.
- Auxenfans, Thomas, Sébastien Buchoux, Dominique Larcher, Gérard Husson, Eric Husson, and Catherine Sarazin. 2014b. "Enzymatic Saccharification and Structural Properties of Industrial Wood Sawdust: Recycled Ionic Liquids Pretreatments." *Energy Conversion and Management* 88:1094–1103.
- Auxenfans, Thomas, Eric Husson, and Catherine Sarazin. 2017. "Simultaneous Pretreatment and Enzymatic Saccharification of (Ligno) Celluloses in Aqueous-Ionic Liquid Media: A Compromise." *Biochemical Engineering Journal* 117:77–86.
- Awad, Walid H., Jeffrey W. Gilman, Marc Nyden, Richard H. Harris, Thomas E. Sutto, John Callahan, Paul C. Trulove, Hugh C. Delong, and Douglas M. Fox. 2004. "Thermal

- Degradation Studies of Alkyl-Imidazolium Salts and Their Application in Nanocomposites.” *Thermochimica* 409:3–11.
- Axelsson, Lisa, Maria Franzén, Madelene Ostwald, Göran Berndes, G. Lakshmi, and N. H. Ravindranath. 2012. “Perspective: Jatropha Cultivation in Southern India: Assessing Farmers’ Experiences.” *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 6:246–56.
- Aytekin, Ali Ozhan, Shigeru Morimura, and Kenji Kida. 2011. “Synthesis of Chitosan-Caffeic Acid Derivatives and Evaluation of Their Antioxidant Activities.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 111:212–16.
- Azadi, Pooya, Oliver R. Inderwildi, Ramin Farnood, and David A. King. 2013. “Liquid Fuels, Hydrogen and Chemicals from Lignin: A Critical Review.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21:506–23.
- Azuma, Kazuo, Tomohiro Osaki, Saburo Minami, and Yoshiharu Okamoto. 2015. “Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides.” *Journal of Functional Biomaterials* 6:33–49.
- Badgujar, Kirtikumar C. and Bhalchandra M. Bhanage. 2015. “Bioresource Technology Factors Governing Dissolution Process of Lignocellulosic Biomass in Ionic Liquid : Current Status , Overview and Challenges.” *Bioresource Technology* 178:2–18.
- Bag, Sourav, Arpan Samanta, Prasenjit Bhunia, and C. Retna Raj. 2016. “ScienceDirect Rational Functionalization of Reduced Graphene Oxide with Imidazolium-Based Ionic Liquid for Supercapacitor Application.” *International Journal of Hydrogen Energy* 41:22134–43.
- Barroca-Aubry, Nadine, Astrid Pernet-Poil-Chevrier, Alain Domard, and Stéphane Trombotto. 2010. “Towards a Modular Synthesis of Well-Defined Chitooligosaccharides: Synthesis of the Four Chitodisaccharides.” *Carbohydrate Research* 345:1685–97.
- Berat, Pengukuran, Molekul Kitosan, Menggunakan Kaedah, and Kelikatan Intrinsik. 2013. “Determination of Viscosity - Average Molecular Weight of Chitosan Using Intrinsic Viscosity Measurement.” *Journal of Nuclear and Related Technologies* 10:39–44.

- Bodhak, Chandan, Ashis Kundu, and Animesh Pramanik. 2015. "An Efficient and Recyclable Chitosan Supported Copper(II) Heterogeneous Catalyst for C-N Cross Coupling between Aryl Halides and Aliphatic Diamines." *Tetrahedron Letters* 56:419–24.
- Bonferoni, M. C., G. Sandri, E. Dellera, S. Rossi, F. Ferrari, M. Mori, and C. Caramella. 2014. "Ionic Polymeric Micelles Based on Chitosan and Fatty Acids and Intended for Wound Healing. Comparison of Linoleic and Oleic Acid." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87:101–6.
- Bradstreet, R. B. 1954. "Kjeldahl Method for Organic Nitrogen." *Analytical Chemistry* 26:185–87.
- Brodeur, Gary, Elizabeth Yau, Kimberly Badal, John Collier, K. B. Ramachandran, and Subramanian Ramakrishnan. 2011. "Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review." *Enzyme Research* 2011.
- Burrell, Anthony K., Rico E. Del Sesto, Sheila N. Baker, T. Mark McCleskey, and Gary A. Baker. 2007. "The Large Scale Synthesis of Pure Imidazolium and Pyrrolidinium Ionic Liquids." *Green Chemistry* 9:449–45.
- Cao, Changqing, Ce Bian, Gaoyun Wang, Bin Bai, Yupeng Xie, and Hui Jin. 2020. "Co-Gasification of Plastic Wastes and Soda Lignin in Supercritical Water." *Chemical Engineering Journal* 388:124277.
- Carere, Carlo R., Richard Sparling, Nazim Cicek, and David B. Levin. 2008. "Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation." *International Journal of Molecular Sciences* 9:1342–60.
- Castro, Rebeca, Isabel Guerrero-Legarreta, and Rodrigo Bórquez. 2018. "Chitin Extraction from *Allopetrolisthes Punctatus* Crab Using Lactic Fermentation." *Biotechnology Reports* 20.
- Cernencu, Alexandra I., Adriana Lungu, and Izabela-cristina Stancu. 2019. "Bioinspired 3D Printable Pectin-Nanocellulose Ink Formulations." *Carbohydrate Polymers* 220:12–21.

- Chen, Jeen Kuan, Chia Rui Shen, and Chao Lin Liu. 2010. "N-Acetylglucosamine: Production and Applications." *Marine Drugs* 8:2493–2516.
- Chen, Xi, Huiying Yang, Ziyi Zhong, and Ning Yan. 2017. "Base-Catalysed, One-Step Mechanochemical Conversion of Chitin and Shrimp Shells into Low Molecular Weight Chitosan." *Green Chemistry* 19:2783–92.
- Chen, Zhu and Caixia Wan. 2018. "Bioresource Technology Ultrafast Fractionation of Lignocellulosic Biomass by Microwave-Assisted Deep Eutectic Solvent Pretreatment." *Bioresource Technology* 250:532–37.
- Chiaki Kodo, Kosuke Kuroda, Keisuke Miyazaki, Hisai Ueda, Kazuaki Ninomiya & Kenji Takahashi. 2020. "Direct Preparation of Gels from Herbal Medicinal Plants by Using a Low Toxicity Liquid Zwitterion." *Polymer Journal* 52:467–472.
- Christian P. Kubicek; Max Rohr. 1985. "Citric Acid Fermentation." *Biotechnology* 3:331–72.
- Czaja, Wojciech K., David J. Young, Marek Kawecki, and R. Malcolm Brown. 2007. "The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications." *Biomacromolecules* 8:1–12.
- Dahmen, Nicolaus, Iris Lewandowski, Susanne Zibek, and Annette Weidtmann. 2019. "Integrated Lignocellulosic Value Chains in a Growing Bioeconomy: Status Quo and Perspectives." *GCB Bioenergy* 11:107–17.
- Dai, Tianhong, Masamitsu Tanaka, and Ying-ying Huang. 2011. "Chitosan Preparations for Wounds and Burns: Antimicrobial and Wound-Healing Effects." 9:857–80.
- Das, Subha Narayan, Jogi Madhuprakash, P. V. S. R. N. Sarma, Pallinti Purushotham, Katta Suma, Kaur Manjeet, Samudrala Rambabu, Nour Eddine El Gueddari, Bruno M. Moerschbacher, and Appa Rao Podile. 2015. "Biotechnological Approaches for Field Applications of Chitooligosaccharides (COS) to Induce Innate Immunity in Plants." *Critical Reviews in Biotechnology* 35:29–43.
- Dell, James R. O., Michele M. Hooper, John D. Bradley, Clifton O. Bingham Iii, Michael H.

