



HAL
open science

Etude de la déconstruction de résidus agricoles lignocellulosiques par extrusion biocatalytique

Etienne Gatt

► **To cite this version:**

Etienne Gatt. Etude de la déconstruction de résidus agricoles lignocellulosiques par extrusion biocatalytique. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2019. Français. NNT : 2019INPT0006 . tel-04158638

HAL Id: tel-04158638

<https://theses.hal.science/tel-04158638v1>

Submitted on 11 Jul 2023

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

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



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

M. ETIENNE GATT

le jeudi 24 janvier 2019

Titre :

Etude de la déconstruction de résidus agricoles lignocellulosiques par
extrusion biocatalytique

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (L.C.A.)

Directeur(s) de Thèse :

M. LUC RIGAL

MME VIRGINIE VANDENBOSSCHE

Rapporteurs :

M. JULIEN BRAS, INP GRENOBLE

Mme CAROLINE REMOND, UNIVERSITE DE REIMS

Membre(s) du jury :

M. STÉPHANE GUILLOUET, INSA TOULOUSE, Président

M. ANTOINE ROUILLY, INP TOULOUSE, Invité

M. CHRISTOPHE GOURDON, INP TOULOUSE, Invité

M. LUC RIGAL, INP TOULOUSE, Membre

Remerciements

Je tiens à remercier M. Stéphane Guillouet d'avoir accepté d'examiner ce travail et présider le jury de soutenance. Merci à Mme Caroline Rémond pour avoir rapporté ce travail et pour votre regard critique et enrichissant sur la thématique si complexe des enzymes cellulolytiques. Merci à M. Julien Bras pour votre rapport précis et détaillé ainsi que pour les discussions très intéressantes lors de la soutenance. Merci aussi à M. Gourdon et M. Cameleyre pour avoir examiné cette thèse et participé à la soutenance.

Je remercie également M. Rigal et Mme Vandenbossche pour m'avoir permis de réaliser cette thèse avec beaucoup d'autonomie.

Un grand merci à Antoine pour m'avoir accompagné depuis maintenant bientôt 4 ans. Merci d'être aussi passionné et investi, de transmettre avec tant de joie la fibre de la recherche scientifique. Tu es un représentant de la science comme on l'aime, ta présence au laboratoire est une grande chance et ce fut un honneur de travailler avec toi (et qui sait peut être recommencer un jour).

Je remercie tout le socle du laboratoire, toutes ces petites mains indispensables au bon fonctionnement. À Anne, la gardienne du labo rouge, une main de velours dans un gant de rigueur. À Didier, Romain et tous les autres. À Karine, grande gardienne des finances et ronchonne authentique du déjeuner au LCA.

Merci évidemment aux autres doctorants présents au quotidien, camarades dans les bons comme les moins bons moments. Merci en particulier à Rémi, Nico, Nydia (alias le bureau 2-a2-27) et Kévin pour le café, la bonne humeur, le foot et bien d'autres choses qui font le sel de la vie au labo pendant 3 ans.

Merci au Canadiens, pour l'accueil mais aussi pour avoir enrichi ce travail au niveau scientifique et humain. Merci à Simon, Julien, Marguerite, Frédérique, Ilse. Merci bien sûr à Vinay et Marc dont la rencontre fut un réel plaisir scientifique.

Milles mercis à ma famille pour avoir cru en moi, m'avoir soutenu. Il est un havre de paix où l'on est bien et on mange bien, c'est un peu ça la définition de chez soi. Merci aussi à la famille Derot pour son accueil chaleureux et bienveillant.

Enfin merci à toi Éloïse, pour ta gentillesse et ton amour qui ont été des facteurs essentiels au cours de ces dernières années. Merci pour m'avoir entraîné en terre inconnue et m'avoir porté au cours de cette thèse.

Résumé

L'extrusion biocatalytique, ou bioextrusion, est une technique d'extrusion réactive utilisant des enzymes comme catalyseurs. Cette technique est considérée en temps qu'étape intermédiaire, subséquente au prétraitement physico-chimique et précédente à l'hydrolyse enzymatique en réacteur fermé. L'utilisation de l'extrusion permet un procédé continu, facilement modulable et adaptable à des conditions de hautes consistances, de nombreuses biomasses et facilement transférable à l'échelle industrielle. Néanmoins, les données bibliographiques font ressortir la complexité des entrants et leurs interactions lors de la bioextrusion de biomasses lignocellulosiques. Les conclusions des bioextrusions de biomasses amidonnées soulignent l'importance de l'étude de l'influence de la concentration en substrat et en enzymes.

Les résultats obtenus à partir de la bioextrusion des biomasses lignocellulosiques valident l'existence d'une activité enzymatique en extrudeuse malgré la contrainte thermomécanique et le temps de séjour limité. Lors de cette étape, l'hydrolyse de la fraction cellulosique est favorisée pour des milieux concentrés en substrat et en enzymes. Des modifications significatives des fractions cellulosiques cristallines et amorphes en surface, des réductions des tailles de particules, une dégradation visuelle des structures de la biomasse et l'augmentation de la sensibilité à la décomposition thermique, sont aussi observées sur la fraction solide.

L'hydrolyse enzymatique des bioextrudats est prolongée en réacteur fermé. La bioextrusion permet des améliorations significatives des taux et vitesses de conversion des sucres sur le long terme, jusqu'à 48 h. Les gains observés sont relativement constants pour la paille de blé et augmentent avec le temps pour les écorces de bouleau et les résidus de maïs. Post-extrusion, la concentration en substrat influence négativement la conversion des sucres. Cependant, les plus-values de conversion du glucose lié à la bioextrusion de paille de blé sont principalement observables pour des concentrations en substrat et en enzymes élevées. À partir de 4 h, des baisses significatives de la conversion du xylose sont observées après bioextrusion. Les déstructurations de la fraction solide, déjà observées au cours la bioextrusion, se poursuivent en réacteur fermé.

Les meilleurs résultats hydrolytiques aux niveaux des hautes charges en enzymes et en substrat sont associables aux bonnes conditions de mélanges caractéristiques des éléments bilobes. L'ensemble enzymatique est probablement réparti de façon plus homogène (mélange distributif) pour cibler plus de sites disponibles. De plus, le mélange dispersif limite la proximité entre enzymes de même type et les gènes associées. Le procédé d'extrusion permet une agitation efficace, un bon transfert de masse et probablement un meilleur contact entre enzymes et substrat. Les moins bons résultats de conversion du xylose sont probablement à relier à des phénomènes d'adsorption non-spécifique, ou encore de désactivation des hémicellulases, provoqués par l'intensité des contraintes thermomécaniques et les résidus ligneux. Les bons résultats de déstructuration après bioextrusion sont associables à une action synergique des contraintes mécanique et biochimique.

Les analyses d'autofluorescence montrent l'évolution de la fraction ligneuse dans le processus de déconstruction de la fraction solide. Une production progressive de particules très fines, visiblement associée à la fraction ligneuse, est observée. Des complexes lignine-carbohydres sont aussi détectés dans la fraction liquide. Etant peu, voire pas hydrolysable par voie enzymatique, ces fractions hétéropolymériques sont un frein à la déconstruction. Si la déstructuration des lignines est probablement majoritairement liée au prétraitement alcalin, le procédé de bioextrusion provoque une diminution de la teneur en hétéropolymères de plus hautes masses moléculaires.

Summary

Biocatalytic extrusion, also named bioextrusion, is a reactive extrusion technique using enzymes as catalysts. Bioextrusion is considered as a link between the previous physico-chemical pretreatment (like alkaline extrusion) and the subsequent enzymatic hydrolysis in batch conditions. The extrusion allows a continuous, flexible and versatile process for high consistency media, easily transferable to the industrial level. However, complexity of both lignocellulosic biomass and lignocellulolytic enzymes and their interactions during the extrusion process are underlined by the literature. Numerous response surface methodology experiments with starchy biomass indicate that bioextrusion efficiency is mainly influenced by substrate and enzymes loading.

Enzymatic activity during the bioextrusion process of lignocellulosic biomass is confirmed by the experiments despite the mechanical constraints and the limited residence time. During bioextrusion, best holocellulosic fraction hydrolysis results were obtained with high substrate and enzymes loadings. Significant modifications of the solid fraction like particle size reduction, visual deconstruction of the biomass structure, increased sensibility to thermal decomposition and the evolution of the surface exposure of crystalline and amorphous cellulose were observed.

Enzymatic hydrolysis of the bioextrudates is prolonged in batch conditions. Clear improvements of speeds and rates of sugars conversion up to 48 h indicate a long term influence of the bioextrusion. Gain observed are steady for the pretreated wheat straw whereas it increases with time for corn residues and birch barks. Post-extrusion, a negative influence of the substrate loading is measured. However, best enhancements for the glucose conversion of pretreated wheat straw are detected for high substrate and enzymes loadings. From 4 to 48 h, significant losses in xylose conversion are measured with previous bioextrusion. Indicators of the solid fraction deconstruction, observed during the bioextrusion step, indicate a stronger biomass degradation after 48 h.

Improvements of glucose conversion rates can be associated with good mixing conditions of the extruder, especially due to the use of kneading elements. Enzymes are probably more homogeneously distributed (distributive mixing) and can access more catalytic sites available. Moreover, dispersive mixing limits the enzyme jamming due to the biocatalysts concentration. Extrusion process permits a better agitation efficiency, good mass transfer conditions and probably a higher contact between substrate and enzymes. Lower xylose conversion results may be attributed to non-specific adsorptions or inactivation phenomena due to mechanical constraints and lignin residues. Good deconstruction results on the solid fraction may be associable with a synergetic action between mechanical and biochemical constraints.

Autofluorescent signal analysis of the lignin fraction show its evolution during the deconstruction of the solid residue. During the hydrolysis, a progressive production of very small particles, appearing to be associated with the lignin fraction is observed. Lignin-carbohydrate complexes are also detected in the liquid fraction. These heteropolymeric complexes, difficult or even impossible for the enzymes to hydrolyze, are an obstacle to the biomass valorization. If lignin deconstruction is mainly due to the alkaline pretreatment, bioextrusion process seems to reduce the proportion of these heteropolymers with high molecular weights.

Table des matières

Introduction générale.....	1
1. Chapitre I : Etat de l'art.....	5
1.1. Biomasse lignocellulosique	7
1.1.1. Composition macroscopique des biomasses lignocellulosiques utilisées	7
1.1.2. Composition des tissus végétaux au sein des organes caulinaires.....	10
1.1.3. Composition chimique des tissus végétaux.	11
1.1.4. Résistance de la lignocellulose à l'hydrolyse enzymatique.....	19
1.1.5. Conclusion	19
1.2. L'extrusion, un procédé de prétraitement de la biomasse lignocellulosique.....	19
1.2.1. Extrudeuse bi-vis corotative	20
1.2.2. Prétraitement en extrusion alcaline.	21
1.2.3. Conclusion	22
1.3. Enzymes lignocellulolytiques.....	22
1.3.1. Glycosidases (Glycoside hydrolases).....	22
1.3.2. Oxydases	27
1.3.3. Conclusion	29
1.4. Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: a review.....	29
1.4.1. Introduction	32
1.4.2. Bioextrusion: combining thermomechanical treatment with enzyme catalysis .	34
1.4.3. Future prospects	53
1.4.4. Conclusion	54
1.5. Conclusion du chapitre.....	54
1.6. Références.....	56
2. Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.....	66
2.1. Prétraitement de la paille de blé	68
2.1.1. Conditions d'extrusion réactive alcaline.....	69
2.1.2. Influence du prétraitement.....	70
2.1.3. Conclusion	72
2.2. Plan expérimental : Etude de l'influence des facteurs de consistance et de charge enzymatique.....	73
2.2.1. Définition du domaine d'expérimentation.....	73
2.2.2. Conditions de bioextrusion	76
2.2.3. Résultats et discussions du plan d'expérience en bioextrusion	78

1.2.	Conclusion du chapitre.....	120
1.3.	Références.....	122
3.	Chapitre III : Etude de l'influence de la bioextrusion sur la fraction résiduelle solide ..	131
3.1.	Introduction	133
3.2.	Matériels et méthodes	133
3.2.1.	Mesures de conversion des sucres	133
3.3.	Fractionnement de la biomasse	134
3.4.	Mesures d'autofluorescence au microscope confocal.....	135
3.4.1.	Matériel et méthodes.....	136
3.4.2.	Observations microscopiques générales.....	136
3.4.3.	Mesures qualitatives de l'autofluorescence superficielle.....	139
3.4.4.	Conclusion et discussion.....	140
3.5.	Analyses en infrarouge.....	140
3.6.	Analyses thermogravimétriques	143
3.1.1.	Influence de l'étape de prétraitement	143
3.1.2.	Influence de l'étape de bioextrusion	145
3.1.3.	Influence de l'hydrolyse enzymatique.....	146
3.1.4.	Conclusion	146
3.2.	Conclusions et discussions.	147
3.3.	Références.....	148
4.	Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.	150
4.1.	Introduction du chapitre.....	152
4.2.	Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: new insight into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules	153
4.2.1.	Introduction	154
4.2.2.	Materials and methods.....	156
4.2.3.	Results and discussion.....	159
4.2.4.	Industrial perspectives.....	167
4.2.5.	Conclusions	167
4.1.	Résultats cinétiques de l'hydrolyse enzymatique.....	168
4.1.1.	Maïs brut.....	168
4.1.2.	Maïs prétraité	171
4.1.3.	Vitesses initiales de réaction	171
4.1.4.	Conclusion	172

4.2.	Bioextrusion d'écorces de bouleau.....	173
4.3.	Conclusion et discussions du chapitre.....	175
4.4.	Références.....	177
M.	Matériel et méthodes	180
M.1.	Matériel.....	182
M.1.1.	Paille de blé.....	182
M.1.2.	Résidus de maïs.....	182
M.1.3.	Ecorces de bouleau blanc.....	182
M.1.4.	Cocktails enzymatiques	182
M.1.5.	Extrudeuses	182
M.2.	Méthodes.....	182
M.2.1.	Analyse de la fraction liquide	182
M.2.2.	Analyse des fractions solides.....	184
M.2.3.	Analyses enzymatiques	189
M.3.	Méthodes de calcul.....	191
M.3.1.	Vitesses de conversion des sucres.....	191
M.3.2.	Energie mécanique spécifique (EMS).....	191
M.3.3.	Plans pour surfaces de réponse (Doehlert).....	191
M.4.	Références	192
	Conclusion générale.....	193
	Productions scientifiques.....	197
A.	Annexes	199
A.1.	Données de l'étape de bioextrusion.	200
A.2.	Données plans d'expérience avec bioextrusion (paille de blé prétraitée).....	201
A.3.	Données plans d'expérience sans bioextrusion (paille de blé prétraitée).....	205
A.4.	Données plans d'expérience comparaison avec et sans bioextrusion (paille de blé prétraitée).....	206
A.5.	Données complémentaires des chromatographies en exclusion stérique.....	207
A.6.	Bioextrusion de paille de blé prétraitée avec des laccases.....	208

Liste des abréviations :

ATG	Analyses ThermoGravimétriques
BAB	Blue Agave Bagasse
BB	Bilobes
BS	Barley Straw
C2F	Convoyage double filet
CBH	Exocellulases
CBM	Domaines de Liaison à la Cellulose (Cellulose Binding Domains)
CC17	Probe eCFP-CBM17
CES	Chromatographie d'Exclusion Stérique
CF2C	Contrefilet à double filets conjugués
DE	Dextrose equivalent
DNS	Méthode de dosage à l'acide 3,5-dinitrosalicylique
DP	Degré de Polymérisation
DTG	Dérivée des mesures ThermoGravimétriques
EB	Ecorces Brutes
EG	Endocellulases
expériences E	expériences sans bioextrusion
expériences	expériences avec bioextrusion
XE	
facteur E	facteur de charge enzymatique
facteur S	facteur de ratio S/L
FTCM	Fluorescent protein-tagged carbohydrate-binding modules method
GC3a	Probe eGFP-CBM3a
GFP	Green Fluorescent Protein
GPC	Gel Permeation Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTST	High Temperature and Short Time extrusion
IRTF	Infra-Rouge à Transformée de Fourier
LCB	Lignocellulosic Biomass
LCC	Complexes Lignine-Carbohydrate
MB	Maïs brut
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MP	Maïs Prétraité
MS	Matière Sèche
OPEFB	Oil Palm Empty Fruit Bunch
PB	Paille Brute
PC	Alkaline Pretreated Corn
PMO	Polysaccharides MonOxygénases
PP	Paille Prétraitée
RC	Raw Corn

r_{HD}	Taux de déconstruction de l'holocellulose
SC	Sweet Corn co-products
SEM	Scanning Electron Microscopy
SME	Specific Mechanical Energy
T2F	Trapézoïdale double filet
V_{Ei}	Vitesse initiale de conversion au cours de la bioextrusion
V_f	Vitesse finale de conversion
V_{Ri}	Vitesse initiale de conversion en réacteur fermé
WSI	Water Solubility Index
β -GLU	β -glucosidases
\bar{M}_m	Masse molaire moyenne en masse

Introduction générale

Contexte de départ : La production de bioéthanol 2^{ème} génération

La demande croissante en énergie et en matériaux, combinée à l'augmentation des émissions de dioxyde de carbone (CO₂) et à la raréfaction des réserves en énergies fossiles, pose aujourd'hui, plus que jamais, un problème majeur. Il devient nécessaire de trouver d'autres sources d'énergie et de synthons chimiques, durables et abondantes. Dans ce cadre, la valorisation de la biomasse lignocellulosique apparaît une réponse idoine à cette problématique. Cette biomasse est, en effet, à la fois disponible en grandes quantités, en sources diverses et sur la majeure partie de la surface du globe. Elle se présente sous différentes formes, allant des résidus (déchets de récoltes, déchets industriels), aux cultures dédiées (comme la foresterie). Sa production annuelle est estimée à 100 Mt de matière sèche annuelle pour un total de 185 Gt de matière sèche disponible (Bar-On et al., 2018). L'une des voies de valorisation de la biomasse lignocellulosique est la production de biocarburants de 2^{ème} génération.

Les biocarburants de 2^{ème} génération sont définis comme obtenus à partir de biomasse lignocellulosique selon des procédés convertissant l'intégralité de la biomasse. Les matières premières agricoles utilisées doivent présenter une compétition limitée entre l'usage alimentaire et non alimentaire (Broust et al., 2013). La voie principale d'obtention est la voie biochimique. Elle se compose de deux phases : l'hydrolyse des polysaccharides sous forme de sucres simples, puis de la fermentation de ces sucres en éthanol. Cependant sa production est restreinte par une matière première complexe et récalcitrante. Pour surmonter cette limite, l'étape d'hydrolyse enzymatique est précédée d'un prétraitement de la biomasse, de façon à augmenter l'accessibilité de la cellulose (Broust et al., 2013; Himmel et al., 2007a).

Les projets BABETHANOL et BABET REAL 5 à l'origine de la bioextrusion.

Le projet international BABETHANOL est né dans ce contexte de production de carburants alternatifs, biosourcés et renouvelables. Projet collaboratif entre l'Europe et l'Amérique latine, financé par la communauté européenne dans le cadre du « Seven Framework Programme » (FP7/2007-2013 ; n°227498), il associe 13 acteurs provenant de 11 pays différents que sont la France, le Mexique, l'Espagne, la Finlande, le Costa Rica, l'Italie, l'Uruguay, le Brésil, le Chili, le Paraguay et l'Argentine.

Dans la continuité c'est ouvert le projet BABET REAL 5 (Program Horizon 2020/ N° 654365), dont l'objectif est de développer une solution alternative pour la production de bioéthanol de seconde génération à l'échelle pilote et industrielle. Cette solution doit être adaptable à une large diversité de résidus agricoles, pour différentes positions géographiques de pays Européens et dans le monde. Le LCA (Laboratoire de Chimie Agro-industrielle) intervient dans ces projets afin d'apporter son expertise dans le fractionnement des Agroressources et les procédés de transformation agroindustrielle, tels que l'extrusion bi-vis.

Dans le cadre de ces projets, le prétraitement des résidus lignocellulosiques par extrusion réactive alcaline a été retenu. Cette technique de prétraitement a fait plusieurs fois ses preuves

et permet un procédé continu et facilement adaptable aux différentes biomasses (Duque et al., 2017; Vandenbossche et al., 2014c). Parmi les différentes innovations issues de BABETHANOL, se trouve l'introduction du cocktail enzymatique cellulolytique directement en fin de prétraitement par extrusion alcaline (Duque et al., 2014; Vandenbossche et al., 2014a). L'initiation d'une courte extrusion biocatalytique (appelée bioextrusion) a permis à de multiples reprises l'amélioration de l'étape subséquente au prétraitement, l'hydrolyse enzymatique en réacteur fermé (Duque et al., 2014; Gatt et al., 2018; Vandenbossche et al., 2016). Ce projet de thèse est donc issu de ces différents constats et a pour vocation de mieux comprendre les mécanismes associés à la bioextrusion et permettant une meilleure hydrolyse de la lignocellulose.

Le premier chapitre de cette étude est un état de l'art des connaissances relatives à l'hydrolyse enzymatique des biomasses lignocellulosiques. Dans un premier temps, la structure et composition des principaux résidus agricoles utilisés dans cette étude est détaillée. Deuxièmement, un bref résumé du procédé d'extrusion bi-vis comme technique de prétraitement des biomasses lignocellulosiques est réalisé. Troisièmement, les connaissances relatives aux enzymes et cocktails enzymatiques utilisés pour l'hydrolyse de la lignocellulose sont résumés. Enfin, une revue de la littérature sous forme de publication fait la synthèse et tente d'extraire les principaux enjeux liés à la technique de bioextrusion.

Le deuxième chapitre présente l'application des perspectives de recherches formulée par la revue de littérature. Plusieurs plans d'expériences sont réalisés afin d'étudier l'impact de la charge enzymatique et de la concentration en substrat lors de l'étape de bioextrusion et sur l'hydrolyse subséquente en réacteur fermé de la paille de blé. Une courte description de l'étape de prétraitement par extrusion alcaline de la paille de blé est d'abord présentée. Ensuite, plusieurs résultats, principalement associés à l'étude de la fraction liquide issue de l'hydrolyse enzymatique sont analysés. Les mesures obtenues à partir des bioextrudats sont enfin comparées à celles obtenues dans des conditions plus classiques.

Le troisième chapitre s'attarde sur l'étude de résidus solides issus des réactions de bioextrusion et d'hydrolyse en réacteur fermé, pour une condition donnée. Il met en avant des résultats complémentaires aux mesures faites sur les fractions liquides. Des mesures de tailles de particules, d'autofluorescence, d'infrarouge et des mesures thermogravimétriques permettent d'associer aux modifications observées dans le milieu liquide, des modifications sur la fraction solide attestant de la dégradation de la biomasse.

Enfin le quatrième chapitre présente la bioextrusion d'autres biomasses lignocellulosiques (maïs, écorces de bouleau). L'influence du prétraitement physico-chimique (alcalin) est étudiée par l'utilisation de substrat prétraité ou non. Les résultats finaux de la bioextrusion de résidus de maïs (après 48 h), sont présentés sous forme de publication. Parmi les différentes mesures effectuées, une technique originale de marquage fluorescent spécifique permet d'estimer la part relative de cellulose cristalline et amorphe exposée suivant les différents traitements. Finalement, la comparaison des différentes biomasses permet d'observer l'influence du substrat.

Etude de l'influence de l'extrusion biocatalytique dans la déconstruction de résidus agricoles lignocellulosiques

Introduction Générale & Contexte

Biomasse lignocellulosique

Cocktails cellulolytiques

Extrudeuse bi-vis

Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: A review

- Bioextrusion = Extrusion réactive avec des enzymes
- Conclusions des expériences de recherche sur la bioextrusion de biomasses amidonnées
- Perspectives pour la bioextrusion de biomasses lignocellulosiques

Chap. I
Etat de l'art



Questions de recherche :

- Quels sont les impacts de la bioextrusion sur la déconstruction de la biomasse lignocellulosique
Sur le court terme : durant le procédé de bioextrusion ?
Sur le long terme : durant l'hydrolyse subséquente en réacteur fermé ?
- Comment le procédé de bioextrusion peut-il influencer l'hydrolyse enzymatique de résidus lignocellulosiques en milieux concentrés en substrat ?

Chap. II

Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- Prétraitement physico-chimique en extrusion de la paille de blé pour faciliter l'étape d'hydrolyse.
- Etude de l'influence des facteurs de consistance et de charge enzymatique sur l'hydrolyse de la paille de blé après bioextrusion.
- Etude de l'influence de la bioextrusion : comparaison des résultats hydrolytiques avec et sans cette étape.

Discussions
Conclusion

Chap. III

Etude de l'influence de la bioextrusion sur la fraction résiduelle solide

- Évaluation du fractionnement de la biomasse (mesure de tailles de particules)
- Observations générales et qualitatives de la biomasse et de fraction ligneuse superficielle (microscopie confocale et autofluorescence)
- Analyse de la composition physico-chimique par infrarouge.
- Analyse de la décomposition thermique du matériau lignocellulosique (thermogravimétrie)

Discussions
Conclusion

Chap. IV

Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

- Influence de la bioextrusion sur la conversion des résidus de maïs après 48 h d'hydrolyse avec suivi de la fraction cellulosique exposée.
- Aspect cinétique de l'influence de la bioextrusion sur l'hydrolyse des résidus de maïs caulinaires.
- Bioextrusion de fragments d'écorce de bouleau blanc. Influence de la bioextrusion sur un substrat très riche en lignines.

Discussions
Conclusion

Procédé :
Bioextrusion
+
Hydrolyse en réacteur
fermé

Solide

ATG, FTIR, Autofluorescence, FCM, NREL, ADF/NDF

Liquide

HPLC, GPC-SEC

Enzymes

Activités enzymatiques, hydrolysabilité

Chap. M
Matériel et
méthodes

Perspectives de recherche
Conclusion Générale

1. Chapitre I :

Etat de l'art

-
- Structure et composition des résidus agricoles lignocellulosiques étudiés.
 - Présentation du procédé d'extrusion utilisé pour réaliser l'étape de bioextrusion.
 - Enzymes lignocellulolytiques impliquées dans le processus de dégradation par hydrolyse ou oxydation.
 - Revue de la littérature sur l'utilisation d'enzymes en extrusion réactive. Etude du cas particulier de la bioextrusion d'amidon. Résumé des résultats obtenus pour la lignocellulose.
-

1.1. Biomasse lignocellulosique

La biomasse est définie comme la masse totale de l'ensemble des êtres vivants occupant, à un moment donné, un biotope défini (Dictionnaire Larousse 2009). La lignocellulose est quant à elle une matière dont les trois composants principaux sont la cellulose, les hémicelluloses et les lignines. Le terme lignocellulose réfère communément (et de façon imprécise) à la biomasse végétale structurale. Il fait cependant référence précisément aux parois végétales secondaires présentes dans ces structures. La volonté initiale des projets BABETHANOL et BABETREAL est la production de bioéthanol de 2nd génération. Comme détaillé en introduction Contexte de départ : La production de bioéthanol 2^{ème} génération), la 2^{ème} génération de biocarburants se définit par l'utilisation d'une biomasse lignocellulosique entrant le moins possible en concurrence avec l'alimentation. C'est la raison pour laquelle les matières premières choisies pour ce projet sont des résidus, coproduits agricoles. Le choix de matières issues de productions agricoles céréalières s'explique par leur grande disponibilité. En France, d'après le Bureau des Statistiques sur les Productions et les Comptabilité Agricoles, l'ensemble des surfaces de blés et de maïs représentent respectivement un peu plus de 45% et 12% de l'ensemble des surfaces cultivées de céréales, oléagineux et protéagineux sur l'année 2017 (Agreste, 2017). L'ensemble des pailles, toutes céréales confondues, représente une masse de 17 603 934 tonnes sur cette même année.

1.1.1. Composition macroscopique des biomasses lignocellulosiques utilisées

1.1.1.1. Précision du domaine d'étude

Les deux types de biomasses lignocellulosiques utilisées lors de ce projet sont, de la paille de blé (*Triticum*) (PB) et des résidus de culture de maïs (*Zea mays L.*) (RM).

Notre domaine d'étude se limite donc ici à des organes végétaux caulinaires, tiges, feuilles et pour le cas du maïs une faible proportion de rafle. Ces deux résidus de biomasse sont issus de plantes angiospermes, monocotylédones de la famille des poacées (anciennement graminées). Les monocotylédones sont notamment caractérisées par une structure herbacée. Celle-ci présente une organisation des tissus au sein des organes végétaux caulinaires qui leur est propre (Roland et al., 2008; Speranza et al., 2005).

1.1.1.2. Organisation des organes végétaux caulinaires

1.1.1.2.1. Tiges Monocotylédones

On distingue trois types de structures différentes dans la composition de la tige, la zone épidermique, la zone corticale, le cylindre central (ayant disparu dans certains cas).

1.1.1.2.1.1. Tiges creuses (blé)

C'est le cas de la majorité des tiges de graminées cultivées. Dans notre cas d'étude, le blé présente une tige creuse appelée communément paille ou chaume. Ces tiges présentent un épiderme réduit (une à deux couches cellulaires), une zone corticale composée d'îlots de parenchyme dans une matrice de sclérenchyme lignifié et un cylindre central creux composé de faisceaux cribro-vasculaires (collatéral fermé) dans une matrice de cellules parenchymateuses à grandes cellules (figure 1-1).

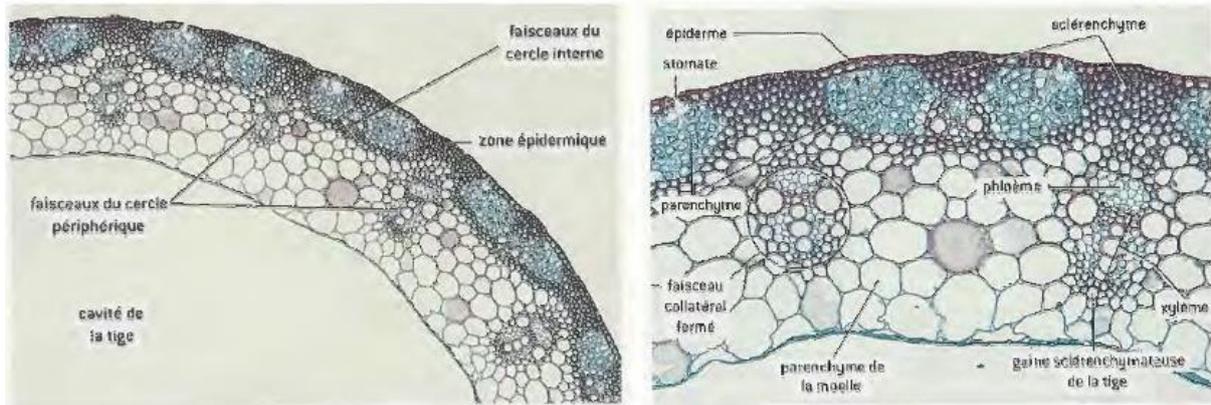


Figure 1-1 : Coupe transversale d'une tige de blé (Speranza et al., 2005).

1.1.1.2.1.2. Tiges pleines (maïs)

Elles possèdent un épiderme réduit (une à deux couches cellulaires), une zone corticale sous forme d'une matrice de parenchyme et de tissus de soutien et un cylindre central composé de faisceaux cribro-vasculaire dispersés dans une matrice parenchymateuse (appelé parenchyme médullaire). Chez les monocotylédones, la zone intermédiaire est réduite et composée uniquement de parenchyme et d'îlots de sclérenchyme lignifié. Sur les coupes transversales d'organes la double coloration indique le composant principal du tissu (figure 1-2 et 1-3). Coloration en rose-rouge par le carmin aluné pour les tissus cellulodiques et coloration en vert par le vert d'iode pour les tissus lignifiés.

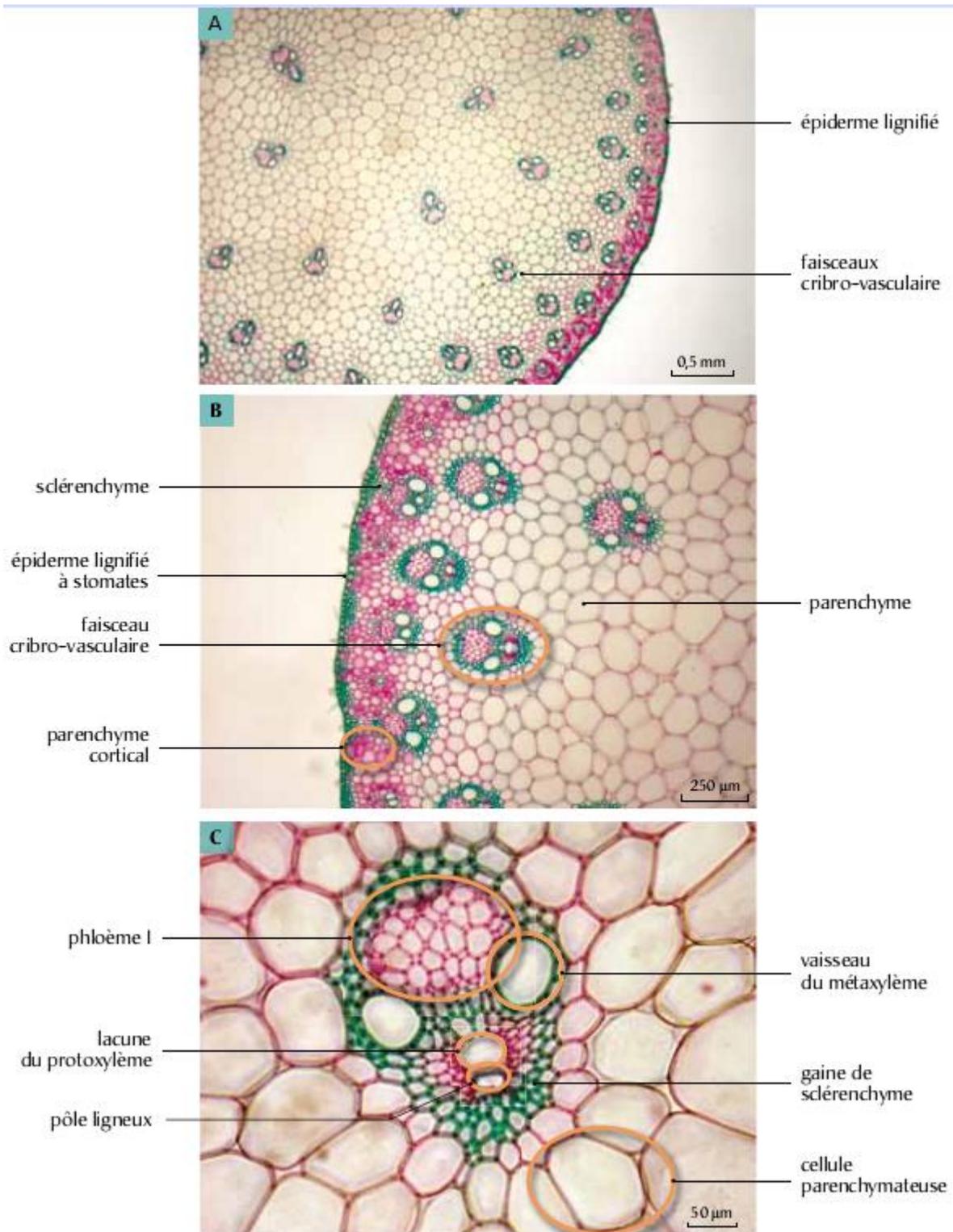


Figure 1-2 : Coupe transversale d'une tige de maïs (Jannah, 2013).

1.1.1.2.2. Feuilles

Cet organe est à symétrie bilatérale, composé d'un mésenchyme (tissu très chlorophyllien) et entouré d'un épiderme lui-même protégé par une cuticule. On distingue généralement un parenchyme palissadique aux cellules alignées et siège principale de la photosynthèse, d'un parenchyme lacuneux contenant des espaces aérifères. Des nervures parcourent la feuille afin de permettre l'évacuation et l'approvisionnement des métabolites. Celles-ci sont parallèles chez

les monocotylédones. On distingue chez ces dernières trois spécialisations distinctes, les feuilles non charnues, les feuilles charnues et les gaines foliaires. Dans le cas du maïs et du blé ce sont des feuilles non charnues, assez minces avec un épiderme mince riche en cuticule. Les faisceaux criblo-vasculaires sont entourés d'une gaine de sclérenchyme plus ou moins importante avec parfois la présence d'îlots de sclérenchyme. Ces îlots peuvent englober et relier les faisceaux avec les deux faces de la feuille (figure 1-3).

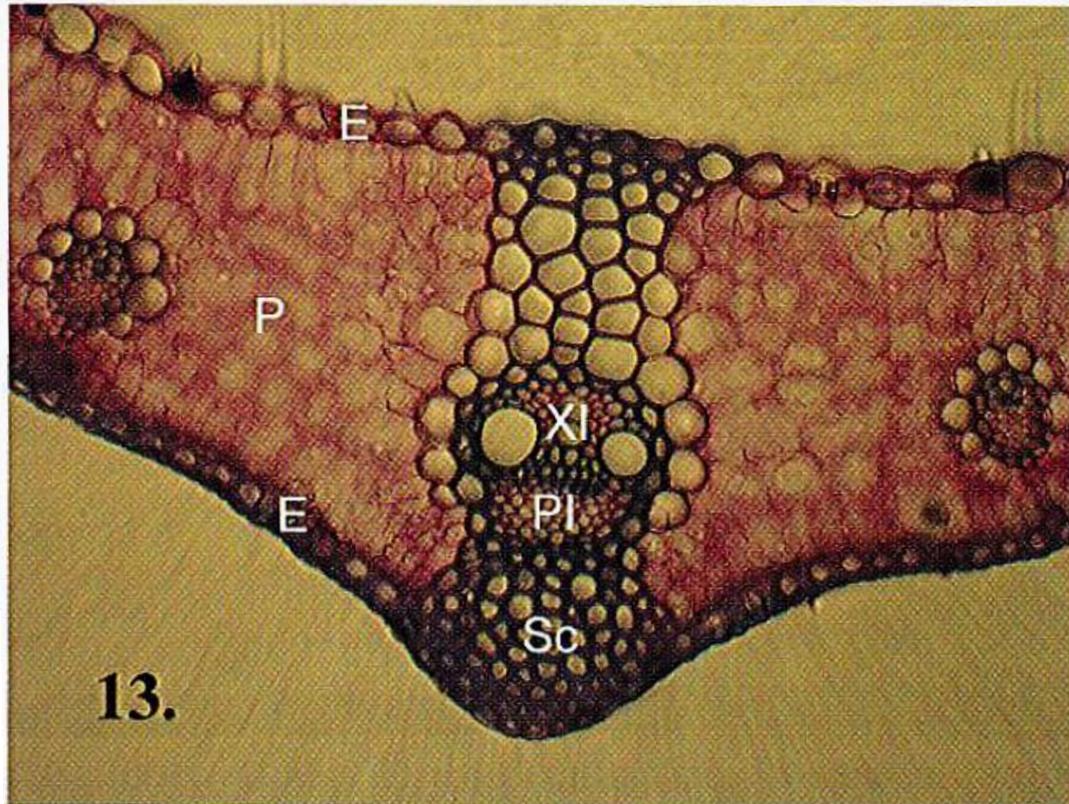


Figure 1-3 : Coupe transversale dans une feuille caduque de blé (Roland et al., 2008). E, épiderme ; Co, collenchyme ; PI ; phloème primaire ; Sc, sclérenchyme ; XI, xylème primaire (x100)

1.1.2. Composition des tissus végétaux au sein des organes caulinaires.

L'ensemble de ces organes est composé de tissus végétaux. Dans le cas des plantes monocotylédones, seuls des tissus primaires, composés d'un seul type de cellules, sont présents (Roland et al., 2008).