- Weisman, Christopher G. Jackson, Nancy E. Lane, John J. Cush, Larry W. Moreland, H. Ralph Schumacher, Chester V Oddis, Frederick Wolfe, Jerry A. Molitor, David E. Yocum, Thomas J. Schnitzer, Daniel E. Furst, Allen D. Sawitzke, Helen Shi, Kenneth D. Brandt, Roland W. Moskowitz, and H. James Williams. 2006. "Glucosamine, Chondroitin Sulfate, and the Two in Combination for Painful Knee Osteoarthritis." *The New England Journal of Medicine* 354:795–808.
- Dev, Ashish, Jithin C. Mohan, V. Sreeja, H. Tamura, G. R. Patzke, F. Hussain, S. Weyeneth, S. V. Nair, and R. Jayakumar. 2010. "Novel Carboxymethyl Chitin Nanoparticles for Cancer Drug Delivery Applications." *Carbohydrate Polymers* 79(4):1073–79.
- Dhillon, Gurpreet Singh, Surinder Kaur, Satinder Kaur Brar, and Mausam Verma. 2013. "Green Synthesis Approach: Extraction of Chitosan from Fungus Mycelia." *Critical Reviews in Biotechnology* 33:379–403.
- Díaz-Rojas, Erika I., Waldo M. Argüelles-Monal, Inocencio Higuera-Ciapara, Javier Hernández, Jaime Lizardi-Mendoza, and Francisco M. Goycoolea. 2006. "Determination of Chitin and Protein Contents during the Isolation of Chitin from Shrimp Waste." *Macromolecular Bioscience* 6(5):340–47.
- Dodd, Dylan and Isaac K. O. Cann. 2009. "Enzymatic Deconstruction of Xylan for Biofuel Production." *GCB Bioenergy* 1:2–17.
- Doherty, Thomas V, Mauricio Mora-pale, Sage E. Foley, J. Linhardt, and Jonathan S. Dordick. 2010. "Ionic Liquid Solvent Properties as Predictors of Lignocellulose Pretreatment Efficacy." *Green Chemistry* 12:1967–75.
- Dolgopyatova, N. V., V. Yu Novikov, I. N. Konovalova, and N. M. Putintsev. 2013. "Mechanism of Acid Hydrolysis of N-Acetyl-D-Glucosamine." *Russian Journal of Applied Chemistry* 86:986–91.
- Du, Yong Zhong, Ling Wang, Hong Yuan, Xiao Hong Wei, and Fu Qiang Hu. 2009. "Preparation and Characteristics of Linoleic Acid-Grafted Chitosan Oligosaccharide Micelles as a Carrier

- for Doxorubicin." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 69:257–63.
- Duarte, M. L., M. C. Ferreira, M. R. Marvão, and João Rocha. 2002. "An Optimised Method to Determine the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by FTIR Spectroscopy." *International Journal of Biological Macromolecules* 31:1–8.
- Einbu, Aslak. 2007. "Characterisation of Chitin and a Study of Its Acid-Catalysed Hydrolysis."
- Einbu, Aslak, Hans Grasdalen, and Kjell M. Vårum. 2007. "Kinetics of Hydrolysis of Chitin/Chitosan Oligomers in Concentrated Hydrochloric Acid." *Carbohydrate Research* 342:1055–62.
- Einbu, Aslak and Kjell M. Vårum. 2007. "Depolymerization and De-N-Acetylation of Chitin Oligomers in Hydrochloric Acid." *Biomacromolecules* 8:309–14.
- Einbu, Aslak and Kjell M. Vårum. 2008. "Characterization of Chitin and Its Hydrolysis to GlcNAc and GlcN." *Biomacromolecules* 9:1870–75.
- Elgadir, M. Abd, Md Salim Uddin, Sahena Ferdosh, Aishah Adam, Ahmed Jalal Khan Chowdhury, and Md Zaidul Islam Sarker. 2015. "Impact of Chitosan Composites and Chitosan Nanoparticle Composites on Various Drug Delivery Systems: A Review." *Journal of Food and Drug Analysis* 23:619–29.
- Elsabee, Maher Z. and Entsar S. Abdou. 2013. "Chitosan Based Edible Films and Coatings: A Review." *Materials Science and Engineering* 33:1819–41.
- Falk, Michael, D. G. Smith, J. McLachlan, and A. G. McInnes. 1966. "Studies on Chitan (b- (1 - 4)-Linked 2-Acetamido-2-Deoxy-D- Glucan) Fibers of the Diatom *Thalassiosira Fluviatilis* Hustedt." *Canadian Journal of Chemistry* 44:2269.
- Fischer, Günther, Sylvia Prieler, Harrij van Velthuizen, Sander M. Lensink, Marc Londo, and Marc de Wit. 2010. "Biofuel Production Potentials in Europe: Sustainable Use of Cultivated Land and Pastures. Part I: Land Productivity Potentials." *Biomass and Bioenergy* 34:159–72.
- Ford, Warren T., Robert J. Hauri, and Stanley G. Smith. 1974. "Nucleophilic Reactivities of Halide

- Ions in Molten Triethyl-n-Hexylammonium Triethyl-n-Hexylboride." *Journal of the American Chemical Society* 95:4316–18.
- Francis Suh, J. K. and Howard W. T. Matthew. 2000. "Application of Chitosan-Based Polysaccharide Biomaterials in Cartilage Tissue Engineering: A Review." *Biomaterials* 21:2589–98.
- Frank H. Hurley and Thomas P. Wier Jr. 1951. "Electrodeposition of Metals from Fused Quaternary Ammonium Salts." *Journal of The Electrochemical Society* 98:203.
- El Fray, Mirosława, Agata Niemczyk, and Barbara Pabin-Szafko. 2012. "Chemical Modification of Chitosan with Fatty Acids." *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its Derivatives* 17:29–36.
- Fujikawa, Takashi, Yukari Kuga, Shigekazu Yano, Akira Yoshimi, Takashi Tachiki, Keietsu Abe, and Marie Nishimura. 2009. "Dynamics of Cell Wall Components of Magnaporthe Grisea during Infectious Structure Development." *Molecular Microbiology* 73:553–70.
- Fujita, Kyoko, Daigo Kobayashi, Nobuhumi Nakamura, and Hiroyuki Ohno. 2013. "Enzyme and Microbial Technology Direct Dissolution of Wet and Saliferous Marine Microalgae by Polar Ionic Liquids without Heating." *Enzyme and Microbial Technology* 52:199–202.
- Ganske, Franka and Uwe T. Bornscheuer. 2006. "Growth of Escherichia Coli, Pichia Pastoris and Bacillus Cereus in the Presence of the Ionic Liquids [BMIM][BF₄] and [BMIM][PF₆] and Organic Solvents." *Biotechnology Letters* 28:465–69.
- Gao, Cong, Alei Zhang, Kequan Chen, Zhikui Hao, Junmao Tong, and Pingkai Ouyang. 2015. "Characterization of Extracellular Chitinase from Chitinibacter Sp. GC72 and Its Application in GlcNAc Production from Crayfish Shell Enzymatic Degradation." *Biochemical Engineering Journal* 97:59–64.
- Gathergood, Nicholas, J. Scammells, and M. Teresa Garcia. 2006. "Biodegradable Ionic Liquids Part III . { The First Readily Biodegradable Ionic Liquids." *Green Chemistry* 8:156–60.