1.1.2.1. Tissus permanents

Dont on dénombre 4 grands types :

- Tissus parenchymateux remplissant, avec un rôle variable suivant leur position.
- Tissus de soutien, collenchyme et sclérenchyme assurant le soutien et la rigidité.
- Tissus de revêtement ou épithéliaux assurant un rôle de protection.
- Tissus conducteurs transportant les substances organiques et inorganiques dans la plante.

Dans le cas de nos matières séchées et broyées, c'est principalement la composition de la paroi cellulaire des tissus qui nous intéresse.

1.1.2.1.1. Parenchymes

Il existe différents types, tels que les parenchymes chlorophylliens, de réserve, aérifères et xylémiens. Les parenchymes sont constitués de cellules peu différenciées (principalement au niveau des plastes), peu structurés, à tailles très variables. Les cellules ont une paroi cellulosique ou pecto-cellulosique peu lignifiée.

1.1.2.1.2. Tissus de soutien

1.1.2.1.2.1. Collenchyme

Tissu des organes jeunes et en croissance composé de cellules à parois épaisses mais seulement polysaccharidiques (comme les primaires). L'alternance de feuilletts celluloseux parallèles et perpendiculaire à l'axe cellulaire de façon concentrique, permet une bonne résistance (spécialement face à la traction).

1.1.2.1.2.2. Sclérenchyme

Ensemble divers de cellules de soutien (sclérocytes) aux parois secondaires leur conférant une grande dureté. A l'arrêt de la croissance de ces cellules, elles forment des parois secondaires constituées de strates de fibrilles celluloseux à inclinaison variables (résistance à la traction). Ces parois plastiques se sclérifient au cours du temps par imprégnation de lignine, ce qui les rigidifie (résistance à la compression) et conduit à leur mort progressive.

1.1.2.1.3. Tissus de revêtement (Epiderme, exoderme, endoderme.)

On dénombre trois types de tissus de revêtement, l'épiderme, l'exoderme et l'endoderme. L'épiderme est le tissu de revêtement par excellence, tissu superficiel en assise continue il recouvre et protège la surface externe des végétaux. Leur face externe est recouverte d'une cuticule (constitué d'un réseau de cutine) contenant des cires et des dérivés lipidiques très hydrophobes.

1.1.2.1.4. Tissus conducteurs

Tissus ou structures composées de plusieurs cellules.

1.1.2.1.4.1. Xylème

Composé de trachéides et vaisseaux, cellules sclérifiées et fortement lignifiées. Ces cellules sont continues (paroi transversales supprimées) et forme un tube entouré et maintenu par les parois longitudinales rigides.

1.1.2.1.4.2. Phloème

Ces cellules sans noyau ni vacuoles peuvent communiquer entre elles par le biais de cribles au niveau des parois transversales. Ceux-ci sont obturés par un bouchon de glucans (appelé callose) en fin de végétation. Les parois longitudinales sont essentiellement pecto-cellulosique.

1.1.3. Composition chimique des tissus végétaux.

On s'intéresse ici à la composition chimique des principaux composants des tissus cités précédemment.

1.1.3.1. Cellulose

La cellulose est le composant principal de la biomasse végétale et le polymère organique le plus abondant sur Terre, avec une production estimée à 1.2×10^{12} tonnes par an (Klemm et al., 2005). C'est un polymère linéaire de glucoses liés entre eux par des liaisons β -(1→4). La forte rigidité axiale des chaînes est assurée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires. Ces liaisons sont

principalement du type (O3-H...O5), comme présenté sur la figure 1-4 (Nishiyama et al., 2008). Ce polysaccharide homogène non ramifié peut présenter des chaînes de longueur variable (DP) allant de quelques centaines de monosaccharides à plus d'une dizaine de milliers. Dans le cas des plantes herbacées, le DP varie entre 600 et 10 000 (Klemm et al., 2005). Le DP de la cellulose conditionne les propriétés du polymère. Les nombreuses liaisons hydrogènes intermoléculaires, augmentant avec le DP, influencent la solubilité. De 2 à 6 unités, les oligomères sont solubles dans l'eau. De 7 à 13 unités, les polymères sont partiellement solubles dans l'eau chaude. Enfin, à partir de 30 unités, les polymères sont complètement insolubles dans la plupart des solvants et présentent une résistance élevée à la dégradation chimique et biologique (Klemm et al., 1998; Miller, 1963; Pereira et al., 1988; Zhang and Lynd, 2004a).

On la retrouve naturellement sous la forme d'un réseau intermoléculaire hautement hiérarchique et dense. Plusieurs chaînes de cellulose s'organisent en fibres élémentaires ($\varnothing = 1.5$ à 3.5 nm), elles-mêmes se regroupent en microfibrilles ($\varnothing = 10$ à 30 nm) (figure 1-5, B) et finalement sous la forme d'une fibre de cellulose ($\varnothing \approx 100$ nm) (figure 1-5, C). Cette structure tridimensionnelle est maintenue par des liaisons hydrogènes intermoléculaires, comme présentées dans la figure 1-4, et des forces de Van der Waals entre les feuillets plans. Naturellement, dans les parois végétales, la cellulose est présente sous la forme cristalline I_{β} . Cette structure cristalline contiendrait majoritairement des réseaux de liaisons hydrogènes de type A (figure 1-4).

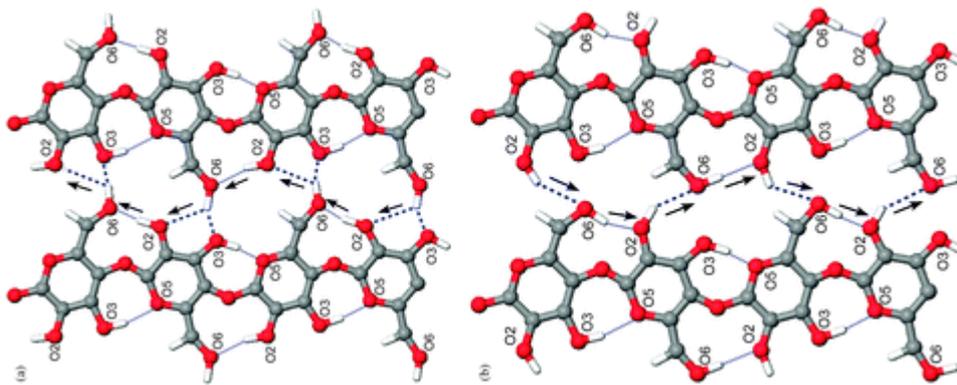


Figure 1-4 : représentation schématique des deux suggestions de réseaux de liaisons hydrogènes (a) A, et (b) B (d'après Nishiyama et al., 2008). Les lignes en pointillés fins représentent les liaisons intra-chaîne et les lignes en pointillés gras les liaisons inter-chaînes. Les flèches indiquent les directions donneur-accepteur-donneur. Les atomes de carbones sont indiqués en gris, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'hydrogènes en blanc.

Sous son état naturel, la cellulose présente différentes formes morphologiques. Des régions dites cristallines, hautement ordonnées, et des régions dites amorphes, faiblement ordonnées, comme visibles sur la figure 1-5, B. Ces zones amorphes sont plus sensibles à la dégradation chimique et biologique (Klemm et al., 2005; Zugenmaier, 2001).

La cellulose est le polymère principal du « squelette végétal ». Comme détaillé dans la partie « 1.1.2. Composition des tissus végétaux au sein des organes caulinaires. », la fraction et l'organisation cellulosique varie suivant les tissus au sein des parois végétales. Les polysaccharides sont présents dans les parois végétales primaires et secondaires. Les parois primaires présentent des réseaux cellulosiques peu organisés, orientés dans toutes les directions

de la paroi. Dans les parois secondaires, les chaînes cellulosiques sont regroupées en microfibrilles parallèles dont l'orientation change suivant la couche de la paroi. La figure 1-5, D représente de façon schématique la paroi végétale d'une fibre de bois. La couche S2 de la paroi secondaire est la plus riche en cellulose (Klemm et al., 2005; O'sullivan, 1997).

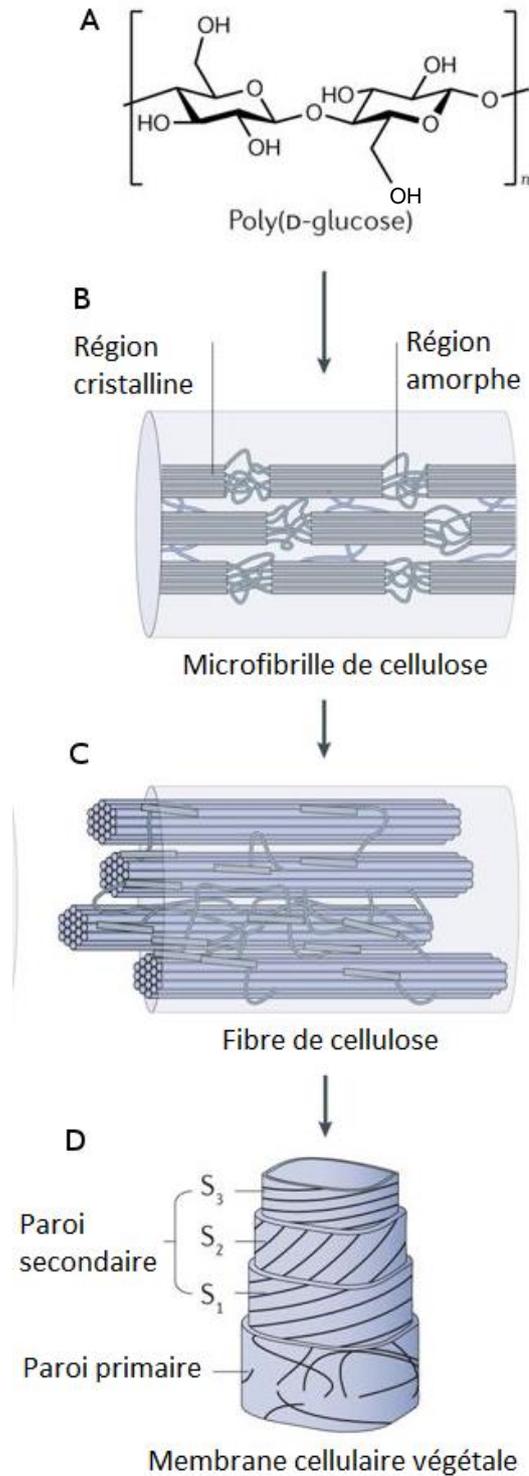


Figure 1-5 : Structure hiérarchique de la cellulose (Ling et al., 2018). A, Structure moléculaire de la cellulose ($n = DP$, Degré de Polymérisation). ; B, Cellulose nanocristal ; C, Cellulose nanofibrille ; D, Représentation schématique de la structure des parois d'une fibre végétale.

1.1.3.2. Hémicelluloses

Les hémicelluloses, contrairement à la cellulose, sont des hétéropolymères composés de plusieurs monomères différents. Elles représentent de 15 à 35% de la biomasse végétale sèche et peuvent contenir des pentoses (β -D-xylose, α -L-arabinose), des hexoses (β -D-mannose, β -D-glucose, α -D-galactose) et/ou des acides uroniques (acides α -D-glucuroniques, α -D-4-O-methylgalacturoniques et α -D-galacturoniques). D'autres sucres, tels que les α -L-rhamnoses and α -L-fucoses peuvent être présents en petites quantités. Certains groupes hydroxyles peuvent aussi être acétylés. Les xylanes sont les motifs hémicellulosiques les plus fréquents au sein des parois cellulaires secondaires des plantes herbacées (Gírio et al., 2010). La composition des hémicelluloses dépend de leur origine biologique, comme le résume le Tableau 1-2

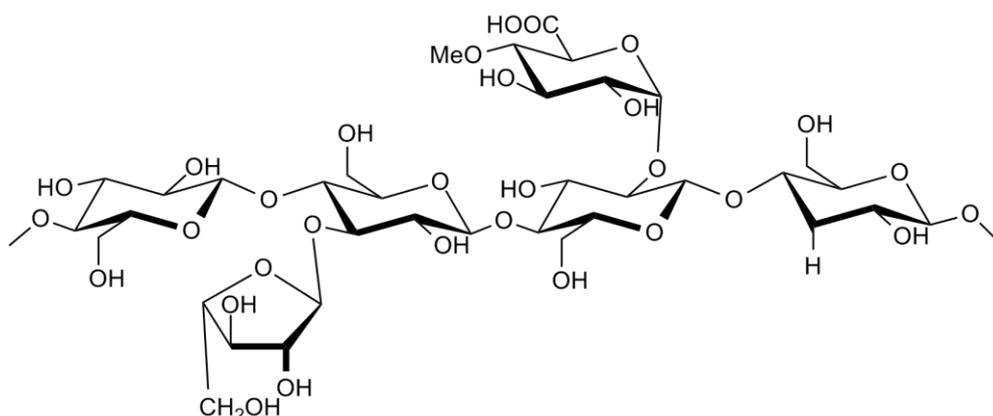


Figure 1-6 : Exemple d'une structure de (L-arabino)-4-O-methyl-D-glucurono-D-xylane (d'après Ebringerová, 2005).

Les plantes herbacées, telles que les céréales, sont notamment composées d'arabinoglucuronoxylans (arabino-4-O-methylglucuronoxylans) comme présenté sur la figure 1-6 ou encore de glucuronoarabinoxylans (Tableau 1-2). Ces hémicelluloses présentent un degré de polymérisation (DP) moyen entre 50 et 185. Le ratio type arabinose : acide glucuronique : xylose est de 1:2:8 (Gírio et al., 2010). Le Tableau 1-1, donne les proportions des différents monomères qui composent les hémicelluloses de blé et de maïs. On y retrouve principalement du xylose et de l'arabinose.

Tableau 1-1: Composition des hémicelluloses de biomasses lignocellulosiques (maïs, blé). a,b,c, (d'après Gírio et al., 2010)

Biomasse	Xyl	Ara	Man	Gal	Rha	AU	GAc	Références ^d
Canne de maïs	14.8–25.2	2–3.6	0.3–0.4	0.8–2.2	-	-	1.7–1.9	(5, 8, 9)
Tige de maïs	25.7	4.1	<3.0	<2.5	-	-	-	(7)
Fibres de maïs	21.6	11.4		4.4	-	-	-	(1)
Rafle de maïs	28–35.3	3.2–5.0		1–1.2	1	3	1.9–3.8	(2, 3, 4, 6)
Paille de blé	19.2–21.0	2.4–3.8	0–0.8	1.7–2.4	-	-	-	(5, 8)

a Unités non-glycosidiques.

b Exprimé en g/100 g de matière sèche.

c Xyl, xylose; Ara, arabinose; Man, mannose; Gal, galactose; Rha, rhamnose; AU, acides uroniques; GAc, groupements acétylés

d 1. Allen et al., 2001; 2. Garrote et al., 2001; 3. Grohman and Torget, 1985; 4. Kabel et al., 2002; 5. Lee, 1997; 6. Ropars et al., 1992; 7. Rubio et al., 1998; 8., 9. Torget et al., 1991, 2000

Chapitre I : Etat de l'art

Tableau 1-2 : Principaux types de polysaccharides présents dans les hémicelluloses suivant leur origine biologique (d'après Gírio et al., 2010)

Type de polysaccharide	Origine biologique	Proportion ^a	Structure du polymère			DP	Représentation schématique
			Chaîne principale	Chaîne latérales	Liaisons		
Arabinogalactane	Résineux	1-3 ; 35	β -D-Galp	β -D-Galp α -L-Araf β -L-Arap	β -(1-6) α -(1-3) β -(1-3)	100-600	
Xyloglucane	Feuillus, herbes	2-25	β -D-Glcp β -D-Galp	β -D-Xylp β -D-Galp α -L-Araf α -L-Fucp Acétyle	β -(1-4) α -(1-3) β -(1-2) α -(1-2) α -(1-2)		
Galactoglucomannane	Résineux	10-25	β -D-Manp β -D-Glcp	β -D-Galp Acétyle	α -(1-6)	40-100	
Glucomannane	Résineux, feuillus	2-5	β -D-Manp β -D-Glcp β -D-Xylp			40-70	
Glucuronoxylane	Feuillus	15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf 4-O-Me- α -D-GlcpA Acétyle	α -(1-2)	100-200	
Arabinoglucuronoxylan	Herbes, céréales, résineux	5-10	β -D-Xylp	α -L-Araf 4-O-Me- α -D-GlcpA β -L-Araf	α -(1-2) α -(1-3)	50-185	
Arabinoxylanes	Céréales	0,15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf Feruloyl	α -(1-2) α -(1-3)		
Glucuronoarabinoxylans	Herbes, céréales	15-30	β -D-Xylp	α -L-Araf 4-O-Me- α -D-GlcpA	α -(1-2) α -(1-3)		
Homoxyllans	Algues		β -D-Xylp				

β -D-Galp; \bullet , β -D-Glcp; \circ , β -D-Manp; \bullet , β -D-Xylp; \circ , β -L-Araf; \circ , β -L-Arap; \circ , α -L-Fucp; \bullet , 4-O-Me- α -D-GlcpA; \blacktriangledown , Acetyl; \blacklozenge , Feruloyl.

^a % de matière sèche

Unité glucopyranosyle (Glcp), unité mannopyranosyle (Manp), unité xylopyranosyle (xylp), unité arabinopyranosyl units (arap), unité arabinofuranosyl (araf), unité galactopyranosyle (Galp), unité acide 4-O-méthyl- α -D-glucuronique (4-O-Me- α -D-GlcpA)

1.1.3.3. Lignines

Les lignines sont la première source de molécules aromatiques sur Terre et la seconde source la plus abondante de carbone après la cellulose (Latieule, 2015). Grâce à leur structure complexe et hydrophobe, elles constituent une barrière protectrice par rapport aux attaques extérieures, notamment face à la dégradation microbienne. Cette caractéristique fait des lignines un facteur limitant pour la valorisation des polysaccharides de la paroi végétale.

C'est un polymère réticulé complexe dérivé du couplage oxydatif de trois monomères, alcools hydroxycinnamyls primaires représentés sur la figure 1-7.

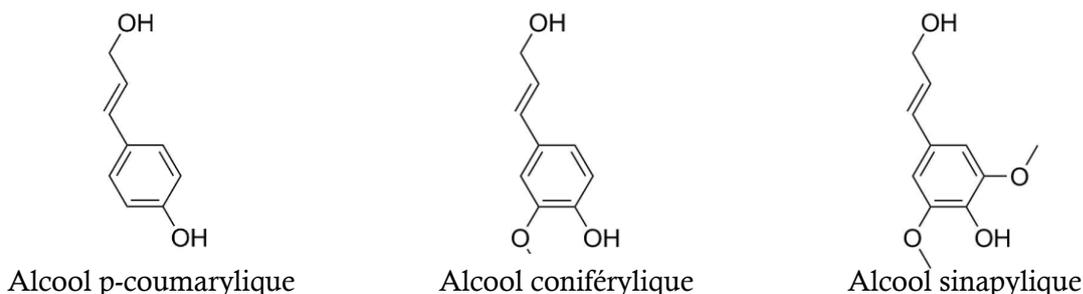


Figure 1-7 : Monolignols des lignines (Vanholme et al., 2010)

Ces monomères sont formés à partir de la phénylalanine (Vanholme et al., 2010). Ils sont habituellement nommés, au sein du polymère, par les unités phénylpropanoïdes correspondantes ; respectivement *p*-hydroxyphényl (H), guaiacyl (G) et syringyl (S), qui font référence à la substitution par une fonction méthoxy sur le cycle aromatique. La composition en unités phénylpropanoïdes dépend de la nature de la biomasse. Le Tableau 1-3 résume la composition des lignines de différents types de biomasses.

Tableau 1-3 : Composition en unités phénylpropanoïdes de la biomasse végétale (Davin and Lewis, 2005; Villaverde et al., 2009).

	G	S	H
Bois dur	50%	50%	traces
Bois tendre	96%	traces	4%
Herbe	70%	25%	5%
Paille (Miscanthus)	60%	40%	traces

Au sein des biomasses lignocellulosiques, la synthèse des lignines s'effectue par voie enzymatique. Laccases et peroxydases catalysent la formation de radicaux qui réagissent aléatoirement pour former différents types de couplages de type C-O ou C-C (Calvo-Flores and Dobado, 2010). Ce couplage aléatoire conduit à la formation de polymères à la structure particulièrement complexe. L'abondance relative des différentes liaisons dépend de la composition en monomères qui contribuent au processus de polymérisation. Le modèle le plus complet, établi par Adler en 1977, est représenté en figure 1-8.

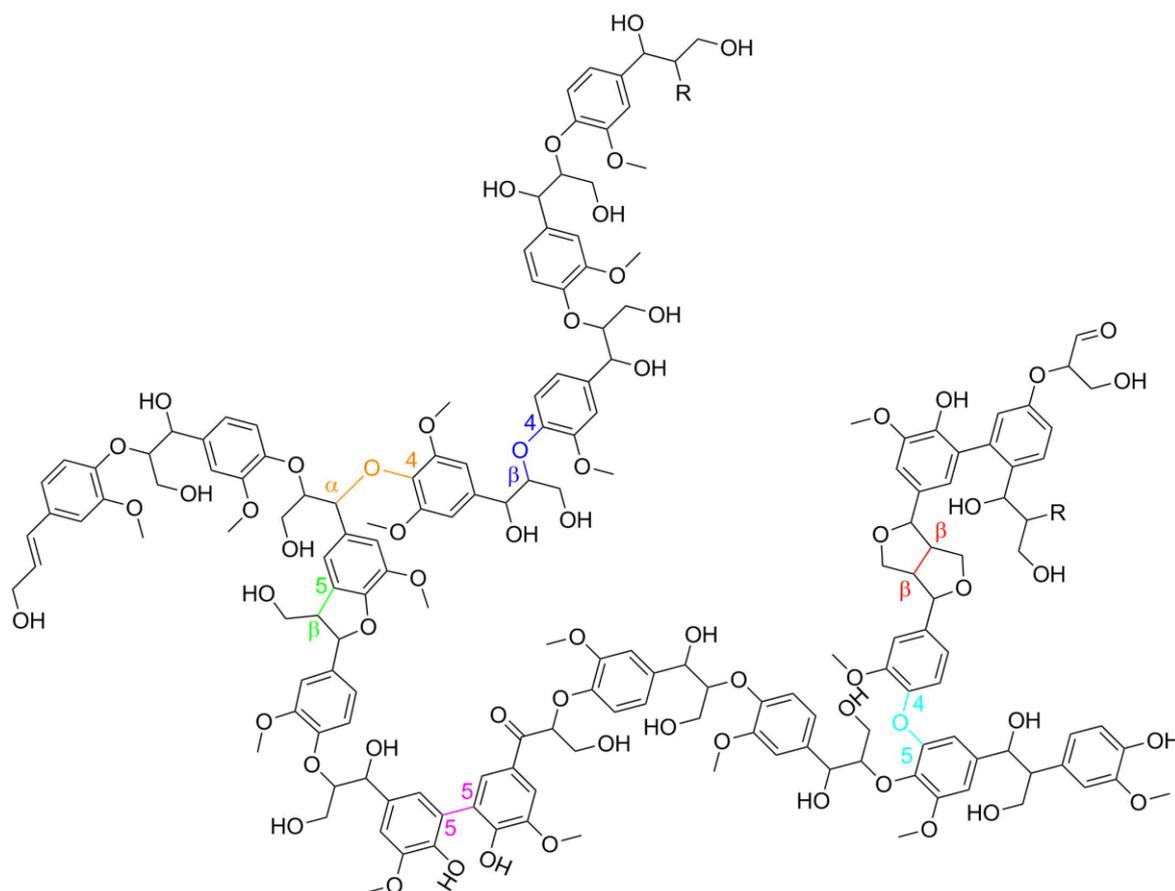


Figure 1-8 : Modèle chimique des lignines avec les différents types de liaisons au sein du polymère (d'après Adler, 1977; Calvo-Flores and Dobado, 2010).

1.1.3.4. Matrice lignocellulosique

La matrice lignocellulosique forme un ensemble complexe et récalcitrant aux attaques extérieures. En particulier, les tissus de soutien, aux parois composés de feuilletts cellulosiques en strates à inclinaisons variables, permettent une résistance à la traction. Ces feuilletts représentent une « armature » naturelle entourée d'un « béton » hémicellulosique et ligneux. Le Tableau 1-4, détaille la composition des fractions des matières premières du projet.

Tableau 1-4 : Composition chimique des matières premières (% m/m matière sèche) (d'après Abdul Khalil et al., 2012; Reddy and Yang, 2005).

	Cellulose (%)	Hémicelluloses (%)	Lignines (%)
Tiges de blé	29-38	26-32	17-19
Tige de maïs	35-46	7-35	7-31
Rafle de maïs	45	35	15

1.1.3.4.1. Parois végétales primaires

Les parois végétales primaires sont de type pecto-cellulosique. Le réseau cellulósique principal, avec son organisation aléatoire, est lié à d'autres composants (hémicelluloses et aux pectines) de la matrice par des réticulations (Bidlack, 1992).

1.1.3.4.2. Parois végétales secondaires

Les parois végétales secondaires ont une structure apparente plus ordonnée que les parois primaires (Fig. 1-5 D). La figure 1-9 reprend de façon schématique l'arrangement moléculaire et les liaisons présents dans la structure des membranes secondaires. On y observe principalement des liaisons éthers et esters entre les fractions ligneuses et les fractions hémicellulosiques. La fraction cellulosique serait quant-à-elle principalement liée par des liaisons faible de type hydrogène avec les hémicelluloses (Bidlack, 1992; Martínez et al., 2009). Cependant certaines expériences plus récentes amènent à penser qu'il existerait des liaisons éthers et esters directement entre les lignines et la cellulose (Zhou et al., 2010). Ces structures correspondent précisément à la biomasse lignocellulosique, terme communément (et de façon imprécise) utilisé pour désigner l'ensemble de la biomasse végétale structurale.

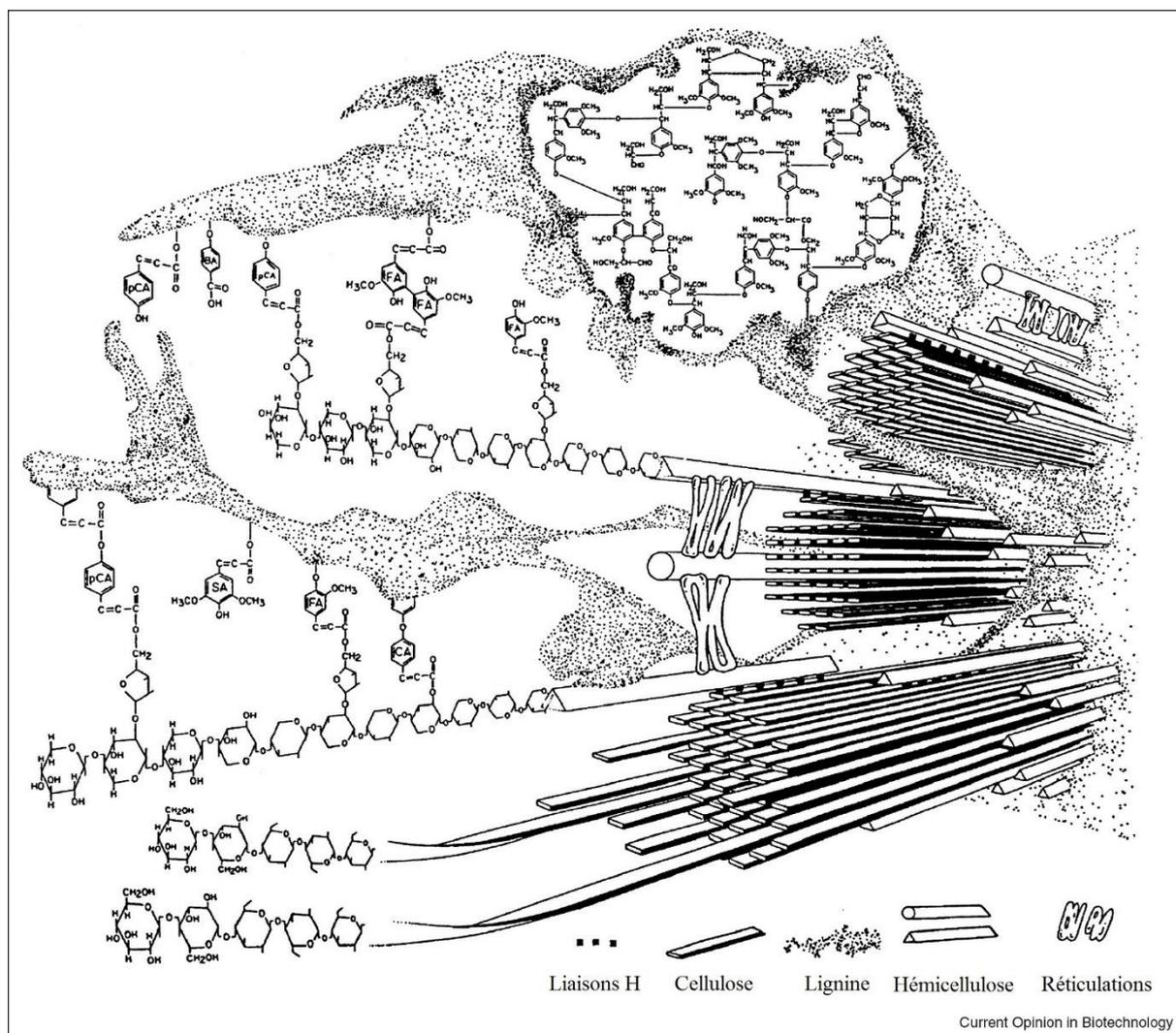


Figure 1-9 : Représentation schématique d'une structure de membrane végétale secondaire herbacée (Bidlack, 1992).
 Les lignines se composent d'acides p-coumariques (pCA), féruliques (FA), p-hydroxybenzoïques (BA), sinapiques (SA) et cinnamiques (CA).

1.1.4. Résistance de la lignocellulose à l'hydrolyse enzymatique

De nombreuses caractéristiques de la biomasse lignocellulosique ont été démontrées comme limitantes pour l'hydrolyse enzymatique. Un court résumé des principaux obstacles à la dégradation de la lignocellulose est présenté ici.

1.1.4.1. *Les lignines, une structure protectrice*

Les lignines agissent comme une barrière physique qui limite l'accès des cellulases et hémicellulases à leur substrat. Il y aurait aussi un phénomène d'adsorption non spécifique des cellulases sur les lignines, ce qui limite leur action. Par ailleurs, la lignine résiduelle, produite par prétraitement ou hydrolyse enzymatique des autres fractions, bloquerait la progression des cellulases sur les chaînes de cellulose. Enfin le type et la répartition des lignines auraient aussi une influence sur l'hydrolyse enzymatique (Alvira et al., 2010; Van Dyk and Pletschke, 2012a).

1.1.4.2. *Autres limites au processus hydrolytique des enzymes.*

La structure de l'holocellulose est impliquée dans la réduction de l'hydrolysabilité. La présence d'hémicellulose limite bien sûr l'accès à la cellulose. Le degré de cristallinité et de polymérisation de la cellulose présente aussi une influence négative sur le processus hydrolytique. Enfin la taille des particules, des pores de la biomasse ou encore l'épaisseur des parois végétales influenceraient la dégradation enzymatique de la lignocellulose (Alvira et al., 2010; Van Dyk and Pletschke, 2012a).

1.1.5. Conclusion

Les biomasses sélectionnées sont des résidus agricoles lignocellulosique issus de plantes herbacées monocotylédones. Les organes caulinaires présents dans les mélanges initiaux, sont donc uniquement composés de tissus primaires. Ceux-ci ont des parois végétales principalement composés de cellulose, hémicelluloses et lignines. La répartition de ces composants et de ces tissus est cependant hétérogène dans la biomasse. La cellulose possède une structure très hiérarchisée immergée dans une matrice hémicellulosique et ligneuse qui permet une résistance élevée de la biomasse aux dégradations physiques, chimiques et biologiques.

1.2. L'extrusion, un procédé de prétraitement de la biomasse lignocellulosique

Comme détaillé dans « 1.1.4. Résistance de la lignocellulose à l'hydrolyse enzymatique », la biomasse brute est un milieu peu favorable à l'attaque enzymatique. Afin de retirer les différentes protections naturellement présentes, on a couramment recours à divers procédés de prétraitement. L'extrusion est l'une des techniques utilisée pour réaliser un prétraitement en continu de la biomasse lignocellulosique. Dans le cadre du projet européen BABETREAL 5, un prétraitement alcalin a été sélectionné. Il est réalisé à l'aide d'extrudeuses de type bi-vis (fig. 1-10).

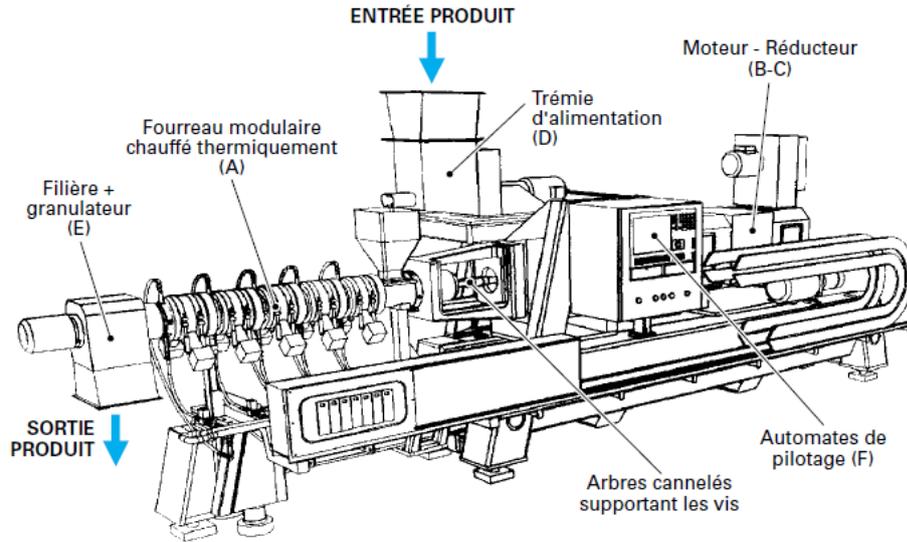


Figure 1-10 : Schéma d'une extrudeuse (Vergnes and Chapet, 2016).

1.2.1. Extrudeuse bi-vis corotative

Elle comporte deux arbres mécaniques sur lesquels on peut monter une succession de vis appelé profil de vis. Les deux arbres tournent dans le même sens (corotatifs) et l'arrangement des vis se doit d'être parfaitement identique, puisqu'elles sont interpénétrées (fig. 1-11) Les deux arbres et les vis sont entourés par un fourreau ajusté et thermo-régulé qui permet aussi de maintenir la matière sous pression.

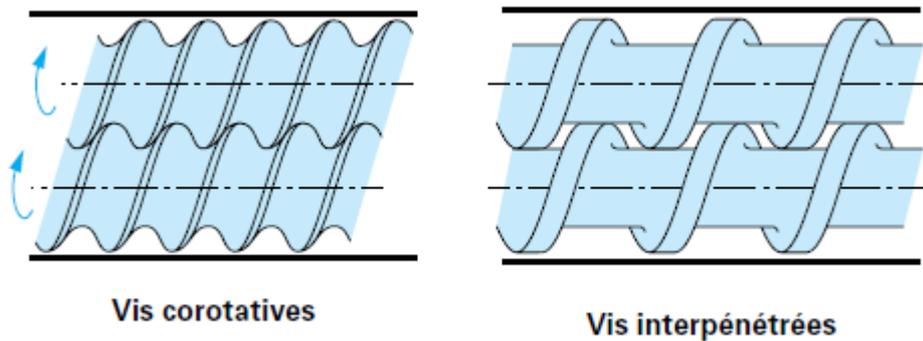


Figure 1-11 : Illustration des concepts de vis corotatives et interpénétrées (Vergnes and Chapet, 2016).

Plusieurs types de vis existent et permettent de moduler le profil afin d'obtenir les effets mécaniques désirés. Les principales vis d'intérêt sont présentées dans le Tableau 1-5 avec leurs principales fonctions.

Tableau 1-5 : Caractéristiques des vis utilisées pour le prétraitement alcalin (d'après Vergnes and Chapet, 2016).

	Dénomination	Schéma	Fonction					
			A	C o	P	M T	M P	Ci
Vis à pas direct	Trapézoïdale double filets (T2F)*		•	•	•			
	Conjuguée double filets (C2F)							
Éléments malaxeurs	Disque malaxeur bilobes (BB) BB(90) indique une orientation perpendiculaire des bilobes.					•	•	
Vis à pas inverse	Contre-filet à double filets conjugués (CF2C)					•		•

Les fonctions des vis sont l'alimentation (A), le convoyage (Co), la mise en pression (P), le mélange distributif (MT), le mélange dispersif (MP) et le cisaillement (Ci)

*Augmente l'avalement de la matière dans la zone d'alimentation de façon plus poussée que C2F.

1.2.2. Prétraitement en extrusion alcaline.

Le prétraitement alcalin de la biomasse lignocellulosique est une technique classiquement utilisée. Le mécanisme de l'hydrolyse alcaline est considéré comme étant le résultat de la saponification des liaisons esters intermoléculaires entre les xylanes de les hémicelluloses et d'autres xylanes ou des lignines (Sun and Cheng, 2002). En conditions diluées, le prétraitement chimique à la soude provoque le gonflement de la biomasse, ce qui augmente la porosité de la matière, diminue le degré de polymérisation et de cristallinité de la cellulose, en plus de rompre les liaisons intermoléculaires des hémicelluloses (Fan et al., 1987). Ce type de prétraitement a été démontré comme améliorant nettement l'hydrolysabilité enzymatique de la biomasse (Sun and Cheng, 2002). La particularité de l'extrusion alcaline est de réaliser ce type de prétraitement en continu sur un temps très court. De nombreuses publications s'intéressent à ce traitement en extrusion qui est facilement transposable à échelle

industrielle, flexible et polyvalent. L'extrusion permet de travailler en milieu concentré, avec de fortes concentrations en solide. Elle permet la formation d'importantes forces de cisaillement, un rapide transfert de chaleur et un mélange efficace (Duque et al., 2017; Karunanithy and Muthukumarappan, 2013). Le procédé est donc facilement adaptable à une large diversité de biomasses lignocellulosiques. Vandenbossche et al., 2015 ont ainsi prétraité des résidus de culture de maïs doux, des bagasses d'agave, des résidus de production d'huile de palme et de la paille d'orge. L'efficacité du procédé dépend évidemment de la composition de la biomasse initiale. Les différentes études sur ce prétraitement s'accordent sur une nette amélioration de l'hydrolysabilité enzymatique (Duque et al., 2014, 2013; Vandenbossche et al., 2016, 2015a, 2014a). Ces études observent aussi une relative solubilisation des hémicelluloses, pour certains une délignification partielle et une réduction des tailles de particules

1.2.3. Conclusion

L'extrusion est un procédé continu, flexible et polyvalent. Il permet de travailler à hautes consistances et avec diverses biomasses lignocellulosiques. Son utilisation pour le prétraitement alcalin permet de faciliter l'hydrolyse enzymatique malgré une faible modification de la composition chimique de la biomasse.

1.3. Enzymes lignocellulolytiques

Les végétaux étant la source de biomasse la plus importante sur Terre, de nombreux organismes ont évolué au cours des millénaires afin de pouvoir les utiliser comme source de nutrition. On trouve de nombreux organismes fongiques et bactériens qui emploient une batterie assez diverse d'enzymes afin de réaliser la dégradation de la biomasse lignocellulosique. Dans notre cas, ce sont ces catalyseurs essentiels qui sont au centre du questionnement scientifique, comment optimiser leur action pour déconstruire in-vitro des résidus agricoles lignocellulosiques ? La connaissance de ces protéines est donc un point de départ essentiel à la compréhension du processus et son amélioration.