- Gathergood, Nicholas, M. Teresa, and Peter J. Scammells. 2004. "Biodegradable Ionic Liquids : Part I . Concept , Preliminary Targets and Evaluation." *Green Chemistry* 6:166–75.
- Gerente, C., V. K. C. Lee, P. Le Cloirec, and G. McKay. 2007. "Application of Chitosan for the Removal of Metals from Wastewaters by Adsorption - Mechanisms and Models Review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37:41–127.
- Gírio, F. M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, and R. Bogel-Łukasik. 2010. "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review." *Bioresource Technology* 101:4775–4800.
- Gnahm, Markus and Dieter M. Kolb. 2011. "The Purification of an Ionic Liquid." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 651:250–52.
- Gorke, Johnathan T. and Romas J. Kazlauskas. 2008. "Hydrolase-Catalyzed Biotransformations in Deep Eutectic Solvents W." *The Royal Society of Chemistry* 1235–37.
- Grøssereid, Ingrid, Kallidanthiyil Chellappan Lethesh, Vishwesh Venkatraman, and Anne Fiksdahl. 2019. "New Dual Functionalized Zwitterions and Ionic Liquids; Synthesis and Cellulose Dissolution Studies." *Journal of Molecular Liquids* 292:111353.
- Gueye, Serigne, Morgane Saint-Cricq, Moussa Coulibaly, Nabila Goumri, Céline Guilbeau-Frugier, Hurlot Quentin, Etienne Ged, Abdellatif Sidi Aly, and Lionel Rostaing. 2016. "Chronic Tubulointerstitial Nephropathy Induced by Glucosamine: A Case Report and Literature Review." *Clinical Nephrology* 86:106–10.
- Habibul, Nuzahat, Jie-jie Chen, Yan-yun Hu, Yi Hu, Hao Yin, Guo-ping Sheng, and Han-qing Yu. 2019. "Uptake , Accumulation and Metabolization of 1-Butyl-3- Methylimidazolium Bromide by Ryegrass from Water : Prospects for Phytoremediation." *Water Research* 156:82–91.
- Hamed, Imen, Fatih Özogul, and Joe M. Regenstein. 2016. "Industrial Applications of Crustacean By-Products (Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides): A Review." *Trends in Food Science and Technology* 48:40–50.

- Hassainia, Abdelghani, Hamid Satha, and Sami Boufi. 2018. "Chitin from *Agaricus Bisporus*: Extraction and Characterization." *International Journal of Biological Macromolecules* 117:1334–42.
- He, Qing, Meng Gao, Sheng Mei Qi, Hua Gao, and Jun Zhi Wang. 2018. "Evaluation of Humoral Immunogenicity of a Novel Gastrin Vaccine by Using Three Strains of Mice." *Chinese Journal of Biologicals* 31:569–72.
- He, Xiaofei, Kecheng Li, Rong Xing, Song Liu, Linfeng Hu, and Pengcheng Li. 2016. "The Production of Fully Deacetylated Chitosan by Compression Method." *Egyptian Journal of Aquatic Research* 42:75–81.
- Hermanson, Greg T. 2013. *Zero-Length Crosslinkers*.
- Heux, L., J. Brugnerotto, J. Desbrières, M. F. Versali, and M. Rinaudo. 2000. "Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan." *Biomacromolecules* 1:746–51.
- Hong, Shu, Yang Yuan, Qiuru Yang, Ping Zhu, and Hailan Lian. 2018. "Versatile Acid Base Sustainable Solvent for Fast Extraction of Various Molecular Weight Chitin from Lobster Shell." *Carbohydrate Polymers* 201:211–17.
- Hua, J., S. Suguro, S. Hirano, K. Sakamoto, and I. Nagaoka. 2005. "Preventive Actions of a High Dose of Glucosamine on Adjuvant Arthritis in Rats." *Inflammation Research* 54:127–32.
- Huang, Xuan, Xiong Huang, Xiao Hong Jiang, Fu Qiang Hu, Yong Zhong Du, Qi Feng Zhu, and Cheng Sheng Jin. 2012. "In Vitro Antitumour Activity of Stearic Acid-g-Chitosan Oligosaccharide Polymeric Micelles Loading Podophyllotoxin." *Journal of Microencapsulation* 29:1–8.
- Huet, Gaël, Monica Araya-Farias, Ranim Alayoubi, Sylvain Laclef, Benjamin Bouvier, Isabelle Gosselin, Christine Cézard, Romain Roulard, Matthieu Courty, Caroline Hadad, Eric Husson, Catherine Sarazin, and Albert Nguyen Van Nhien. 2020. "New Biobased-Zwitterionic Ionic Liquids: Efficiency and Biocompatibility for the Development of Sustainable Biorefinery

Processes." *Green Chemistry* 22:2935–46.

Huet, Gaël, Caroline Hadad, Jose M. González-domínguez, Matthieu Courty, and Arash Jamali. 2021. "IL versus DES : Impact on Chitin Pretreatment to Afford High Quality and Highly Functionalizable Chitosan." *Carbohydrate Polymers*.

Huet, Gael, Caroline Hadad, Eric Husson, Sylvain Laclef, Virginie Lambertyn, Araya Farias, Arash Jamali, Matthieu Courty, Ranim Alayoubi, and Isabelle Gosselin. 2020. "Straightforward Extraction and Selective Bioconversion of High Purity Chitin from Bombyx Eri Larva : Toward an Integrated Insect Biorefinery." *Carbohydrate Polymers* 228:115382.

Hussey, C. L. 1983. "Room Temperature Molten Salt Systems." *Plenum Press* 5:185–230.

Husson, Eric, Caroline A Ahad Hadad, Gael Huet, Sylvain Laclef, David Lesur, Virginie Lambertyn, Arash Jamali, Sébastien Gottis, Catherine Sarazin, and Albert NguyenVan Nhien. 2017. "Effect of Room Temperature Ionic Liquids on Selective Biocatalytic Hydrolysis of Chitin via Sequential or Simultaneous Strategies." *Green Chemistry* 19:4122–31.

Husson, Eric, Sébastien Buchoux, Carine Avondo, Dominique Cailleu, Karim Djellab, Isabelle Gosselin, Olivier Wattraint, and Catherine Sarazin. 2011. "Enzymatic Hydrolysis of Ionic Liquid-Pretreated Celluloses: Contribution of CP-MAS 13C NMR and SEM." *Bioresource Technology* 102:7335–42.

Inokuma, Kentaro, Tomohisa Hasunuma, and Akihiko Kondo. 2016. "Ethanol Production from N-Acetyl-D-Glucosamine by Scheffersomyces Stipitis Strains." *AMB Express* 6:83.

Jablonský, Michal, Š. Andrea, and Lucia Kamenská. 2015. "Deep Eutectic Solvents : Fractionation of Wheat Straw." *Bioresources* 10:8039–47.

Jang, Mi Kyeonc, Byeong Gi Kong, Young Il Jeong, Chang Hyung Lee, and Jae Woon Nah. 2004. "Physicochemical Characterization of α -Chitin, β -Chitin, and γ -Chitin Separated from Natural Resources." *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 42:3423–32.