1.3.1. Glycosidases (Glycoside hydrolases)

1.3.1.1. Cellulases

Les organismes qui dégradent la cellulose sont principalement des champignons et des bactéries. Ils produisent pour cela plusieurs enzymes appartenant à un nombre restreint de familles, avec différentes spécialisations, qui agissent en synergie. Ces enzymes possèdent, en plus du domaine catalytique, un domaine non catalytique impliqué dans la fixation au substrat, la formation de complexes multienzymatiques, le rattachement au micro-organisme ou encore la protection face à la dénaturation enzymatique lors de la catalyse (Béguin and Aubert, 1994). On dénombre trois principaux types de cellulases, les endocellulases (EG), exocellulase (CBH) et les β -glucosidase (β -GLU). Les caractéristiques générales de certaines de ces cellulases sont résumées dans le Tableau 1-6.

Tableau 1-6 : Caractéristiques physiques et chimiques de certaines cellulases.

	MM (kDa)	pH optimum	Température optimum (°C)	pI	Références
EG I	50	5,0*	60	5.3	1
EG II	45	5,0*	60	6.9	1
EG III	37-58	4,0-5,0	50-60	5,5-6.5	1, 3
EG IV	23,5	5,0*	48	7.7	1
EG V	57	5,0*	50	4.4	1
EG VI	52	5,0*	50	3.5	1
CBH I	53	5,0*	60	5.3	1
CBH II	60,5	5,0*	50	3.5	1
CBH III	62	5,0*	50	3.8	1
β-GLU I	71-76	4,6-5,0	50-70	3.9-8,7	1, 4
β-GLU II	110-114	4,0-5,0	49-65	4,5-4,8	1, 2, 4

*pH utilisé pour tester les températures optimales des enzymes

1, Beldman et al., 1985; 2, Chen et al., 2012; 3, Saloheimo et al., 1988; 4, Sengupta et al., 1991

Il met en évidence la diversité de taille et de pI au sein des différentes cellulases, voire au sein même d'un type de cellulase. Les optima physico-chimiques présentés ici se situent autour de 50°C et d'un pH de 5.0. Cependant il existe une large diversité de cellulases, non présentées ici. Les caractéristiques de ces enzymes dépendent en effet du micro-organisme d'origine.

1.3.1.1.1. Endocellulases (EG)

Les endocellulases sont responsables de la catalyse aléatoire de la liaison osidique β-1,4 principalement dans la région amorphe de la cellulose. La forme de fente ouverte, observée chez les endoglucanases de *T. reesei*, pourrait expliquer le mécanisme d'action de ces enzymes. Elles pourraient « chevaucher » les polymères de cellulose, provoquant leur séparation en deux chaînes plus courtes, faisant ainsi rapidement diminuer le DP (Béguin and Aubert, 1994; Zhang and Lynd, 2004a).

1.3.1.1.2. Exocellulase (CBH)

Les exocellulases sont responsables de la catalyse progressive des extrémités libres de la cellulose amenant à la formation de glucoses et de cellobioses. Les CBH I et II, issues de *T. reesei*, présentent des structures en forme de tunnel dans lesquelles peuvent s'introduire les extrémités libres de la cellulose. Ce type d'interaction permet une catalyse progressive de l'hydrolyse des liaisons osidiques. Une adsorption enzymatique serait suivie de plusieurs coupures enzymatiques avant la dissociation (Béguin and Aubert, 1994; Zhang and Lynd, 2004a).

1.3.1.1.3. β-glucosidase (β-GLU)

Les β-glucosidases sont responsables de la catalyse la production de glucose à partir des cellodextrines (polymères β-1,4 de glucoses) solubles dans l'eau. Elles présentent une affinité

réduite à la cellulose, ce qui leur permet de rester préférentiellement dans le milieu liquide (Gomes et al., 2015).

1.3.1.1.4. Domaines/modules de liaison à la cellulose (CBM)

Ils sont définis comme des petits domaines protéiques non-catalytiques. Ils permettent une reconnaissance hautement spécifique du substrat. Ces domaines sont généralement situés aux extrémités NH₂ ou COOH de l'enzyme, séparés du domaine catalytique par des régions riches en résidus Proline/Tyrosine/Serine glycosylés. Beaucoup des glycosides-hydrolases qui catalysent des substrats insolubles possèdent un voire plusieurs CBM (Boraston et al., 2004). Le plus étudié est le CBH I issu de *T. reesei*. Il est composé d'une zone hydrophile qui interagit avec les carbohydrates, probablement par des phénomènes d'interactions π entre les cycles pyranoses et les résidus aromatiques portés par l'enzyme. Une forte corrélation a été démontrée entre les capacités cellulolytiques et l'affinité au substrat (Béguin and Aubert, 1994; Hébert-Ouellet et al., 2017). Ces domaines, acteurs essentiels de l'hydrolyse enzymatique, possèdent trois rôles principaux. Ils permettent l'augmentation de la concentration des cellulases sur la surface de la cellulose, une meilleure spécificité par rapport au substrat et agissent pour réduire la cristallinité (Gomes et al., 2015). La base de données CAZy répertorie l'enzymes des informations connues sur les enzymes de la construction et déconstruction des carbohydrates complexes et des composés glycoconjugués (Cantarel et al., 2009) et permet notamment d'observer les nombreux types de CBMs existant pour les différentes glycosides-hydrolases connues.

1.3.1.1.5. Mécanisme réactionnel

La catalyse est généralement une réaction acide-base qui implique deux résidus. Le premier résidu catalyse la protonation de l'oxygène impliqué dans la liaison osidique. Le second agit soit en tant que nucléophile en interagissant avec l'intermédiaire oxocarbonium (mécanisme de rétention, figure 1-13 (A)), soit en permettant la formation d'un ion hydroxyle (OH⁻) à partir d'une molécule d'eau (mécanisme d'inversion, figure 1-13, (B)) (Béguin and Aubert, 1994; Liu et al., 2010).

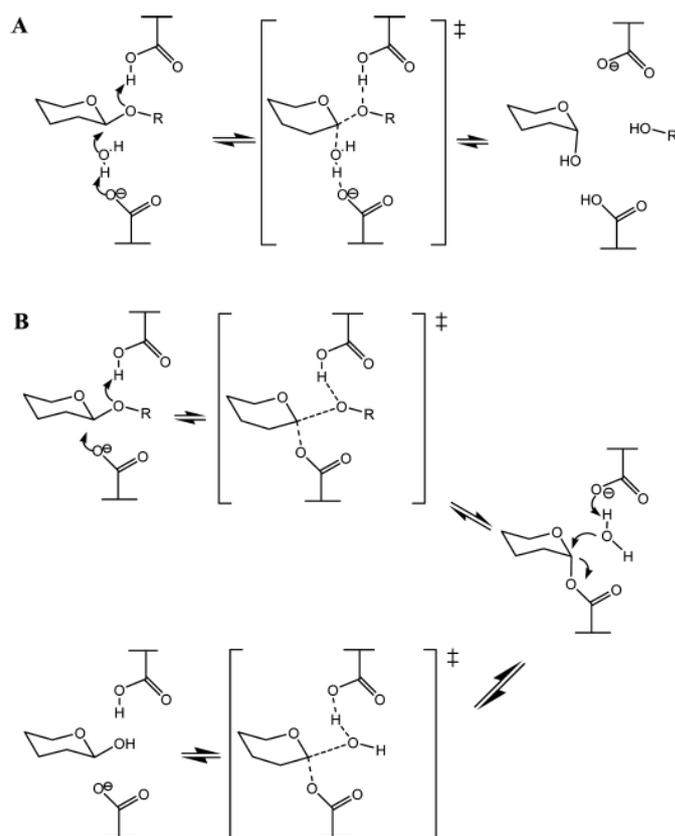


Figure 1-12 : schémas des mécanismes d'inversion (A) et de rétention (B) permettant l'hydrolyse de la liaison β -1,4-glucosidique (Liu et al., 2010).

1.3.1.1.6. Synergie

L'une des grandes complexités de cette dégradation enzymatique est l'aspect synergique de la catalyse progressive de la cellulose. Ce modèle synergique est basé sur le cas le plus étudié des cellulases de *T. reesei*. Les endoglucanases (EG I, II, III) découpent tout d'abord aléatoirement la cellulose dans les régions amorphes accessibles. Les exocellulases (CBH I et II), récupèrent les extrémités libres des polymères de cellulose afin de progressivement les hydrolyser sous forme de cellodextrines hydrosolubles. Enfin, les β -glucosidases achèvent la saccharification en catalysant la production de glucose à partir du cellobiose en solution (figure 1-13) (Béguin and Aubert, 1994; Zhang et al., 2009). L'autre intérêt de cette synergie est aussi de progressivement dégrader les produits de catalyses antérieures afin de limiter l'effet d'inhibition lié à leur accumulation, en particulier sur les endo et exoglucanases. D'autres aspects synergiques ont été démontrés, tels que la promotion mutuelle de la liaison à la cellulose des domaines CBH I et II, ou encore, la formation de cellulosomes (pour les micro-organismes anaérobies), très efficaces contre la cellulose cristalline, à partir de l'assemblage de plusieurs cellulases (Béguin and Aubert, 1994; Merino and Cherry, 2007).

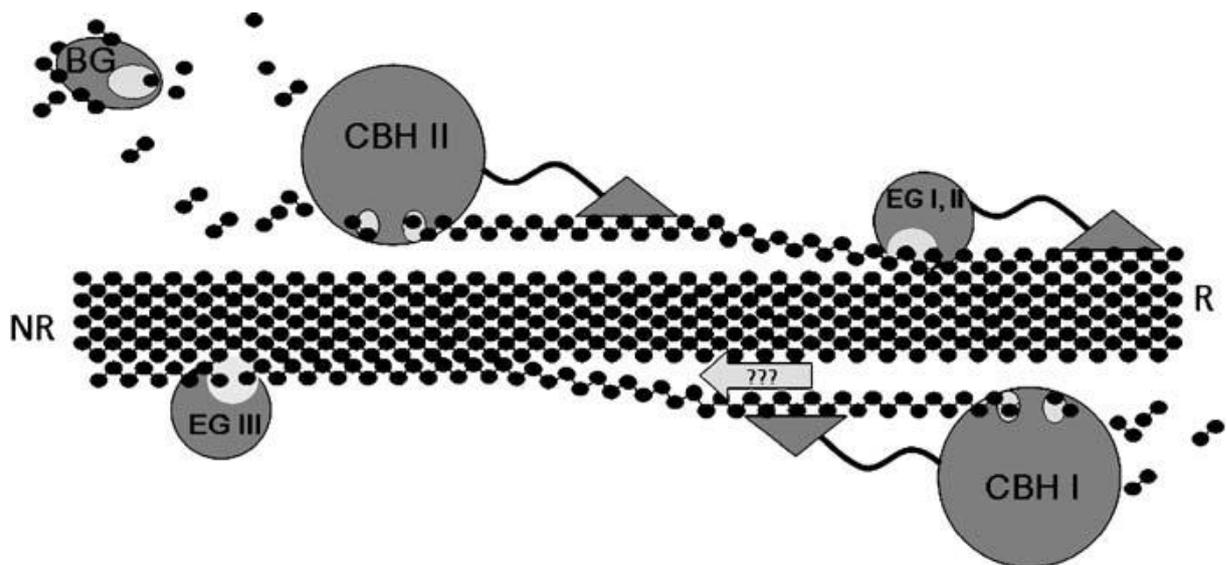


Figure 1-13 : Représentation schématique des principales enzymes de *T.reesei* impliquées dans l'hydrolyse de la cellulose. La cellulose est représentée comme un empilement de chaînes de polymères de glucose (ronds noirs) avec des extrémités réductrices (R) et non réductrices (NR) (Merino and Cherry, 2007).

Cette action synergique des enzymes dans l'hydrolyse des polysaccharides se découperait en trois phases simultanées (Zhang and Lynd, 2004a).

- Dégradation physique et chimique au sein du substrat polysaccharidique natif à l'état solide
- Hydrolyse primaire des surfaces et parties accessibles et réactives du polymère conduisant à des substrats intermédiaires solubles.
- Hydrolyse secondaire des intermédiaires solubles en intermédiaires de plus petite taille et en monomères, produits finaux de l'hydrolyse enzymatique.

Les deux premières étapes, qui concernent la fraction solide, sont lentes. La dernière étape, qui concerne la fraction soluble est rapide. Cette hypothèse quant à l'existence de trois phases simultanées ayant des durées différentes est centrale dans la compréhension de ce processus complexe.

1.3.1.2. Hemicellulases

Tout comme les cellulases, les hemicellulases ont un fonctionnement synergique impliquant plusieurs enzymes. Dans notre cas d'étude, les hémicelluloses considérés possèdent une chaîne principale faite de monomères de xyloses polymérisés entre eux par des liaisons β -(1,4). Sa dépolymérisation requière l'intervention de endo-1,4- β -xylanases, qui catalysent la production de xylooligosaccharides ramifiés et non ramifiés (notamment xylotriose et xylobiose), et de β -xylosidases, qui hydrolysent les extrémités non-réductrices des courtes chaînes de xylooligosaccharides, pour former du xylose (figure 1-14) (Merino and Cherry, 2007; Saha, 2000). Les hémicelluloses ont la particularité d'être des polymères ramifiés impliquant plusieurs sucres de type C6 ou C5. Ces monomères de nature chimique différente, ainsi que les ramifications impliquant plusieurs types de liaisons glycosidiques, nécessitent une large gamme d'enzymes aux multiples spécificités. Par exemple, l'hydrolyse des chaînes latérales d'arabinoxylans, plus particulièrement de xylo-oligosaccharides, requière des α -

larabinofuranosidases, α -glucuronidases, - feruloyl esterase et acétyl esterases (figure 12) (Biely, 1985; Merino and Cherry, 2007; Saha, 2000).

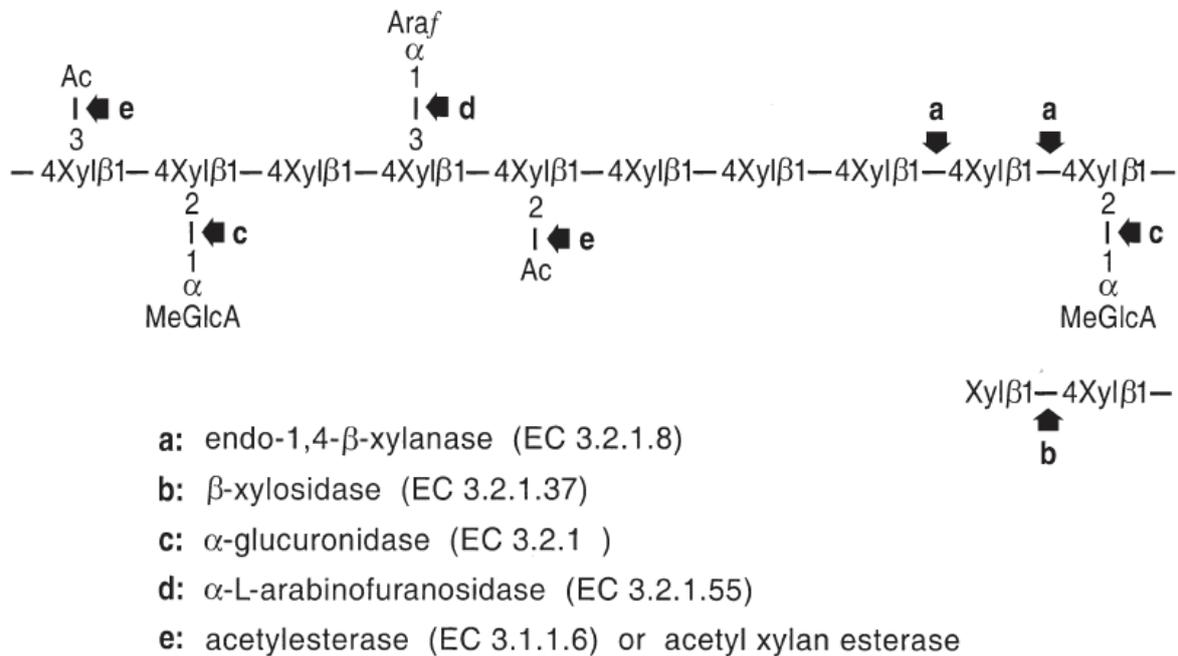


Figure 1-14 : Représentation schématique de l'hydrolyse enzymatique d'un fragment d'hémicellulose (Biely, 1985). Ac, groupement acétyle ; Araf, L-arabinofuranose ; MeGlcA, acide 4-O-méthyl-D-glucuronique ; Xyl; D-xylane.

1.3.1.3. Cocktails commerciaux

Les cocktails commerciaux utilisés, Cellic® Ctec2 de Novozymes® et Accelerases® Duet de Genencor®, sont indiqués avec des optima de température entre 45 et 50°C pour le premier et 45 et 60°C pour le deuxième, et des optima de pH respectivement entre 4,0 et 5,0 et 5,0 et 5,5. Ils contiennent tous les deux un mélange de cellulases et d'hémicellulases. Ces propriétés correspondent aux caractéristiques physico-chimiques d'une majorité des cellulases décrites dans la littérature (Tableau 1-6).

1.3.2. Oxydases

1.3.2.1. Polysaccharides monooxygénase (PMO)

Les PMO ou encore LPMO (pour Lytiques PMO), sont des oxydases participant à la dégradation de la cellulose. Elles agissent sur la partie cristalline en générant des extrémités oxydées et non oxydées. Un donneur d'électrons externe est nécessaire pour permettre une bonne activité des PMO. Il ne semble pas y avoir de phénomène de compétition entre les PMO et les EG, puisque les premières agissent sur les zones hautement cristallines, alors que les secondes hydrolysent principalement les zones amorphes de la cellulose. Leur intégration dans les cocktails cellulolytiques (comme le Cellic Ctec 2 de Novozymes®) permet une amélioration de la dégradation de la cellulose. Elles s'intègrent dans la synergie déjà existante (comme décrite en « 1.2.1.1.6. Synergie ») en dégradant les parties cristallines difficiles d'accès pour les EG, et en catalysant de nouvelles extrémités accessibles aux CBH (Dimarogona et al., 2012).

1.3.2.2. Laccases

De nombreuses enzymes, produites par des organismes fongiques, participeraient à la synthèse comme à la lyse des lignines (Calvo-Flores and Dobado, 2010). Ce polymère d'unités

phénylpropanoïdes est synthétisé via des réactions radicalaires et non des réactions de déshydratation comme les polysaccharides. De même, les enzymes impliquées dans cette dégradation sont des enzymes qui catalysent des réactions d'oxydoréduction et non des enzymes hydrolytiques. Les produits de cette dégradation oxydative des lignines ont une teneur en oxygène supérieure à celle des lignines avant dégradation (Calvo-Flores and Dobado, 2010).

Dans le cadre de ce projet, seules des laccases ont été employées. Ces enzymes ont été découvertes dans les années 1880. Ce sont des oxydases avec 4 atomes de cuivre comme cofacteurs. Elles catalysent l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques, diphénoliques, aminophénoliques et autres composés aromatiques mais avec une affinité plutôt faible (Valeurs de K_m entre 1 et 10 mM) (Kubicek, 2013). La structure cristallographique de la laccase de *Trametes versicolor* montre la présence des quatre atomes de cuivre au niveau du site actif. Le site T1 contient un atome de cuivre, le site T3 en présente deux et le site T2 contient le quatrième atome de cuivre (Morozova et al., 2007). L'efficacité de l'enzyme dépend directement de la différence de potentiel redox entre le site T1 (lieu d'arrivée du substrat d'oxydation) et celui du substrat. Cette oxydation permet la formation de radicaux phénoxy suivant le cycle catalytique présenté en figure 1-15.

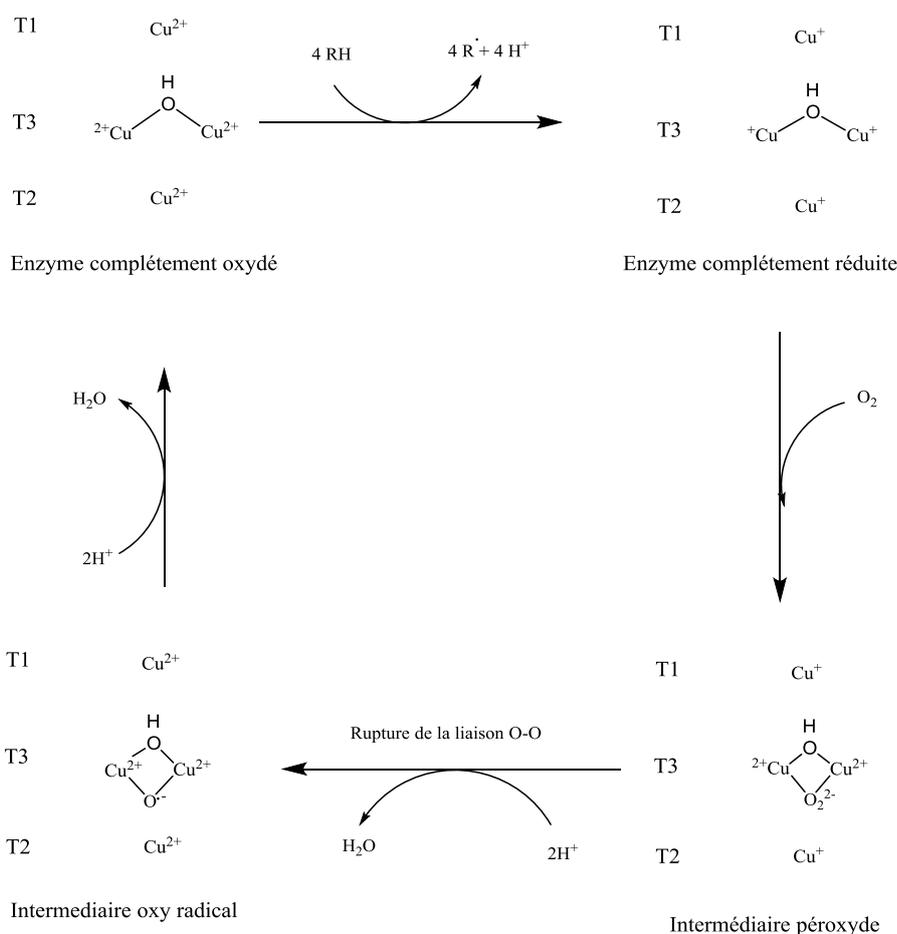


Figure 1-15 : Représentation schématique du cycle catalytique de la laccase (Kubicek, 2013)

Les laccases sont des glycoprotéines dont les chaînes oligosaccharidiques contribuent à la stabilité de l'enzyme. Elles ont un poids moléculaire compris entre 60 et 80 kDa (Kubicek, 2013). Ces enzymes présentent des rôles physiologiques variables suivant leur origine. Elles

sont notamment décrites comme participant à la polymérisation des lignines. Le Tableau 1-7 ci-dessous résume les conditions optimales de fonctionnement de la laccase.

Tableau 1-7 : Conditions de fonctionnement des laccases (Gasser et al., 2012).

Enzyme	Température (°C)	pH
Laccase	20-85	2-9

1.3.3. Conclusion

La diversité des enzymes impliquées dans la déconstruction de la biomasse lignocellulosique souligne la complexité du processus. Chaque substrat d'intérêt requiert pour sa dégradation un ensemble propre d'enzymes qui fonctionnent en synergie. Comme indiqué dans « 1.1.3.4. Matrice lignocellulosique », la matrice lignocellulosique est un assemblé hétérogène où sont entremêlés les trois composants principaux. La dégradation d'une fraction donnée est améliorée et améliore à son tour la dégradation d'une autre fraction, en facilitant son accessibilité. L'hydrolyse et l'oxydation enzymatique de ces composés sont donc intimement liées. Dans notre cas, on s'intéressera plus particulièrement à l'hydrolyse de la fraction holocellulosique avec des cocktails enzymatiques comportant cellulases et hémicellulases. D'après la littérature et les valeurs commerciales, des valeurs de température autour de 50°C avec des pH autour de 5,0 seront utilisés au cours des expériences.

1.4. Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: a review.

L'idée d'un mélange entre biomasse et enzymes en extrusion est issue du projet BABETHANOL. Cette étape de bioextrusion permet la continuité entre un procédé de prétraitement continu en extrusion et une fermentation en milieu fermé. Les bons résultats observés lors des premières expériences amènent à penser que ce mélange particulièrement efficace améliore l'étape d'hydrolyse (Vandenbossche et al., 2014a). Des recherches antérieures, sur la bioextrusion de matières amylacées, s'intéressent déjà à la question de l'influence de l'extrusion sur l'interaction entre biomasse et enzymes. Cette revue de littérature rassemble les études connues impliquant l'utilisation d'enzymes durant le processus d'extrusion que sont la bioextrusion de matières amidonnées et lignocellulosiques. La synthèse de l'ensemble des résultats obtenus a pour but de faire ressortir les principaux effets et souligner les futures recherches à mener, particulièrement pour le cas de la lignocellulose.

Etienne Gatt^{a,1}, Luc Rigal^a, Virginie Vandenbossche^a

^a Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France.

**Cette revue de littérature a été acceptée et publiée par le journal
Industrial Crops & Products.**

DOI : 10.1016/j.indcrop.2018.05.069

Abstract

Introducing enzymes during the extrusion process has been mainly used as new pretreatment techniques in the starch degradation process and, more recently, in the second generation bioethanol production. The technique, called the bioextrusion, is a special case of reactive extrusion. Starch and lignocellulose bioextrusion examples underline the good mixing capacities as a way to initiate the enzymatic reaction in high solid content conditions. Starch bioextrusion results show a low dextrinization yield but a real effect on the polymer size decrease which allows higher and faster subsequent saccharification. It also considerably reduced the recrystallization phenomenon that limits the saccharification efficiency. Bioextrusion of lignocellulose resulted in a better sugar production. Very short residence times limit the use of bioextrusion to a pretreatment technique. However, unique flexibility of the extrusion technique allows to subsequently pretreat, in the same extruder, with physical and/or chemical constraining conditions, followed by a milder bioextrusion.

¹Corresponding author at: Université de Toulouse, INP, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, BP 44362, 31030 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 5 34 32 35 14; fax: +33 5 34 32 35 99.
E-mail address: etienne.gatt@ensiacet.fr (E. Gatt); virginie.vandenbossche@ensiacet.fr (V. Vandenbossche)

Keywords

Reactive extrusion, Enzymatic hydrolysis, Biomass, Lignocellulose, Starch.

Declarations of interest: none.

List of abbreviations:

BAB: blue agave bagasse

BS: barley straw

DE: dextrose equivalent

GPC: gel permeation chromatography

HTST: high temperature and short time extrusion

OPEFB: oil palm empty fruit bunch

SC: sweet corn co-products

SEM: scanning electron microscopy

SME: specific mechanical energy

WSI: water solubility index

1.4.1. Introduction

Bioextrusion is defined as the use of one or several types of enzymes as biocatalysts during the extrusion process. The extruders' adaptability allows the introduction of liquid enzyme solutions at different steps of the process. Even if all the known examples of this combination concern the treatment of biomasses, theoretically, all kinds of substrates can be processed with bioextrusion. Enzyme deactivation by extrusion has also been studied on different food products like cereal grains (Fretzdorff and Seiler, 1987) and fish muscles (Choudhury and Gogoi, 1996). These studies intended to deactivate enzymes involved in the product degradation in order to improve product shelf-life (Linko et al., 1981). Proteins involved in the product degradation like proteases, lipases, lipoxidases, ureases and peroxidases, can be denatured thanks to shear fields and high temperatures. In these cases enzymes are not used as biocatalysts and do not correspond to the bioextrusion definition. This is why it won't be detailed in this review. This review summarizes the advantages and limitations of the combination between the extrusion process and the enzyme biotechnology. These characteristics will be studied through two main examples of its application, starch liquefaction and lignocellulose deconstruction.

1.4.1.1. A specific case of reactive extrusion

The extrusion is a continuous process that can easily be brought to an industrial level. This characteristic has led the early developments of this technique. It is a determining factor regarding volumes and quantities of biomasses that are processed for the food, feed or chemicals production. It is a flexible and versatile technique. Screw extruders are characterized by a highly versatile screw configuration which allows various constraint profiles. It can handle different substrates with different viscosities, rheological behaviors, phases. Processing conditions can easily be adapted and extrusion modules can be changed to add or remove functionalities (physical separation, degassing) (Bouvier and Campanella, 2014).

As enzymes can be seen as biocatalysts, bioextrusion can be regarded as a specific case of reactive extrusion. Historically chemical and biochemical reactions have been carried out in diluted conditions. But these conditions imply the use of solvents or diluents from 5 to 20 times the weight of the desired product, requiring costly facilities to recycle it. As shown by Vergnes and Berzin, 2004, contrary to batch reactors, extruders can handle very viscous materials. Higher physical and chemical modification rates place it as an intensification process. In addition, low processing volumes and residence times permit to make economies in energy, materials and consumables. With increasing concerns about energy and environmental issues, efficient and continuous reactors like extruders are seen as sustainable processing technologies (Janssen, 2004). While solving the problem regarding the solvents use, it raises issues linked to the mixing of high viscous reactants or products and difficulties to achieve homogeneous mixtures.

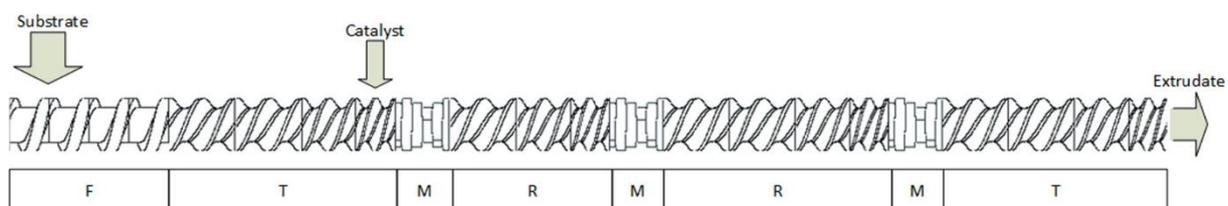


Fig. 1-16 : reactive extrusion standard screw configuration. F corresponds to a feeding zone, T and R are respectively transport and reaction areas with conveying

Extruders are continuous reactors and in-line addition of reactants associated with restrictive screw elements (reverse or kneading blocks) permit to isolate specific barrel modules in order to carry out discrete chemical processes (Bouvier and Campanella, 2014). An example of this screw configuration is presented in Fig. 1-16. Four main classes of chemical reactions are realized in screw extruders, bulk reactions, control of molecular weight of polymers, chemical modifications and reactive liquid/solid extraction-pressing. These reactions can be applied to synthetic materials as well as biomaterials such as biomass. Reactive extrusion has especially been studied in continuous monomers polymerization in bulk reactions, avoiding the use of solvents while enhancing process productivity and flexibility (Brown, 1991). It is still highly complicated to build a model of these reactions due to the lack of relevant kinetic data that were, for most of it, obtained in diluted conditions. Most of these reactions are carried out in intermeshing co-rotating twin-screw extruders.

Even though this technique provides many advantages, two main drawbacks are to be highlighted. Firstly the temperature regulation difficulties, because of the limited cooling capacities. Secondly, and most importantly, the limited residence time. In general it is comprised between 1 to 5 min, allowing only fast reactions to occur. In these fast conditions, species distribution depend on both bulk flow and molecular diffusion (Bouvier and Campanella, 2014).

1.4.1.2. Enzymatic hydrolysis of biomass

Processing biomass brings issues that have already been solved by some living organisms. Enzymes are the key tools selected by the evolution to efficiently degrade and assimilate biomass, from storage organs (seeds, tubers, rhizomes) to structural organs with complex lignocellulosic composition. Historically enzymes have served as efficient biocatalysts for biomass. Processes involving fermentation such as brewing, baking and the production of alcohol have been known and used as controlled natural transformations since prehistoric times. From its discovery in 1887 by Kühne to its wide application today, enzyme catalysis has progressively been developed in the biomass processing, from food to non-food sectors.

In the 1960s the first enzyme preparation (amyloglucosidase) was produced, allowing the complete breakdown of the starch polymer into glucose. Greater yields, higher degree of purity and facilitated crystallization led to the rapid conversion of the glucose production from acid hydrolysis to enzymatic hydrolysis. Later, in the 1990s, enzyme technology was applied for the degradation of complex polysaccharides present in plant cell walls. This was done in order to improve the extraction of intracellular components in fruits (production of fruit juices) and seeds, involving enzymes such as pectinases, hemicellulases, and cellulases. Firsts applications in the non-food industry have been developed at the same time within the textile, paper and more recently biofuels industries (Rehm and Reed, 1998). Enzyme catalysis is as an alternative to conventional physical, physiochemical or chemical treatments. Because of the rapid development of biotechnologies it has been more accessible for large scale applications (Guzmán-Maldonado et al., 1995; Norman, 1981). It offers different advantages compared with conventional treatments that can be underlined concerning the biomass hydrolysis. The better specificity limits the production of by-products that can later be inhibitory for the process, while

increasing the reaction yield. These reactions can be done under mild conditions, using non-toxic solvents which is particularly important in the food industry where products have to be edible and respect norms of food safety (Rosenthal et al., 1996). However, some limitations concerning biomass processing have to be cited. The main limitation is the reaction time that can extend to several days. Moreover, as highlighted in the 1.1 section, an optimal catalysis reaction requires diluted reaction conditions. Therefore the solid to liquid ratio is an important criterion since the enzyme, in its free form, needs a vector to move from a substrate to another. Increasing the solid concentration decreases the enzyme's mobility. It is observed in solid/liquid mixtures of insoluble substrates like lignocellulose, as well as with soluble substrate in high concentration that give highly viscous solution with diffusion limitation (Baks et al., 2008). In the case of insoluble lignocellulosic substrate, hydrolysis is limited by several factors. Particles size, available surface area, crystallinity of the cellulose, moisture content, lignin content and polymerization degree control the biomass accessibility (Hendriks and Zeeman, 2009a). The use of one or several pretreatment methods is often required to improve the enzyme accessibility and therefore catalysis.

1.4.1.3. Twin-screw extrusion: Thermomechanical pretreatment of biomass

Extrusion of biomass historically appeared in the food industry of the mid-1930s with the production of pasta and the cereal-processing industry. Kneading, cooking, forming and texturizing functions of the extruder are used in the cereals transformation. Extrusion also widely developed in the oilseed-processing industry because of the fractionation capacities of the machine (Harper, 1981). More recently, in the 1980s, extrusion process has been applied to lignocellulosic biomass degradation, for applications such as paper industry (De Choudens et al., 1989), components extraction (N'Diaye et al., 1996) or pretreatment for bioethanol production, as summarized by (Zheng and Rehmann, 2014). As detailed earlier, extrusion pretreatment presents unique advantages and flexibility. Biomass processing commonly uses the high shear, high pressure and temperature capabilities of the extruder, to physically deconstruct feedstock. With chemical resistant materials, it is also used for acid or alkali reactive treatments. These hard conditions that are enabled during the extrusion process aren't compatible with enzyme mild conditions. This is why it won't be detailed in this review, especially since Karunanithy and Muthukumarappan, 2013 already summarized the thermomechanical pretreatment of a large range of feedstocks. Among other advantages, it points out the good mixing capacities that removes the softened parts while exposing the interior surface to thermal and chemical action, thus improving the material deconstruction. And finally, it has to be underlined that the flexible and continuous aspects of the extruder allow to sequentially pretreat biomass while permitting, in a subsequent part of the machine, good conditions for enzyme catalysis, which is one of the main advantage of this technology (Vandenbossche et al., 2016).

1.4.2. Bioextrusion: combining thermomechanical treatment with enzyme catalysis

1.4.2.1. Bioextrusion of Starch: starch liquefaction

As it was underlined in the 1.3.1 section, starch degradation is one of the first and main sector to use enzyme biotechnologies. The industrial process of starch hydrolysis permits the production of a variety of glucose and glucose-based products, from glucose syrups (mixtures of polymers of D-glucose), to dextrose hydrolisates with the maximum amount of low

molecular weight sugars (Guzmán-Maldonado et al., 1995). These hydrolysates are conventionally produced including two processing steps. First, the liquefaction step (30-90 min), includes the gelatinization, corresponding to the opening of the starch structure by hydration of the polymer to facilitate the enzyme attack, and the dextrinization, which prevents the retrogradation or crystallization during the subsequent steps. Secondly, the saccharification step (12-96 hours), is the enzyme breakdown of the liquefied mixture of oligo- and polysaccharides into low molecular weight sugars.

On the one hand High Temperature Short Time (HTST) extrusion has been widely used in the cereal grain processing industry (Linko et al., 1981). Mercier and Feillet, 1975 showed that low moisture level starches can be liquefied by continuous extrusion cooking. Yet thermomechanical treatment alone is limiting for two main reasons. Firstly a rapid retrogradation phenomenon takes place when the extrudate cool below 60 °C (up to 18 % of the dry weight). Secondly produced starches slurries are highly viscous thus leading to handling difficulties in the case of a following continuous saccharification process (Linko et al., 1983a). On the other hand the traditional acid hydrolysis of starch has been replaced by the enzyme conversion (Norman, 1981; Rehm and Reed, 1998). The old acid technique is non-specific, gives a low product yield, leads to the formation of by-products and requires the use of a base in order to neutralize the solution which implies the use of expensive corrosion resistance materials. As seen in the 1.2 section, enzyme catalysis is a solution to these issues but requires a long reaction time (24-96 h), a high enzyme concentration (up to 21 AGI/g, 2,34 U/g) and becomes difficult at high solid concentrations (handling and repolymerization issues at 30-40%) (Govindasamy, 1995; Labout, 1985).

Several publications focus on the introduction of enzymes during the extrusion process, reinforced by the observation that the α -amylase could keep its activity during and after the extrusion process (Linko et al., 1978). Different sources of starch have been tested such as corn (*Zea mays L.*) (Chouvel et al., 1983), barley (*Hordeum vulgare*) (Linko et al., 1983a), wheat (*Triticum aestivum*) (Hakulin et al., 1983; Reinikainen et al., 1986), sago (*Metroxylon sagu*) (Govindasamy et al., 1997a) and more recently broken rice (*Oryza sativa*) starch (Li et al., 2013; Xu et al., 2017, 2015). Due to the time needed for the complete saccharification, the bioextrusion has mainly been limited to the liquefaction part, but some researchers intended to initiate the saccharification step as well (Hakulin et al., 1983; van Zuilichem et al., 1990). Thermostable α -amylases from *Bacillus licheniformis* are introduced for the liquefaction step with an optimal temperature of 90°C and an pH optimum between 6.0-6.5 (Ivanova et al., 1993). Saccharification step is realized with fungal glucoamylases with temperature optima between 50-70 °C and optimal pH observed from 4.5 to 6.5.

1.4.2.1.1. Factors influencing starch bioextrusion

Thanks to the numerous publications and the different response surface methodologies used, it is possible to summarize the main influencing factors. The degree of starch gelatinization, enzyme activity during extrusion and efficiency of the subsequent saccharification stage are mainly influenced by enzyme concentration, moisture content and temperature. Other less investigated yet influencing factors are residence time and screw speed and configuration. Bioextrusion tested conditions are summarized into the Table 1-8 (extruders characteristics) and Table 1-9 (enzymes and substrates characteristics).

1.4.2.1.1.1. Enzyme loading

First of all, increasing the α -amylases concentration increases the liquefaction efficiency. Most of the authors obtained the highest initial and subsequent hydrolysis rate with the highest concentration tested (Table 1-9). Chauvel et al., 1983, showed a linear response between the extend of hydrolysis and the α -amylases loading.