Javed, Saleem, Mahboob Ahmad, MalikMobeen Ahmad, MalikZainul Abdin, Rifat Hamid,

- MinhajA Khan, and Javed Musarrat. 2013. "Chitinases: An Update." *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* 5:21.
- Jérémy, Astruc. 2018. "Extraction et Compatibilisation de Nanocristaux de Cellulose Issus de Résidus Lignocellulosiques Pour Le Renforcement de Biocomposites."
- Jiang, Bo, Chaoji Chen, Zhiqiang Liang, Shuaiming He, Yudi Kuang, and Jianwei Song. 2019. "Lignin as a Wood-Inspired Binder Enabled Strong , Water Stable , and Biodegradable Paper for Plastic Replacement." *Advanced Functional Materials Journal* 1906307:1–11.
- Jiang, Yangyang, Chen Guo, Hansong Xia, Iram Mahmood, Chunzhao Liu, and Huizhou Liu. 2009. "Magnetic Nanoparticles Supported Ionic Liquids for Lipase Immobilization: Enzyme Activity in Catalyzing Esterification." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58:103–9.
- Jordan, Andrew and Nicholas Gathergood. 2015. "Chem Soc Rev." *Chemical Society Reviews*.
- Jurgen, Vitz, Tina Erdmenger, and Ulrich S.Schibert. 2010. *Imidazolium Based Ionic Liquids as Solvents for Cellulose Chemistry*.
- Karimi, Mehdi, Shayessteh Dadfarnia, Ali Mohammad, and Haji Shabani. 2016. "Application of Deep Eutectic Solvent Modified Cotton as a Sorbent for Online Solid-Phase Extraction and Determination of Trace Amounts of Copper and Nickel in Water and Biological Samples." *Biological Trace Element Research* 176:207–15.
- Kasaai, Mohammad R. 2008. "A Review of Several Reported Procedures to Determine the Degree of N -Acetylation for Chitin and Chitosan Using Infrared Spectroscopy." *Carbohydrate Polymers* 71:497–508.
- Kaur, Surinder and Gurpreet Singh Dhillon. 2015. "Recent Trends in Biological Extraction of Chitin from Marine Shell Wastes: A Review." *Critical Reviews in Biotechnology* 35:44–61.
- Kazami, Nao, Masayoshi Sakaguchi, Daisuke Mizutani, Tatsuhiko Masuda, Satoshi Wakita, Fumitaka Oyama, Masao Kawakita, and Yasusato Sugahara. 2015. "A Simple Procedure for Preparing Chitin Oligomers through Acetone Precipitation after Hydrolysis in Concentrated

- Hydrochloric Acid." *Carbohydrate Polymers* 132:304–10.
- Kilinç, Ali, Mustafa Teke, Seçil Önal, and Azmi Telefoncu. 2006. "Immobilization of Pancreatic Lipase on Chitin and Chitosan." *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 36:153–63.
- Klaerner, G. and R. Padmanabhan. 2016. "Multi-Step/Step-Wise Polymerization of Well-Defined Oligomers." *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* 1–9.
- El Knidri, H., R. El Khalfaouy, A. Laajeb, A. Addaou, and A. Lahsini. 2016. "Eco-Friendly Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from the Shrimp Shell Waste via Microwave Irradiation." *Process Safety and Environmental Protection* 104:395–405.
- Kobayashi, Kayoko, Satoshi Kimura, Eiji Togawa, and Masahisa Wada. 2011. "Crystal Transition from Cellulose II Hydrate to Cellulose II." *Carbohydrate Polymers* 86:975–81.
- Kolakovic, Ruzica, Leena Peltonen, Antti Laukkanen, Jouni Hirvonen, and Timo Laaksonen. 2012. "European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Nanofibrillar Cellulose Films for Controlled Drug Delivery." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 82:308–15.
- Kumar, Raj, Sompal Singh, and Om V. Singh. 2008. "Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:377–91.
- Kumirska, Jolanta, Malgorzata Czerwicka, Zbigniew Kaczynski, Anna Bychowska, Krzysztof Brzozowski, Jorg Thoming, and Piotr Stepnowski. 2010. "Application of Spectroscopic Methods for Structural Analysis of Chitin and Chitosan." *Marine Drugs* 8:1567–1636.
- Laitinen, Ossi. 2017. "Sustainable Stabilization of Oil in Water Emulsions by Cellulose Nanocrystals Synthesized from Deep Eutectic Solvents." *Cellulose* 24:1679–89.
- Langan, P., Y. Nishiyama, and H. Chanzy. 1999. "A Revised Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose II from a Neutron Fiber Diffraction Analysis." *Journal of the American Chemical Society* 121:9940–46.

- Larson, James H., Paul C. Frost, and Gary A. Lamberti. 2008. "Variable Toxicity of Ionic Liquid-Forming Chemicals to Lemna Minor and the Influence of Dissolved Organic Matter." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:676–81.
- Lee, Jong-min. 2011. "Solvent Properties of Piperidinium Ionic Liquids." *Chemical Engineering Journal* 172:1066–71.
- Lee, Jong-min, Sebastian Ruckes, and John M. Prausnitz. 2008. "Solvent Polarities and Kamlet-Taft Parameters for Ionic Liquids Containing a Pyridinium Cation." *American Chemical Society* 112:1473–76.
- Lertwattanaseri, Tipparat, Naoya Ichikawa, Tetuo Mizoguchi, Yasuyuki Tanaka, and Suwabun Chirachanchai. 2009. "Microwave Technique for Efficient Deacetylation of Chitin Nanowhiskers to a Chitosan Nanoscaffold." *Carbohydrate Research* 344:331–35.
- Li, Kecheng, Rong Xing, Song Liu, and Pengcheng Li. 2016. "Advances in Preparation, Analysis and Biological Activities of Single Chitooligosaccharides." *Carbohydrate Polymers* 139:178–90.
- Li, Xiao-yu, Jing Zhou, Miao Yu, Jian-ji Wang, and Yuan Chao. 2009. "Toxic Effects of 1-Methyl-3-Octylimidazolium Bromide on the Early Embryonic Development of the Frog Rana Nigromaculata." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:552–56.
- Lin-Song Wang, Lin Wang, Li Wang, Ge Wang, Zhao-Hu Li, Jian-Ji Wang. 2009. "Effect of 1-Butyl-3-Methylimidazolium Tetrafluoroborate on the Wheat (*Triticum Aestivum* L.) Seedlings." *Environmental Toxicology* 165:296–303.
- Lin, Yan, Wei Zhang, Chunjie Li, Kei Sakakibara, Shuzo Tanaka, and Hainan Kong. 2014. "Factors Affecting Ethanol Fermentation Using *Saccharomyces Cerevisiae* BY4742." *Biomass and Bioenergy* 47:395–401.
- Liu, De-tao, Kun-feng Xia, Wei-hua Cai, Ren-dang Yang, Li-qin Wang, and Bin Wang. 2012. "Investigations about Dissolution of Cellulose in the 1-Allyl-3-Alkylimidazolium Chloride Ionic Liquids." *Carbohydrate Polymers* 87:1058–64.

- Liu, Yongzhuang, Wenshuai Chen, Qinqin Xia, Bingtuo Guo, Qingwen Wang, and Shouxin Liu. 2017. "Efficient Cleavage of Lignin – Carbohydrate Complexes and Ultrafast Extraction of Lignin Oligomers from Wood Biomass by Microwave-Assisted Treatment with Deep Eutectic Solvent." *ChemsusChem* 10:1692–1700.
- Luo, Qiuhua, Junming Zhao, Xiangrong Zhang, and Weisan Pan. 2011. "Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Coated with Chitosan Oligosaccharides and Its Potential Use in Ocular Drug Delivery System." *International Journal of Pharmaceutics* 403:185–91.
- Luo, Yangchao and Qin Wang. 2013. "Recent Advances of Chitosan and Its Derivatives for Novel Applications in Food Science Beverages." *Journal of Food Processing & Beverages* 1:1–13.
- Lynam, Joan G., Narendra Kumar, and Mark J. Wong. 2017. "Bioresource Technology Deep Eutectic Solvents' Ability to Solubilize Lignin , Cellulose , and Hemicellulose ; Thermal Stability ; and Density." *Bioresource Technology* 238:684–89.
- Ma, Jia and Yogeshwar Sahai. 2013. "Chitosan Biopolymer for Fuel Cell Applications." *Carbohydrate Polymers* 92:955–75.
- Margoutidis, George, Valerie H. Parsons, Christina S. Bottaro, Ning Yan, and Francesca M. Kerton. 2018. "Mechanochemical Amorphization of α -Chitin and Conversion into Oligomers of N-Acetyl- d -Glucosamine." *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 6:1662–69.
- Maria, Vargas, Ana Albors, Amparo Chiralt, and Chelo Gonza. 2009. "Characterization of Chitosan – Oleic Acid Composite Films." *Food Hydrocolloids* 23:536–47.
- Masuda, Sachie, Kazuo Azuma, Seiji Kurozumi, Masatoshi Kiyose, Tomohiro Osaki, Takeshi Tsuka, Norihiko Itoh, Tomohiro Imagawa, Saburo Minami, Kimihiko Sato, and Yoshiharu Okamoto. 2014. *Anti-Tumor Properties of Orally Administered Glucosamine and N-Acetyl- d -Glucosamine Oligomers in a Mouse Model*. Vol. 111. Elsevier Ltd.
- McCarty, M. F. 1998. "Enhanced Synovial Production of Hyaluronic Acid May Explain Rapid Clinical Response to High-Dose Glucosamine in Osteoarthritis." *Medical Hypotheses*

50:507–10.