1.4.2.1.1.2. Enzyme combination

Some publications also combined the addition of α -amylases with the addition of glucoamylases, thus starting the saccharification stage at the end of the extrusion process., Hakulin et al., 1983 observed a higher conversion level when introducing these glucoamylases into the last extrusion section, while van Zuilichem et al. 1990a measured a positive influence when increasing both α -amylases and glucoamylases (Table 1-9).

1.4.2.1.1.3. Moisture content

Similarly to enzyme concentration, all the publications regarding the bioextrusion of starch observed a better effect with higher moisture content. If extruders can work at low moisture content with high-viscosity conditions, a higher feed moisture increases the bioextrusion effect by allowing an easier enzyme diffusion. Moreover, lowering the moisture content leads to higher mechanical forces that can denature enzymes (Baks et al., 2008; Kaya et al., 1994). Best operating moisture were often found at the high range of the one tested (Table 1-9).

1.4.2.1.1.4. Temperature

The temperature is another influencing factor. Operational temperatures are limited by the thermo-degradation of enzymes. Several researchers found optimal temperatures of the system in the 90-100°C range (Table 1-8 and 1-9), reporting better results when α -amylase activity was preserved. With a half-life of 15 min at 110°C, the short time residence limits the denaturation (van Zuilichem et al., 1990). However researchers that selected temperatures higher than 100 °C observed partial deactivation, up to 160°C, where almost complete inactivation of the enzyme occurred (Linko et al., 1983b). In the case where saccharification was initiated in the extruder, saccharification zones where even set up lower (60-65°C) (Hakulin et al., 1983).

1.4.2.1.1.5. Screw speed and configuration

The extrusion profiles are often corresponding to the classic organization seen in reactive extrusion. A repeated configuration of transport elements (forward screw elements) followed by an intensive mixing zone with kneading discs create isolated areas for reactions to occur (Fig. 1-16). Mechanical constraints are not a center of interest in the many studies concerning starch bioextrusion. It has yet been observed that the application of mechanical forces reduce the thermal energy needed to deconstruct and gelatinize the starch (Baks et al., 2008). Reinikainen et al. 1986b, investigated the effect of restrictive screw elements. The increase of the counter screw length led to an increase of the degree of hydrolysis at the lower temperature range (close to 100 °C). The regulation of screw speed can also modify the mechanical force applied on the extrudate (Baks et al., 2008).

Chapitre I : Etat de l'art

Table 1-8: Summary of starch bioextrusion characteristics. extruders characteristics and corresponding responses

Publication #	Extruder #	Length (L) mm	Diameter (D) mm	Length/Diameter (L/D)	Bioextrusion length mm	Screw speed rpm		Barrel temperature °C					
						min	max	min	max				
Hakulin et al.. 1983	Werner & Pfeleiderer Continua 58 twin-screw	1160	58	20	L or around (1/3) L glucoamylases 145 mm	250		150	200				
Linko et al.. 1983b	Creusot-Loire BC-45 twin-screw	600	55	120/11	L	150		n/a					
Reinikainen et al.. 1986	Creusot-Loire BC 45 twin-screw	600	55	120/11	L	150		n/a					
van Zuilichem et al.. 1990	Cincinnati Milacron CM 45	n/a	45	n/a	100 mm from the feed point glucoamylases just before the die	32		n/a					
Govindasamy et al.. 1997	Cletral BC 21 twin-screw	400	25	16	L	Conditions		70	190	70	130		
						Results		105 ^{opt}					
						Time (h) #				min	max		
						0	OC			0	22		
	DE			0	10 ^{opt}								
	WS I			11	60 ^{opt}								
Vasanthan et al.. 2001	Werner and Pfeleiderer ZSK 57W 50P. Stuttgart. Germany	n/a	n/a	20	n/a	Conditions		50	90	140			
						Results		100 ^{opt}					
						Time (h) #				min	max		
						0	DH ₃			0	27.8 ^{opt}		

							DE ³	1.6	36.1 ^{opt}	
							DH ₄	0	21.8 ^{opt}	
							DE ⁴	1.1	31.3	
						Conditions	50	150	60	90
						Results		100 ^{opt}	90 ^{opt}	
Baks et al., 2008	Berstorff. Hannover. Germany	1000	25	40	around L/4.5	Time (h)	#	<i>Min to max</i>		
						0	DE	¹ 0 to 9 ^{opt}		
						1	DE	¹ 8 to 40 ^{opt}		
						24	DE	¹ 32 to 57 ^{opt}		
						Conditions	350	n/a		
de Mesa-Stonestreet et al., 2012	M-18. American Leistriz. Somerville.NJ	522	18	29	L	Conditions	100	90	106	
						Results		98 ^{opt}		
						Time (h)	#	<i>Min to max</i>		
						600	FE	¹ 69.57 to 93.63 ^{opt}		
						Conditions	100	200	80	100
						Results		100 ^{opt}	100 ^{opt}	
Xu et al., 2017	TYPE TSE 24 MC. Thermo scientific. USA	600	24	25	L	Time (h)	#	<i>Min to max</i>		
						0	SG	¹ 63.5 to 99.9 ^{opt}		

Extruders characteristics and conditions are summarized in this table. A results section is presented under the bioextrusion conditions part of each publication. These sections gather the different results obtained. and its corresponding time. which describe the starch liquefaction. These are not exhaustive results but give an idea of the process impact and efficiency with ranges between minima and maxima obtained.

DE is the dextrose equivalent; DH is the degree of hydrolysis; OC is the oligosaccharides content; WSI is the water soluble index; FE is the fermentation efficiency; SG is the starch gelatinization. ^{opt} Indicates the optimum values observed in the conditions and results section. In the results section. values are referenced as ^{opt} if it has been measured with the corresponding optima indicated in the conditions section.

¹Centered values are obtained with multiple factor modifications (often thanks to a response surface model) that are not associable with a single specific condition.

As underlined in the 1.3.2.1.1.3 section, physical constraints are highly dependent on the water content as observed by Lawton et al., 1972. A high water content will require higher temperatures or faster screw speed. In the bioextrusion case this factor is limited by the protein degradation, high temperatures and high mechanical frictions will limit the enzyme action.

Besides, Govindasamy et al., 1997a, 1997b investigated both single and twin screw bioextrusion. They observed a preferential degradation of the amylopectin fraction for the single screw and no significant effect on the amylose fraction. Twin-screw bioextrusion had visible impacts on the GPC chromatograms on both fractions. Most of the bioextrusion publications focus on the twin-screw extrusion. Bouvier et Campanella 2014b underline better mixing capacities and product uniformity with twin-screw extrusion that could explain this choice.

1.4.2.1.1.6. Residence time

The residence time influence was not widely studied in the case of starch bioextrusion. Hakulin et al., 1983, tested the residence time influence by modifying the enzyme addition stage. These modifications have only a small impact on the residence time that can be measured in seconds, and the results showed really close values (DE around 90). Govindasamy, 1995, observed dextrose equivalent (DE) and water solubility index (WSI) values slightly higher when enzymes were injected earlier in the extruder. Vasanthan et al., 2001 observed lower starch gelatinization when increasing the screw speed. They associated this result with the decrease of the residence time, knowing that it also modifies the mechanical forces applied.

Chapitre I : Etat de l'art

Table 1-9: Summary of starch bioextrusion characteristics with enzymes, substrates characteristics and corresponding responses (Baks et al., 2008; de Mesa-Stonestreet et al., 2012; Govindasamy et al., 1997a; Hakulin et al., 1983; Li et al., 2013; Linko et al., 1983a; Reinikainen et al., 1986; van Zuilichem et al., 1990; Vasanthan et al., 2001; Xu et al., 2017).

Publication			Feed rate		Feed moisture (%)		Mass temperature (°C)		Enzyme concentration (%)				Enzyme	Biomass
			min	max	min	max	min	max	α -amylase		gluco-amylase			
	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max	min	max		
Hakulin et al., 1983	Conditions		0.9	1.5	40	65	90	127	0.9		0	0.66 ^l		
	Results				65 ^{opt}						0.66 ^{opt}			
	Time (h)	#			min	max					min	max		
	0 ²	DE	317.4 to 32.1										Termamyl 120L	Wheat starch
	1	DE									63	75 ^{opt}	Glucoamylase 150L	
	5	DE									86	94 ^{opt}		
10	DE			85	92 ^{opt}									
22	DE	386.8 to 97.2 ^{opt}												
Linko et al., 1983b	Conditions		12		40	60	105	160	0	3	0			
	Results				60 ^{opt}		125 ^{opt}		3 ^{opt}					
	Time (h)	#			min	max	min	max	min	max				
	0	IM			1.8 ^{opt}	2.9			5.5 ^{opt}	18.5			Termamyl 60L	Native barley starch
	1/6	DE			16	24 ^{opt}	2	24-27				Thermamyl 120L		
	10	DE					76	90-95 ^{opt}	75-80	88-95 ^{opt}				
24	DE			93	96 ^{opt}									
48	DE							85-88	95 ^{opt}					
Reinikainen et al., 1986	Conditions		12		35	65	100	150	0	6 (ml/kg)	0		Termamyl 60L	Wheat starch
	Results													

Chapitre I : Etat de l'art

	Time (h)	#	<i>min to max</i>								
	0	DH	³ <1								
		DE	³ 0.27 to 2.7								
	2	DE	³ 1.2 to 23								
	Conditions		11	60	80	120	0	0.262	0.05	1	
	Results										
<i>van Zuilichem et al., 1990</i>	Time (h)	#	<i>min to max</i>							Termamyl 120L	Cracked corn
		1/A	³ 0 to >400							Amigase GM	
		1/B	³ <55 to >75								
	Conditions		2	28.5	50.5	n/a	0	1	0		
	Results		50.5 <i>opt</i>				1 <i>opt</i>				
	Time (h)	#	<i>min</i>		<i>max</i>		<i>min</i>		<i>max</i>		
<i>Govindasamy et al., 1997</i>		DH	³ 0.38 to 1.82 <i>opt</i>							Termamyl 120L	Sago starch
	0	DE								0	10 <i>opt</i>
		OC	0	22 <i>opt</i>							
		WSI	³ 0 to 60 <i>opt</i>								
	Conditions		22.7	20	50	n/a	0	4	0		
	Results		50 <i>opt</i>				4 <i>opt</i>				
	Time (h)	#	<i>min to max</i>								
<i>Vasanthan et al., 2001</i>		DH ³	³ 0 to 27.8 <i>opt</i>							Termamyl 120L	Barley grains
	0	DE ³	³ 1.6 to 36.1 <i>opt</i>								
		DH ⁴	³ 0 to 21.8 <i>opt</i>								
		DE ⁴	³ 1.1 to 31.3 <i>opt</i>								
	Conditions		2	30	50	n/a	0.1	2.5	0		
<i>Baks et al., 2008</i>	Results		40 <i>opt</i>				2.5 <i>opt</i>		Termamyl 120 L	Native wheat starch	

Chapitre I : Etat de l'art

	<i>Time (h)</i>	#	<i>min to max</i>									
	0	DE	³ 0 to 9 ^{opt}									
	1	DE	³ 8 to 40 ^{opt}									
	24	DE	³ 32 to 57 ^{opt}									
<i>de Mesa-Stonestreet et al., 2012</i>	Conditions		1.48	2.25	14	50	n/a	0	10	0	<i>Liquozyme SC DS</i>	<i>Sorghum flour</i>
	Results		42 ^{opt}				0.1 ^{opt}					
<i>Li et al., 2012</i>	Conditions		1.5		30	42	n/a	0.01	0.13	0	<i>Termamyl 120 L</i>	<i>Milled broken rice</i>
	Results		42 ^{opt}				0.1 ^{opt}					
	600	FE	³ 69.57 to 93.63 ^{opt}									
	Conditions		1.5	3	22	38	n/a	0	0.1	0		
<i>Xu et al., 2017</i>	Results		3 ^{opt}		38 ^{opt}		0.1 ^{opt}				<i>Termamyl 120 L</i>	<i>Glutinous rice</i>
	0	SG	³ 63.5 to 99.9 ^{opt}									

Substrates and enzymes characteristics and conditions are summarized in this table. A results section is presented under the bioextrusion conditions part of each publication. These sections gather the different results obtained, and corresponding time, which describe the starch liquefaction. These are not exhaustive results but give an idea of the process impact and efficiency with ranges between minima and maxima obtained. The 0 value in the time column of the result section corresponds to the end of the extrusion process. Unless indicated otherwise, enzyme concentrations are expressed as the ratio of protein (g) per dry biomass (g).

DE is the dextrose equivalent; IM is the quantity of insoluble material; DH is the degree of hydrolysis; 1/A is the initial conversion rate; 1/B is the final conversion level; OC is the oligosaccharides content; WSI is the water soluble index; FE is the fermentation efficiency; SG is the starch gelatinization.

1Last segment was cooled down to 60°C and feed moisture was adjusted to 70% when gluco-amylases where added.

2Indicated as the beginning of the batch process, without any precision on the time needed to transfer the bioextrudate into the batch.

3Centered values are obtained with multiple factor modifications (often thanks to a response surface model) that are not associable with a single specific condition.

opt Indicates the optimum values observed in the conditions and results sections. In the results section, values are referenced as opt if it has been measured with the corresponding optima indicated in the conditions section.

1.4.2.1.2. Bioextrusion of starch results

1.4.2.1.2.1. Prevent the retrogradation phenomenon

Some common clear advantages can be drawn out of the different results obtained. The main advantage of introducing enzymes is to minimize or even eliminate the retrogradation of the liquefied starch. This phenomenon can lead to a recrystallization as high as 18% of the dry weight (Table 1-9). With the same DE observed in the soluble portion, a significant difference in the conversion rate after the saccharification step shows that the insoluble formation is a limiting factor affecting starch hydrolysis (Hakulin et al., 1983). α -amylases were repeatedly proved to prevent this recrystallization during extrusion-liquefaction by most of the authors (Reinikainen et al., 1986; van Zuilichem et al., 1990). Furthermore, Hakulin et al. 1983 observed a reduction of insolubles when saccharification was initiated during the extrusion, as a continuous process (Table 1-9). The introduction of glucoamylases reduced the insoluble from 2-5% to 0.5% of the dry mass.

1.4.2.1.2.2. Reduction of cold paste viscosity

Another improvement observed with the bioextrusion technique is the reduction in product cold-paste viscosity. High viscosity pastes are difficult to handle but are desirable in order to obtain a commercially feasible process and to reduce the water consumption. Specific Mechanical Energy (SME) is the conventional parameter used to measure the substrate viscosity. Govindasamy et al., 1997a showed that SME decreased from 57-131 Wh/kg in the case of conventional extrusion processing to 21-91 Wh/kg when enzymes were added.

1.4.2.1.2.3. A faster and higher subsequent saccharification or fermentation

A DE of 89 was measured after 10 h for the bioextrudated sample, whereas it took 48 h to obtain a DE of 94 for samples gelatinized and liquefied in batch conditions (Linko et al., 1983a). Li et al., 2013 measured a 5 % increase of alcoholic degree obtained after 5 days of fermentation for the bioextrudated broken rice and a final fermentation efficiency around 20% higher (Table 1-9). These publications show slightly higher final DE and fermentation values with bioextrusion and moreover, DE values are obtained faster with the bioextrusion step (Table 1-9).

1.4.2.1.3. Bioextrusion of starch effects comprehension

The bioextrusion process, with its short residence time results in an absence or a limited hydrolysis of starch. Govindasamy et al., 1997a measured the DE and found values lower than 10 while Reinikainen et al., 1986 measured DE of less than 1 after extrusion (Table 1-9). However, if hydrolysis is limited, SEC measurements showed a clear reduction of the molecular size during the process. MW lower than native starch (2×10^6) were produced during the bioextrusion pretreatment. A variety of smaller molecules increased the ratio $MW < 2 \times 10^6 / MW > 2 \times 10^6$ with the formation of a MW < 2000 fraction. Scanning electron microscopy of the starch granules after pretreatments gives interesting information about the qualitative action of bioextrusion over starch granules. When incubated with enzymes but without thermomechanical treatment, the external structure appears mainly intact and some internal pores are visible. On the other hand, with thermomechanical treatment and enzymes, below 100°C, if the integrity of the granules is maintained, some breakings and more pores are

observed. When in these conditions, with a temperature higher than 100°C, but lower than the inactivation of enzymes, a complete loss of granular integrity is observed and a honeycomb structure appears which probably facilitates the enzyme penetration (Govindasamy et al., 1997b). Several authors also measured the WSI as an interesting indicator of the material deconstruction. Xu et al., 2015 observed high WSI values with bioextrusion, 1.7-1.8 times higher than with other pretreatment methods. Together with low viscosity, low water absorption index, and visible physical denaturation, it confirms the previous observations. Bioextrusion isn't long enough to permit the saccharification but synergy between good mixing, shearing action of the extruder and initiation of the enzymatic hydrolysis, it leads to an efficient material deconstruction, pretreatment method with high solid concentrations.

1.4.2.2. *Bioextrusion of lignocellulose: Lignocellulose deconstruction*

Lignocellulose treatment using continuous twin screw extrusion started as an idea that emerged during a partnership between Clextal and the Technical Center for Paper in France in the late 1970s. It led to the development of extrusion pulping of non-wood fibers for the paper production during the 1980s (De Choudens et al., 1989, 1984; Kurdin and Bohn, 1984). The introduction of enzymes during the extrusion process however started much more recently with the development of second generation bioethanol production. Being a cheap substrate, available in large quantity and everywhere on earth, lignocellulosic biomass appears to be a good alternative to fossil resources in depletion. Its use, yet, remains limited by its complex structure and recalcitrance to enzyme accessibility (Himmel et al., 2007b).

1.4.2.2.1. *Lignocellulosic biomasses and working conditions*

Contrary to the bioextrusion of starch, bioextrusion of lignocellulose, which is quite recent, hasn't been studied in details yet. However some experiments show interesting results regarding the material deconstruction and the production of fermentable sugars. Vandenbossche et al., 2014 tested several lignocellulosic substrates such as sweet corn co-products (SC), blue agave (*Agave tequilana*) bagasse (BAB), oil palm (*Elaeis guineensis* Jasq.) empty fruit bunch (OPEFB) and barley straw (BS). (Duque et al., 2014) worked with barley straw as well and (Samaniuk et al., 2011a) with ensiled corn stover (Table 1-10).

Even if it is complicated to make the comparison between all these studies, some common working conditions can be underlined. First of all the temperatures of bioextrusions were set around 50°C (Table 1-11), which is the optimal temperature for most of the cellulases cocktails, and mass temperatures ranged from 33 to 55°C. All the publications cited in this part use pretreated lignocellulosic biomasses as starting material for the bioextrusion experiments. All biomasses were previously milled with particles size equal or smaller than 6 mm (Table 1-12). Some authors had recourse to an alkali pretreatment (Duque et al., 2014; Vandenbossche et al., 2015a, 2014a), others used acid pretreated biomass (Samaniuk et al., 2011a). All bioextrusion profiles are also similar with several sequences of consecutive transport and mixing effect using as presented in figure 1. Even with large extruder diameters, feed rates of lignocellulosic biomasses were kept relatively low (maximum 3.29 kg/h), whereas starch feed rates were set up to 22.7 kg/h. This is probably linked to the heterogeneity and handling difficulties of lignocellulosic substrate, contrary to substrates as homogeneous and thin than flour. In all the lignocellulose bioextrusion publication extrudate moisture is higher than 70 % (Table 1-12). This is higher than most of the feed moisture used with starch (Table 1-11). Again

here it is probably linked to handling issues. Most of the lignocellulosic biomasses contains fibers than absorb a lot of water and are difficult to process without proper moisture. Finally, this is often the same enzymatic cocktail used with low enzyme concentrations in order to keep an economically viable process. However, higher enzyme concentrations were used with the most resisting biomass in order to improve the sugar production (Oil palm empty fruit bunch, Table 1-10 and 1-11).

Chapitre I : Etat de l'art

Table 1-10: Pretreated lignocellulosic biomasses compositions and bioextruded biomasses compositions.