Mei, Yu-xia, Xing-yi Dai, Wei Yang, Xiong-wei Xu, and Yun-xiang Liang. 2015. "Antifungal Activity of Chitooligosaccharides against the Dermatophyte *Trichophyton Rubrum*." *International Journal of Biological Macromolecules* 77:330–35.

Mendes, G. P., P. S. Vieira, S. Lanceros-Méndez, L. D. Kluskens, and M. Mota. 2015. "Transformation of *Escherichia Coli* JM109 Using PUC19 by the Yoshida Effect." *Journal of Microbiological Methods* 115:1–5.

Migowski, Pedro and Jãirton Dupont. 2007. "Catalytic Applications of Metal Nanoparticles in Imidazolium Ionic Liquids." *Chemistry a European Journal* 13:32–39.

Mikkola, Jyri-pekka, Alexey Kirilin, Jean-christopher Tuuf, Andrey Pranovich, Bjarne Holmbom, Leonid M. Kustov, Yu Murzin, and Tapio Salmi. 2007. "Ultrasound Enhancement of Cellulose Processing in Ionic Liquids : From Dissolution towards Functionalization {" *Green Chemistry* 9:1229–37.

Morales, Raul Calderon, Vasuki Tambyrajah, Paul R. Jenkins, David L. Davies, and P. Andrew. 2004. "The Regiospecific Fischer Indole Reaction in Choline Chloride · 2ZnCl₂ with Product Isolation by Direct Sublimation from the Ionic Liquid †." *The Royal Society of Chemistry* 158–59.

Morigaki, Kenichi and Peter Walde. 2007. "Fatty Acid Vesicles." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 12:75–80.

Moussout, Hamou, Hammou Ahlafi, Mustapha Aazza, and Mohamed Bourakhouadar. 2016. "Kinetics and Mechanism of the Thermal Degradation of Biopolymers Chitin and Chitosan Using Thermogravimetric Analysis." *Polymer Degradation and Stability* 130:1–9.

Mukesh, Chandrakant, Dibyendu Mondal, Mukesh Sharma, and Kamallesh Prasad. 2014. "Choline Chloride – Thiourea , a Deep Eutectic Solvent for the Production of Chitin Nanofibers." *Carbohydrate Polymers* 103:466–71.

- Nakagawa, Yuko S., Yasuhiro Oyama, Nobuko Kon, Mitsuru Nikaido, Koichi Tanno, Jun Kogawa, Shoji Inomata, Ayano Masui, Akihiro Yamamura, Mitsuaki Kawaguchi, Yoshiharu Matahira, and Kazuhide Totani. 2011. "Development of Innovative Technologies to Decrease the Environmental Burdens Associated with Using Chitin as a Biomass Resource: Mechanochemical Grinding and Enzymatic Degradation." *Carbohydrate Polymers* 83:1843–49.
- Niemczyk, Agata, Agata Goszczyńska, Monika Gołda-Cępa, Andrzej Kotarba, Peter Sobolewski, and Mirosława El Fray. 2019. "Biofunctional Catheter Coatings Based on Chitosan-Fatty Acids Derivatives." *Carbohydrate Polymers* 225:115263.
- No, Hong Kyoonyoung, Young In Cho, Hyeung Rak Kim, and Samuel P. Meyers. 2000. "Effective Deacetylation of Chitin under Conditions of 15 Psi/121 °C." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:2625–27.
- Novikov, V. Yu. 2004. "Acid Hydrolysis of Chitin and Chitosan." *Russian Journal of Applied Chemistry* 77:484–87.
- Oh, Woon Su. 2012. "Synthesis and Applications of Imidazolium-Based Ionic Liquids and Their Polymer Derivatives."
- Okajima, Idzumi and Takeshi Sako. 2014. "Energy Conversion of Biomass with Supercritical and Subcritical Water Using Large-Scale Plants." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117:1–9.
- Osada, Mitsumasa, Chika Miura, Yuko S. Nakagawa, Mikio Kaihara, Mitsuru Nikaido, and Kazuhide Totani. 2012. "Effect of Sub- and Supercritical Water Pretreatment on Enzymatic Degradation of Chitin." *Carbohydrate Polymers* 88:308–12.
- Osada, Mitsumasa, Chika Miura, Yuko S. Nakagawa, Mikio Kaihara, Mitsuru Nikaido, and Kazuhide Totani. 2013. "Effects of Supercritical Water and Mechanochemical Grinding Treatments on Physicochemical Properties of Chitin." *Carbohydrate Polymers* 92:1573–78.
- Osada, Mitsumasa, Chika Miura, Yuko S. Nakagawa, Mikio Kaihara, Mitsuru Nikaido, and

- Kazuhide Totani. 2015. "Effect of Sub- and Supercritical Water Treatments on the Physicochemical Properties of Crab Shell Chitin and Its Enzymatic Degradation." *Carbohydrate Polymers* 134:718–25.
- Paiva, Alexandre, Rita Craveiro, Ivo Aroso, Marta Martins, Rui L. Reis, and Ana Rita C. Duarte. 2014. "Natural Deep Eutectic Solvents - Solvents for the 21st Century." *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 2:1063–71.
- Pan, Yan, Ying-jian Li, Hui-ying Zhao, Jun-min Zheng, and Hui Xu. 2002. "Bioadhesive Polysaccharide in Protein Delivery System.Pdf." *International Journal of Pharmaceutics* 249:139–47.
- Pangon, Autchara, Somsak Saesoo, Nattika Saengkrit, Uracha Ruktanonchai, and Varol Intasanta. 2016. "Hydroxyapatite-Hybridized Chitosan/Chitin Whisker Bionanocomposite Fibers for Bone Tissue Engineering Applications." *Carbohydrate Polymers* 144:419–27.
- Parshall, George W. 1972. "Catalysis in Molten Salt Media." *Journal of the American Chemical Society* 94:25–28.
- Pérez, Serge and Daniel Samain. 2010. *Structure and Engineering of Celluloses*. Vol. 64.
- Pilkington, P. H., A. Margaritis, N. A. Mensour, and I. Russell. 1998. "Fundamentals of Immobilised Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review." *Journal of the Institute of Brewing* 104:19–31.
- Pillai, C. K. S., Willi Paul, and Chandra P. Sharma. 2009. "Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation." *Progress in Polymer Science (Oxford)* 34:641–78.
- Prabhu, Subbaiah Muthu and Keiko Sasaki. 2017. "Fabrication of Chitosan-Reinforced ZrxAl1-XOOH Nanocomposites and Their Arsenite and Fluoride Depollution Densities from Single/Binary Systems." *ChemistrySelect* 2:6375–87.
- Rahman, Hafizur, Linda Gordon Hjeljord, Berit B. Aam, Morten Sørli, and Arne Tronsmo. 2015.

“Antifungal Effect of Chito-Oligosaccharides with Different Degrees of Polymerization.”
147–58.

Rane, Kishore D. and Dallas G. Hoover. 1993. “An Evaluation of Alkali and Acid Treatments for Chitosan Extraction from Fungi.” *Process Biochemistry* 28:115–18.

Ravi, Kumar and NV Majesti. 2000. “A Review of Chitin and Chitosan Applications.” *Reactive and Functional Polymers* 46:1–27.

Ren, Hongwei, Chunmao Chen, Qinghong Wang, Dishun Zhao, and Shaohui Guo. 2016. “The Properties of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents and Their Performance in the Dissolution Of.” *Bioresources* 11:5435–51.

Roche, E. and H. Chanzy. 1981. “Electron Microscopy Study of the Transformation of Cellulose I into Cellulose III in Valonia.” *International Journal of Biological Macromolecules* 3:201–6.

Romero, A., A. Santos, J. Tojo, and A. Rodr. 2008. “Toxicity and Biodegradability of Imidazolium Ionic Liquids.” *Journal of Hazardous Materials* 151:268–73.

Ronnie, Jonge, van Esse Peter, Kombrinck Anja, Tomonori Shinya, Desaki Yoshitake, Bours Ralph, van der Krol Sander, Shinbuya Naoto, Joosten Matthieu, and Thomma Bart. 2018. “Autoimmunity in Plants.” *Science* 329:953–55.

Rosenthal, K. S., D. R. Strom, and W. T. Ford. 1975. “Triethyl-n-Hexylammonium Triethyl -n-Hexylboride: A New Antimicrobial Showing Activity Against *Candida Albicans* and Gram-Positive Bacteria.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 8:510–12.

Le Roux, Karine. 2012. “Purification de La Chitine Par Hydrolyse Enzymatique à Partir de Coproduits de Crevette *Penaeus Vannamei* . Caractérisations Des Produits et Optimisation Du Procédé.”

Roy, Jagadish C., Fabien Salaün, Stéphane Giraud, Ada Ferri, Guoqiang Chen, and Jinping Guan. 2017. *Solubility of Chitin: Solvents, Solution Behaviors and Their Related Mechanisms*.

Ruggeri, S., F. Poletti, C. Zanardi, L. Pigani, B. Zanfognini, E. Corsi, N. Dossi, M. Salomäki, H.

- Kivelä, J. Lukkari, and F. Terzi. 2019. "Chemical and Electrochemical Properties of a Hydrophobic Deep Eutectic Solvent." *Electrochimica Acta* 295:124–29.
- Rupley, J. A. 1964. "The Hydrolysis of Chitin by Concentrated Hydrochloric Acid, and the Preparation of Low-Molecular-Weight Substrate for Lysozyme." *BBA - Specialized Section on Mucoproteins and Mucopolysaccharides* 83:245–55.
- Sagaidak, Iryna, Guillaume Huertas, Albert Nguyen Van Nhien, and Frédéric Sauvage. 2018. "New Iodide-Based Amino Acid Molecules for More Sustainable Electrolytes in Dye-Sensitized Solar Cells." *Green Chemistry* 20:1059–64.
- Sahu, Abhishek, Pranab Goswami, and Utpal Bora. 2009. "Microwave Mediated Rapid Synthesis of Chitosan." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20:171–75.
- Saidi, Fadila. 2017. "RMN Haute Résolution Solide Par Multiple-Résonance : Transfert de Polarisation Simple et Multiple Entre Noyaux à Fréquences de Larmor Proches F."
- Sánchez, M. Mengíbar, G. Rivera-Rodríguez, B. Moerchbacher, N. Acosta, and A. Heras. 2017. "The Effect of Preparation Processes on the Physicochemical Characteristics and Antibacterial Activity of Chitooligosaccharides." *Carbohydrate Polymers* 157:251–57.
- Satria, Heri, Kosuke Kuroda, Yota Tsuge, Kazuaki Ninomiya, and Kenji Takahashi. 2018. "Dimethyl Sulfoxide Enhances Both the Cellulose Dissolution Ability and Biocompatibility of a Carboxylate-Type Liquid Zwitterion." *New Journal of Chemistry* 42:13225–28.
- Seabra, Amedea B., Juliana S. Bernardes, Wagner J. Fávaro, and Amauri J. Paula. 2018. "Cellulose Nanocrystals as Carriers in Medicine and Their Toxicities : A Review." *Carbohydrate Polymers* 181:514–27.
- Shamshina, Julia, P. S. Barber, G. Gurau, C. S. Griggs, and R. D. Rogers. 2016. "Pulping of Crustacean Waste Using Ionic Liquids: To Extract or Not to Extract." *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 4:6072–81.
- Shamshina, Julia L. 2019. "Chitin in Ionic Liquids: Historical Insights into the Polymer's

- Dissolution and Isolation. A Review." *Green Chemistry* 21:3974–93.
- Shamshina, Julia L. 2019. "Chitin in Ionic Liquids: Historical Insights into the Polymer's Dissolution and Isolation. A Review." *Green Chemistry* 21:3974–93.
- Sharma, Divya and Jagdish Singh. 2017. "Synthesis and Characterization of Fatty Acid Grafted Chitosan Polymer and Their Nanomicelles for Nonviral Gene Delivery Applications." *Bioconjugate Chemistry* 28:2772–83.
- Sharma, Mukesh, Chandrakant Mukesh, Dibyendu Mondal, and Kamalesh Prasad. 2013. "Dissolution of ??-Chitin in Deep Eutectic Solvents." *RSC Advances* 3:18149–55.
- Sirviö, Juho Antti, Jonne Ukkola, and Henriikki Liimatainen. 2019. "Direct Sulfation of Cellulose Fibers Using a Reactive Deep Eutectic Solvent to Produce Highly Charged Cellulose Nanofibers." *Cellulose* 26:2303–16.
- Sivashankari, P. R. and M. Prabakaran. 2016. *Deacetylation Modification Techniques of Chitin and Chitosan*. Vol. 1. Elsevier.
- Smith, Emma L., Andrew P. Abbott, and Karl S. Ryder. 2014. "Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications." *Chemical Reviews* 114:11060–82.
- Spange, Stefan. 2008. "Solvatochromism and Linear Solvation Energy Relationship of Diol- and n Proline-Functionalized Azo Dyes Using the Kamlet – Taft and Catala Solvent Parameter Sets W." *New Journal of Chemistry* 32:2180–88.
- Srinivasa, P. C., M. N. Ramesh, and R. N. Tharanathan. 2007. "Effect of Plasticizers and Fatty Acids on Mechanical and Permeability Characteristics of Chitosan Films." *Food Hydrocolloids* 21:1113–22.
- Stawski, D., S. Rabiej, L. Herczyńska, and Z. Draczyński. 2008. "Thermogravimetric Analysis of Chitins of Different Origin." *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 93:489–94.
- Stepnowski, Piotr. 2005. "Preliminary Assessment of the Sorption of Some Alkyl Imidazolium Cations as Used in Ionic Liquids to Soils and Sediments." *J.Chem* 58:170–73.

- Stepnowski, Piotr and Adriana Zaleska. 2005. "Comparison of Different Advanced Oxidation Processes for the Degradation of Room Temperature Ionic Liquids." *Journal of Photochemistry and Photobiology* 170:45–50.
- Stock, F., J. Hoffmann, J. Ranke, R. Störmann, B. Ondruschka, and B. Jastorff. 2004. "Effects of Ionic Liquids on the Acetylcholinesterase - A Structure-Activity Relationship Consideration." *Green Chemistry* 6:286–90.
- Stolte, Stefan, Ulrike Bottin-weber, Marianne Matzke, Frauke Stock, Karen Thiele, Marc Uerdingen, Urs Welz-biermann, and Johannes Ranke. 2006. "Anion Effects on the Cytotoxicity of Ionic Liquids." *Green Chemistry* 8:621–29.
- Sun, Ning, Ramakrishnan Parthasarathi, Aaron M. Socha, Jian Shi, Sonny Zhang, Vitalie Stavila, Kenneth L. Sale, Blake A. Simmons, and Seema Singh. 2014. "Cholinium and Imidazolium Ionic Liquids By." *Green Chemistry* 16:2546–57.
- Suopajärvi, Terhi, Juho Antti Sirviö, and Henrikki Liimatainen. 2017. "Nanofibrillation of Deep Eutectic Solvent-Treated Paper and Board Cellulose Pulps." *Carbohydrate Polymers* 169:167–75.
- Synowiecki, Josef and Nadia Ali Al-Khateeb. 2010. "Critical Reviews in Food Science and Nutrition Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives Production , Properties , and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives." *Food Science and Nutrition* 43:145–71.
- Tan, Too Shen, Hui Yen Chin, Min Lang Tsai, and Chao Lin Liu. 2015. "Structural Alterations, Pore Generation, and Deacetylation of α - and β -Chitin Submitted to Steam Explosion." *Carbohydrate Polymers* 122:321–28.
- Thuy Pham, Thi Phuong, Chul Woong Cho, and Yeoung Sang Yun. 2010. "Environmental Fate and Toxicity of Ionic Liquids: A Review." *Water Research* 44:352–72.
- Thygesen, Anders, Jette Oddershede, Hans Lilholt, Anne Belinda Thomsen, and Kenny Ståhl. 2005. "On the Determination of Crystallinity and Cellulose Content in Plant Fibres."

Cellulose 12:563–76.

Usman, Muhammad and Birgitte Kiaer. 2019. "Biomass and Bioenergy Lignin Degradation under Anaerobic Digestion : In Fl Uence of Lignin Modi Fi Cations -A Review." *Biomass and Bioenergy Journal* 128:105325.

Verma, Chandrabhan, Ankush Mishra, Swati Chauhan, Pratibha Verma, Vandana Srivastava, M. A. Quraishi, and Eno E. Ebenso. 2019. "Dissolution of Cellulose in Ionic Liquids and Their Mixed Cosolvents : A Review." *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 13(July):100162.

Verma, Madan L., Sandeep Kumar, Anamika Das, Jatinder S. Randhawa, and Munusamy Chamundeeswari. 2020. "Chitin and Chitosan-Based Support Materials for Enzyme Immobilization and Biotechnological Applications." *Environmental Chemistry Letters* 18:315–23.

Vicente, Filipa A., Bojana Bradić, Uroš Novak, and Blaž Likozar. 2020. "α-Chitin Dissolution, N-Deacetylation and Valorization in Deep Eutectic Solvents." *Biopolymers* 111:1–9.

Villa-Lerma, Guadalupe, Humberto González-Márquez, Miquel Gimeno, Alberto López-Luna, Eduardo Bárzana, and Keiko Shirai. 2013. "Ultrasonication and Steam-Explosion as Chitin Pretreatments for Chitin Oligosaccharide Production by Chitinases of *Lecanicillium Lecanii*." *Bioresource Technology* 146:794–98.

Vyas, Pranav and Mukund Deshpande. 1991. "Enzymatic Hydrolysis of Chitin by *Myrothecium Verrucaria* Chitinase Complex and Its Utilization to Produce Scpa." *Journal of General and Applied Microbiology* 37:267–75.

Wada, Masahida, Laurent Heux, and Junji Sugiyama. 2004. "Polymorphism of Cellulose I Family: Reinvestigation of Cellulose IVI." *Biomacromolecules* 5:1385–91.

Wada, Masahisa, Masakazu Ike, and Ken Tokuyasu. 2010. "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose I Is Greatly Accelerated via Its Conversion to the Cellulose II Hydrate Form." *Polymer Degradation and Stability* 95:543–48.

- Waghorne, W. Earle. 2020. "A Study of Kamlet–Taft β and Π^* Scales of Solvent Basicity and Polarity/Polarizability Using Computationally Derived Molecular Properties." *Journal of Solution Chemistry* 49:466–85.
- Walden, Von P. and Ueber Molekulargr. 2020. "XJeber Die JVIolekulargrosse Und Elektriselie Leitfähigkeit Einiger Geschmolzenen Salze." *Bulletin de l'Academie Imperiale Des Sciences de St.-Petersbourg* 8:405–22.
- Wang, Fengli, Guanglei Zhao, Xiongfei Lang, Junrong Li, and Xiaofeng Li. 2017. "Lipase-Catalyzed Synthesis of Long-Chain Cellulose Esters Using Ionic Liquid Mixtures as Reaction Media." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 92:1203–10.
- Wang, Jianlong and Can Chen. 2014. "Chitosan-Based Biosorbents: Modification and Application for Biosorption of Heavy Metals and Radionuclides." *Bioresource Technology* 160:129–41.
- Wang, San Lang, Hue Tin Lin, Tzu Wen Liang, Yu Jen Chen, Yue Horng Yen, and Shian Pin Guo. 2008. "Reclamation of Chitinous Materials by Bromelain for the Preparation of Antitumor and Antifungal Materials." *Bioresource Technology* 99:4386–93.
- Wang, Wen Tao, Jiang Zhu, Xiu Li Wang, Yan Huang, and Yu Zhong Wang. 2010. "Dissolution Behavior of Chitin in Ionic Liquids." *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics* 49:528–41.
- Wei, Guoguang, Alei Zhang, Kequan Chen, and Pingkai Ouyang. 2017. "Enzymatic Production of N-Acetyl-D-Glucosamine from Crayfish Shell Wastes Pretreated via High Pressure Homogenization." *Carbohydrate Polymers* 171:236–41.
- Weiss, P. 2009. "La Chimie Des Polymères." P. 17 in.
- Welton, Tom. 2018. "Ionic Liquids : A Brief History." *Biophysical Reviews* 10:691–706.
- Wu, Boning, Kosuke Kuroda, Kenji Takahashi, and Edward W. Castner. 2018. "Structural Analysis of Zwitterionic Liquids vs. Homologous Ionic Liquids." *Journal of Chemical Physics*

148:193807.

Xia, Wenshui, Ping Liu, Jiali Zhang, and Jie Chen. 2011. "Biological Activities of Chitosan and Chitooligosaccharides." *Food Hydrocolloids* 25:170–79.

Xu, Guo-chao, Ji-cai Ding, Rui-zhi Han, Jin-jun Dong, and Ye Ni. 2016. "Bioresource Technology Enhancing Cellulose Accessibility of Corn Stover by Deep Eutectic Solvent Pretreatment for Butanol Fermentation." *Bioresource Technology* 203:364–69.

Yang, Bin, Ziyu Dai, Shi You Ding, and Charles E. Wyman. 2011. "Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass." *Biofuels* 2:421–49.

Yang, Dong, Lin Xin Zhong, Tong Qi Yuan, Xin Wen Peng, and Run Cang Sun. 2013. "Studies on the Structural Characterization of Lignin, Hemicelluloses and Cellulose Fractionated by Ionic Liquid Followed by Alkaline Extraction from Bamboo." *Industrial Crops and Products* 43:141–49.

Yang, Qiwei, Jingyi Hu, Wei Zhu, Guoping Qian, and Huabin Xing. 2014. "Solvatochromic Parameters of the Binary Mixtures of Imidazolium Chloride Ionic Liquid Plus Molecular Solvent." *Journal of Applied Solution Chemistry and Modeling* 3:223–30.

Yoshida, Naoto, Takayuki Ikeda, Terutoyo Yoshida, Takahumi Sengoku, and Kihachiro Ogawa. 2001. "Chrysotile Asbestos Fibers Mediate Transformation of Escherichia Coli by Exogenous Plasmid DNA." *FEMS Microbiology Letters* 195:133–37.

Younes, Islem and Marguerite Rinaudo. 2015. "Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications." *Marine Drugs* 13:1133–74.

Yuan, Yang, Shu Hong, Hailan Lian, Kaitao Zhang, and Henrikki Liimatainen. 2020. "Comparison of Acidic Deep Eutectic Solvents in Production of Chitin Nanocrystals." *Carbohydrate Polymers* 236:116095.

Zafer, Ceylan, Kasim Ocakoglu, Cihan Ozsoy, and Siddik Icli. 2009. "Electrochimica Acta Dicationic Bis-Imidazolium Molten Salts for Efficient Dye Sensitized Solar Cells : Synthesis

- and Photovoltaic Properties." *Electrochimica Acta* 54:5709–14.
- Zarski, Arkadiusz, Sylwia Ptak, Przemyslaw Siemion, and Janusz Kapusniak. 2016. "Esterification of Potato Starch by a Biocatalysed Reaction in an Ionic Liquid." *Carbohydrate Polymers* 137:657–63.
- Zdanowicz, Magdalena, Katarzyna Wilpiszewska, and Tadeusz Spychaj. 2018. "Deep Eutectic Solvents for Polysaccharides Processing. A Review." *Carbohydrate Polymers* 200:361–80.
- Zhang, Alei, Cong Gao, Jing Wang, Kequan Chen, and Pingkai Ouyang. 2016. "An Efficient Enzymatic Production of N-Acetyl-d-Glucosamine from Crude Chitin Powders." *Green Chemistry* 18:2147–54.
- Zhang, Alei, Guoguang Wei, Xiaofang Mo, Ning Zhou, Kequan Chen, and Pingkai Ouyang. 2018. "Enzymatic Hydrolysis of Chitin Pretreated by Bacterial Fermentation to Obtain Pure: N - Acetyl-d-Glucosamine." *Green Chemistry* 20:2320–27.
- Zhang, Xiao. 2016. "Unique Low-Molecular-Weight Lignin with High Purity Extracted from Wood by Deep Eutectic Solvents (DES): A Source of Lignin for Valorization." *Green Chemistry* 18:5133.
- Zhao, Guanglei, Xiongfei Lang, Fengli Wang, Junrong Li, and Xiaofeng Li. 2017. "A One-Pot Method for Lipase-Catalyzed Synthesis of Chitosan Palmitate in Mixed Ionic Liquids and Its Characterization." *Biochemical Engineering Journal* 126:24–29.
- Zhao, Hua, Gary A. Baker, and Shaletha Holmes. 2011. "Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Protease Activation in Glycerol-Based Deep Eutectic Solvents." *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* 72:163–67.
- Zhao, Weifeng, Karin Odelius, Ulrica Edlund, Changsheng Zhao, and Ann-christine Albertsson. 2015. "In Situ Synthesis of Magnetic Field-Responsive Hemicellulose Hydrogels for Drug Delivery." *Biomacromolecules* 16:2522–28.
- Zhu, Ping, Zhongji Gu, Shu Hong, and Hailan Lian. 2017. "One-Pot Production of Chitin with High

Purity from Lobster Shells Using Choline Chloride–Malonic Acid Deep Eutectic Solvent.”
Carbohydrate Polymers 177:217–23.

Zlotnikov, K. M., A. V. Kazakov, N. G. Vinokurova, and A. K. Zlotnikov. 2007. “Study of Chitin-Glucan Complexes from the Soil Micromycete *Cephalophora Tropica* D3.” *Applied Biochemistry and Microbiology* 43:449–52.

Résumé de thèse

La chitine est le second biopolymère le plus répandu sur terre après la cellulose. On la retrouve essentiellement dans les crustacés, les insectes et les champignons. Actuellement, ce polysaccharide est majoritairement extrait des carapaces de crustacés dont le procédé comprend deux étapes importantes : la déminéralisation et la déprotéinisation. Bien qu'efficace, cette méthode reste à ce jour polluante, énergivore et chronophage. Dans ce manuscrit, nous nous sommes focalisés sur les deux sources de crustacés et d'insectes. Cette dernière a été dictée par l'émergence et le développement de la bioraffinerie de l'insecte. En effet, les cuticules d'insectes possèdent la particularité d'être naturellement pauvres en minéraux (<6% vs 30-50% dans le cas des crustacés) permettant ainsi de nous affranchir de l'étape de déminéralisation. En plus de son abondance élevée, la chitine est dotée de propriétés physicochimiques et biologiques exceptionnelles. Toutefois, ce biopolymère semi-cristallin possède un réseau de liaisons hydrogène qui lui confère un caractère récalcitrant réduisant considérablement les champs d'applications potentielles. La valorisation de ce polymère en produits à haute valeur ajoutée nécessite alors au préalable une étape de prétraitement chimique/mécanique. Les travaux reportés dans ce mémoire sont basés sur la solvatisation partielle de biomasses brutes de chitine (crustacés, insectes) et de chitines purifiées (>90%) en milieu non conventionnel de type liquide ionique. En fonction de leurs propriétés physicochimiques, de leur cytotoxicité et de l'application visée, trois familles de LIs ont été choisies : les liquides ioniques à base de noyau imidazolium (ILs), les liquides ioniques zwitterioniques (ZILs) et les solvants eutectiques profonds (DES). L'impact de ces prétraitements sur la structure supramoléculaire de la chitine est décrit et nous avons alors mis en évidence, dans certain cas, une rupture du réseau cristallin. Une meilleure accessibilité aux fibres par les enzymes (hydrolyse enzymatique de la chitine) ou par la soude (désacétylation de la chitine) a également été démontrée.

Mots clefs : Chitine, Chitosane, Valorisation de biomasse, Oligomères, Liquides ioniques, Prétraitements

Abstract

Chitin is the second most common biopolymer on earth after cellulose. It is mainly found in crustaceans, insects and fungi. Currently, this polysaccharide is mainly extracted from crustacean shells. The process includes two important steps: demineralization and deproteinization. Although efficient, this method remains polluting, energy consuming and time consuming. In this manuscript, we focused on the two sources of crustaceans and insects. The latter was dictated by the emergence and development of the insect biorefinery. Indeed, insect cuticles have the particularity of being naturally low in minerals (<6% vs 30-50% in the case of crustaceans) allowing us to free ourselves from the demineralization step. In addition to its high abundance, chitin has exceptional physicochemical and biological properties. However, this semi-crystalline biopolymer has a network of hydrogen bonds which gives it a recalcitrant character that considerably reduces the fields of potential applications. The valorization of this polymer into high added value products requires a chemical/mechanical pre-treatment step. The work reported in this thesis is based on the partial solvation of raw chitin biomasses (crustaceans, insects) and purified chitins (>90%) in non-conventional media of ionic liquid type. Depending on their physicochemical properties, cytotoxicity and intended application, three families of LIs were chosen: imidazolium core-based ionic liquids (ILs), zwitterionic ionic liquids (ZILs) and deep eutectic solvents (DES). The impact of these pretreatments on the supramolecular structure of chitin is described and we have then highlighted, in some cases, a disruption of the crystal lattice. A better accessibility to the fibers by enzymes (enzymatic hydrolysis of chitin) or by soda (deacetylation of chitin) has also been demonstrated.

Keywords: Chitin, Chitosan, Biomass valorization, Oligomers, Ionic liquids, Pretreatments