Publication	Biomass	Pretreated ¹			Bioextruded ²		
		Cellulose (% dwb)	Hemicellulose (% dwb)	Lignin (% dwb)	Cellulose (% dwb)	Hemicellulose (% dwb)	Lignin (% dwb)
Duque et al., 2014	Barley Straw	44.6	28.2	17.2	n/a	n/a	n/a
	Sweet corn co-products	46.4	28.8	4.8	38.5	16.7	4.2
Vandenbossche et al., 2014	Barley straw	49.5	18.8	11.8	36.6	6.8	9.4
	Blue agave bagasse	47.2	18.5	16.4	42.1	15.7	15.9
	Oil palm empty fruit bunch	53.1	23	21.4	37.9	14	15.6
Vandenbossche et al., 2015	Sweet corn co-products	46.4	28.8	4.8	n/a	n/a	n/a
	Sweet corn	33	26	3	29	15	2
	Sugarcane bagasse	48	22	11	39	10	10
Vandenbossche et al., 2016	Eucalyptus	52	9	20	36	8	19
	Vineyard pruning	37	12	15	32	10	9
	Blue agave bagasse	44	12	8	32	10	7
	Oil palm empty fruit bunch	38	16	10	38	14	9
Samaniuk et al., 2011	Corn stover	50	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

¹ Pretreated: extruded without adding enzymatic solution.

² Bioextruded: extruded after adding enzymatic solution.

Dwb: Dry Weight Basis

Chapitre I : Etat de l'art

Table 1-11: Summary of lignocellulose bioextrusions characteristics, extruders characteristics.

Publication #	Biomass #	Extruder #	Length (L) mm	Diameter (D) mm	Length/Diameter (L/D) %	Screw speed		Barrel temperature(s) °C
						min	max	
Duque et al., 2014	Barley Straw	Clextral EV 25	600	25	24	122		50
	Sweet corn co-products	Clextral BC 21	700	24	29.17	250		50
Vandenbossche et al., 2014	Blue agave bagasse	Clextral EV 25	1000	25	40	150		50
	Oil palm empty fruit bunch	Clextral EV 25	1000	25	40	85		50
	Barley straw	Clextral BC 21	700	24	29.17	200		40
Vandenbossche et al., 2015	Sweet corn co-products	Clextral BC 21	700	24	29.17	200		50
	Sweet corn	Clextral EV 53	1913.4	52.45	36.48	200		55/55/41/40/37
	Sugarcane bagasse	Clextral EV 53	1913.4	52.45	36.48	200		55/69/34/39/26
Vandenbossche et al., 2016	Eucalyptus	Clextral EV 53	1913.4	52.45	36.48	200		55/75/49/36/27
	Vineyard pruning	Clextral EV 53	1913.4	52.45	36.48	200		58/60/25/25/24
	Blue agave bagasse	Clextral EV 53	1913.4	52.45	36.48	100		55/55/41/40/37
	Oil palm empty fruit bunch	Clextral EV 53	1913.4	52.45	36.48	175		58/78/35/35/35
Samaniuk et al., 2011	Corn stover	Modified torque rheometer	n/a	n/a	n/a	25	110	n/a

¹Barrel temperatures listed by Vandenbossche et al., 2016 are real measured barrel temperatures of each module involved in the bioextrusion step.

1.4.2.2.2. Lignocellulosic bioextrudates sugar composition and further fermentation

When measuring the amount of sugars released right after the bioextrusion, only small conversion rates were observed by the authors. Vandebossche et al., 2015 observed a total sugar conversion/dry mass of 9% for the SC, which is nevertheless 5 times higher than without enzymes. Around 4% of glucose conversion/dry mass were measured by Samaniuk et al., 2011 after 5 min of bioextrusion, which is barely 1% more than without good mixing conditions. Vandebossche et al., 2014 and Duque et al., 2014 incubated the bioextrudate into batch conditions and observed good polysaccharides conversion. More than 55% monomeric sugars/dry mass for the SC, BAB and BS and 26% for the OPEFB after 48h and 70% yield of glucose and xylose after 72h for the second. Table 1-12 summarizes glucose and xylose production at the end of the enzymatic hydrolysis in batch that follows the bioextrusion process. Vandebossche et al., 2016 observed reduced hydrolysability for biomasses containing more lignin (Table 1-10 and 1-11). However, if there is probably a link, they underline that lignin is not the only influencing parameter.

1.4.2.2.3. Lignocellulosic biomass deconstruction

Even though these low sugar yields, biomass deconstruction is already observable. Duque et al., 2014 indicate a modification in the particle size distribution with 70% of the particles smaller than 1 mm, whereas 70% of the particles are bigger than 1 mm inside the starting BS material. Vandebossche et al., 2015 observed a physical degradation of the bioextrudate fiber by SEM. They also obtained twice the ratio of hot water soluble compounds/dry mass when using enzymes, going from 20 to 40%, and a slight decrease in the dynamic viscosity for the SC. As shown by the Table 1-10, biomasses measured composition evolves during bioextrusion. There is a clear cellulose and hemicellulose decrease that would require more data to be associated with biomass composition or process conditions.

Chapitre I : Etat de l'art

Table 1-12: Summary of lignocellulose bioextrusion characteristics with enzymes, substrates characteristics and corresponding responses.

<i>Publication</i>		<i>Mass temperature</i>	<i>Liquid/Solid ratio</i>	<i>Feed rate</i>	<i>Enzyme concentration</i>	<i>Milled substrate size</i>	<i>Enzyme</i>	<i>Biomass</i>
#		°C	%	kg/h	%	mm	#	#
Duque et al., 2014	Conditions	n/a	3.3	0.62	2.5	5		
	Results						Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases (9:1)	Barley Straw
	Time (h) #							
	72 G (% of DM)	32						
	72 X (% of DM)	18						
	Vandenbossche et al., 2014	Conditions	n/a	3.1	1.3	2.5	6	
Results							Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases cocktails	Sweet corn co-products
Time (h) #								
48 G (% of DM)		38						
48 X (% of DM)		19						
Vandenbossche et al., 2014		Conditions	n/a	3.1	0.5-1	2.5	5	
	Results						Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases cocktails	Barley straw
	Time (h) #							
	48 G (% of DM)	38						
	48 X (% of DM)	17						
	Vandenbossche et al., 2014	Conditions	n/a	4	0.5	2	2	
Results							Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases cocktails	Blue agave bagasse
Time (h) #								
48 G (% of DM)		49.5						
48 X (% of DM)		19.4						
Vandenbossche et al., 2014		Conditions	n/a	4.35	1.46	11	2	Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases cocktails
	Results							
	Time (h) #							

Chapitre I : Etat de l'art

	48	<i>G (% of DM)</i>	16.4				
	48	<i>X (% of DM)</i>	9.6				
	Conditions		n/a	2.5	3.29	4.6	6
	Results						
Vandenbossche et al., 2015	<i>Time (h)</i>	#	<i>min to max</i>		Advanced Enzyme Technologies (India) Cellulases and Hemicellulases cocktails		Sweet corn co-products
	0	<i>TS (% of DM)</i>	<2 ^l to 9				
	1,17	<i>TS (% of DM)</i>	<2 ^l to 12				
	1,17	<i>FPC (%/DM)</i>	13 ^l to 24				
	Conditions		42	3.5	0.16	1.5	6
	Results						
	<i>Time (h)</i>	#			Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases (9:1)		Sweet corn co-products
	24	<i>G (% of DM)</i>	26				
	Conditions		40	3.4	0.1	2.5	6
	Results						
	<i>Time (h)</i>	#			Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases (9:1)		Sugarcane bagasse
	24	<i>G (% of DM)</i>	25				
	Conditions		45	3.4	0.1	2.5	6
	Results						
Vandenbossche et al., 2016	<i>Time (h)</i>	#			Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases (9:1)		Eucalyptus
	24	<i>G (% of DM)</i>	15				
	Conditions		33	3.4	0.1	2.5	6
	Results						
	<i>Time (h)</i>	#			Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases (9:1)		Vineyard pruning
	24	<i>G (% of DM)</i>	20				
	Conditions		43	3.8	0.2	2.6	2
	Results						
	<i>Time (h)</i>	#			Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases (9:1)		Blue agave bagasse
	24	<i>G (% of DM)</i>	33				

Chapitre I : Etat de l'art

	Conditions		47	5.5	0.11	5.3	2	
	Results							<i>Novozyme Corp. Cellulases and Hemicellulases (9:1)</i>
	Time (h)	#						<i>OPEFB</i>
	24	<i>G (% of DM)</i>	18					
	Conditions		55	4	n/a	10FPU/g cellulose	3	
	Results							<i>Novozyme Corp. Celluclast and cellobiases from Trichoderma reesei and Aspergillus niger (4:1)</i>
Samaniuk et al., 2011	Time (h)	#	<i>min to max</i>					<i>Corn stover</i>
	0,5	<i>GC</i> ²	<i>7⁴ to 10</i>					
	0,5	<i>GC</i> ³	<i>5⁴ to 6.5</i>					

A results section is presented under the bioextrusion conditions part of each publication. These sections gather the different results obtained, and corresponding time, which describe the starch liquefaction. These are not comprehensive results but give an idea of the process impact and efficiency with ranges between minima and maxima obtained. In the results section, highest values are shown in bold if they coincide with the corresponding bold optimum process conditions. Unless indicated otherwise, enzyme concentrations are expressed as the ratio of protein (g) per dry biomass (g). G corresponds to glucose; X corresponds to xylose; TS corresponds to total sugars; FPC corresponds to fine particle content; GC corresponds to glucose conversion.

¹Values obtained without enzymes.

²Values obtained with a mixing speed of 25 rpm

³Values obtained with a mixing speed of 55 rpm

⁴Values obtained without mixing.

1.4.2.2.4. Bioextrusion of lignocellulose: residence time as a major influencing factor

As underlined in the 1.3.1.1 section, the main limitation of the reactive extrusion technique is the short residence time, with an estimated duration of a few minutes maximum. It is very short when compared with conventional reaction times of several days (3 to 7 days according to (Montague et al., 2002)) to obtain the maximum yield using the batch conditions. These conditions don't allow complete saccharification of the biomass. Vandenbossche et al., 2014, calculated a residence time between 1.5 to 3 min, in a latter publication they intended to overcome this limitation by recirculating the sweet corn co-product (SC) bioextrudate up to 7 times corresponding to a total of 70 min including the time in-between two consecutive runs (Vandenbossche et al., 2015a). Samaniuk et al., 2011, used a torque rheometer in order to create a batch reactor with intensive mixing properties close to those existing within the extruder. Reactions were conducted during 40 min from when torque response was no longer a function of time. Influence of the screw speed can be noted as a small decrease in glucose conversion is visible when speed is increased from 25 to 55 rpm (Table 1-12). In both cases, the bioextrudate became more and more liquefied and less and less textured with changes in its rheology. It is partly visible with a gain of approximately 7.5% of fine particles/dry mass between the first and the seventh circulation of the SC bioextrudate. Moreover, after 7 recirculations they observed twice the amount of fine particles with than without adding enzymes (Table 1-12). It emphasizes the actual enzymatic activity during the extrusion process, while underlining the short residence time. Indeed, after a single circulation no real difference is visible with or without the addition of enzymes. This particle shortening phenomenon isn't observed when recirculating without enzymes. Samaniuk et al., 2011 observed a weight-average fiber length reduction of 0.3 mm between 5 min and 30 min of reaction. Moreover, after 15 min of reaction the bioextrudate is described as a homogeneous paste comparable to toothpaste with a torque value close to zero. A slight increase in the sugars released is also observed after several recirculations (Table 1-12). A maximum of 4% more total sugars/dry mass is already observed after the fifth recirculation of the SC, whereas a greater cellulose conversion, up to 50% more than the same unmixed enzymatic hydrolysis, is measured after 30 min in the torque rheometer. When compared with a 70 min enzymatic reaction in a batch reactor, the recirculation technique shows the same reducing sugar ratio regarding the dry mass, but almost twice the ratio of free sugars and 2% more of total sugars.

Bioextrusion of lignocellulosic materials appears to improve the biomass deconstruction and the sugar release in the few existing examples. Low sugar yields observed directly after the bioextrusion or during a comparable reaction time with the torque rheometer, confirm that these conditions are not sufficient for a good saccharification of the biomass. However differences are more visible after some time, either by prolonging the bioextrusion or incubating the bioextrudate into diluted batch conditions. It indicates that bioextrusion pretreatment initiates a good saccharification that requires longer reaction times to be completed. Mechanisms behind these results have to be studied in more details.

1.4.3. Future prospects

1.4.3.1. *Process adaptation to different biomass characteristics*

Numerous factors, influencing the pretreatment, depend on the biomass characteristics before extrusion, such as moisture content, substrate composition and particles size. Influence on the bioextrusion process efficiency of some of these characteristics is not clearly defined yet. For example, Xu et al., 2015 showed that there was no significant influence of the particle size reduction in the case of rice bioextrusion, whereas for Karunanithy and Muthukumarappan, 2013 it appears critical for the feeding step. However, it is clear that adaptations of the extrusion pretreatment process to different inputs should be investigated. Indeed, a bio-refinery plant may be supplied by different farms, different biomasses, depending on the time of the year, climatic conditions, production methods. Vandenbossche et al., 2016 used six different lignocellulosic biomasses, sweet corn, sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum*), eucalyptus (*Eucalyptus grandis*), vineyard pruning (*Vitaceae vitis*), blue agave bagasse, oil palm empty fruit bunch. Is a good example of the different process adaptations that have to be made (particle size, screw speed, restrictive screw elements length, liquid/solid ratio...).

Because of storage and manipulation limitations, research and development over biomass extrusion pretreatment is usually done with dry biomass. This dry substrate is then rehydrated in order to test different moisture contents. Furthermore, very low moisture contents lead to low results and processing difficulties (Karunanithy and Muthukumarappan, 2013). Hence, in the perspective of an industrial bio-refinery production, it could be more interesting to use fresh feedstocks obtained directly after harvesting than to add water during the process. This could reduce drying cost and time.

1.4.3.2. *Complete substrate valorization*

Biomass is a very complex substrate composed of various polymers and families of molecules that are closely linked together. The release of one component often requires the removal of others. Moreover, optimal valorization of the biomass is the key of the bio-refineries economic viability. Thermomechanical pretreatment is a good tool to deconstruct matrices, disrupt cellular barriers and increase the substrate accessibility. Whereas enzymes, in its large diversity can specifically catalyze the breakdown of large molecules, and thus help to extract and separate various components like proteins, sugars, lipids and lignins. The work of de Mesa-Stonestreet et al., 2012 and Xu et al., 2015 are in this regard very interesting. They measured the protein and other compounds concentration while hydrolyzing starch with a bioextrusion pretreatment step. The de Mesa-Stonestreet et al., 2012 bioextrusion of sago starch gave similar mechanical behaviors than those obtained by Govindasamy et al., 1997b. They also observed higher protein content and, for most of it, higher digestibility than the sole batch liquefaction. Xu et al., 2015 measured amino acids contents 1.7-1.8 times higher than with other pretreatment, while increasing the gelatinization of the starch. This increase was attributed to a better starch deconstruction that released more amino acids.

Moreover, traditional pretreatments intensive conditions, with high physical and chemical constraints, lead to higher biomass deconstruction but also to some vulnerable substances loss (e.g., polyphenols, flavonoids and vitamins). Xu et al., 2017, 2015 observed better phenolic

compounds and soluble solid content of other compounds recovery with bioextrusion. The hypothesis was that the mild but efficient material deconstruction allowed to liberate more secondary substances without degrading it.

1.4.3.3. Research and development to come

Comparison, between the level of information available on starch bioextrusion and on lignocellulose bioextrusion, underlines a gap in knowledge where resources should be directed. Bioextrusion of lignocellulose has only started a few years ago, and more results and publications are needed to analyze the catalysis of complex biomasses with complex enzymatic cocktails. As shown by the numerous publications on starch bioextrusion, statistical analysis, such as response surface methodologies, are powerful tools to analyze and understand processes involving many parameters. These kind of analysis should be used to measure the influence of the different factors on the bioextrusion of lignocellulose. Moisture content and enzymatic loading should be considered, as it is underlined by the starch bioextrusion publications.

Extrusion can easily be brought to an industrial level and this is one of the main interests of this technology. Methods enabling the production of continuous sugar syrups have been patented (Ogawa et al., 1994; Su et al., 2014).

Ogawa et al., 1994 proposed a method of bioextrusion in order to work with high consistency media without any subsequent concentration process. They claim a technic allowing the continuous production of concentrated sugar solution with major energy consumption savings. Su et al., 2014, added a concentration technique to the bioextrusion to produce different concentration of starch syrups. However, using directly broken rice, they indicate a production cost reduction thanks to reduced reaction time and improved yields. Second generation biorefineries could also be a place of interest to develop the bioextrusion of lignocellulosic materials. To this matter, Vilarem et al., 2014 published a patent that include the bioextrusion step following a classical reactive extrusion step and preceding a longer batch fermentation. This method is designed in order to produce ethanol from the released sugars. This shows an easy and interesting transfer to the industrial scale. However, some technical issues have yet to be addressed, such as the connection in between the extrusion and the batch step.

1.4.4. Conclusion

Bioextrusion has been repeatedly proved to enhance the yield of the subsequent enzymatic batch reactions with high solid content conditions. This is probably linked to the good mixing conditions between the substrate and the catalyst during the process. Extrusion process unique flexibility allows an easy adaptation of the process conditions, and offers the possibility to combine several pretreatments. Among all the tested factors, enzyme concentration and moisture content are the most influencing factors. The short residence time doesn't allow complete reactions to take place but offers a good pretreatment method to initiate enzymatic reactions with limited use of solvents.

1.5. Conclusion du chapitre

L'ensemble de ces données souligne la complexité de l'étude et la diversité des entrants au cours du procédé. Tout d'abord, un substrat lignocellulosique complexe, hétérogène et résistant aux attaques physiques, chimiques et biologiques. Deuxièmement, un ensemble de catalyseurs

enzymatiques lui aussi hétérogène, avec des fonctionnalités individuelles différentes qui, associées, permettent une synergie améliorant les performances seules des enzymes. L'imprégnation enzymatique de la biomasse lors du procédé d'extrusion a déjà été étudiée plus en profondeur dans le cadre de l'hydrolyse de l'amidon. Les paramètres de la charge enzymatique et de la consistance apparaissent dans ce cas d'étude comme centraux. Les quelques résultats de bioextrusion de lignocellulose soulignent l'intérêt de cette méthode comme un maillon de la phase continue de prétraitement, pour initier efficacement l'hydrolyse enzymatique. À partir de ces observations, deux principales questions de recherche sont définies.

- Quels sont les impacts de la bioextrusion sur la déconstruction de la biomasse lignocellulosique
 - Sur le court terme : durant le procédé de bioextrusion ?
 - Sur le long terme : durant l'hydrolyse subséquente en réacteur fermé ?
- Comment le procédé de bioextrusion peut-il influencer l'hydrolyse enzymatique de résidus lignocellulosiques en milieux concentrés en substrat ?

1.6. Références

- Abdul Khalil, H.P.S., Bhat, A.H., Ireana Yusra, A.F., 2012. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydr. Polym.* 87, 963–979. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.078>
- Adjalle, K., Larose, L.-V., Bley, J., Barnabé, S., 2017. The effect of organic nitrogenous compound content and different pretreatments on agricultural lignocellulosic biomass characterization methods. *Cellulose* 24, 1395–1406. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1199-8>
- Adler, E., 1977. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11, 169–218. <https://doi.org/10.1007/BF00365615>
- Agreste, 2017. Surfaces, productions, rendements des céréales, oléagineux, protéagineux, résultats (Statistique agricole annuelle (SAA)). Bureau des Statistiques sur les Productions et les Comptabilités Agricoles 2017.
- Albinsson, B., Li, S., Lundquist, K., Stomberg, R., 1999. The origin of lignin fluorescence. *J. Mol. Struct.* 508, 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(98\)00913-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(98)00913-2)
- Alemdar, A., Sain, M., 2008. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. *Bioresour. Technol.* 99, 1664–1671. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.029>
- Allen, S.G., Schulman, D., Lichwa, J., Antal, M.J., Laser, M., Lynd, L.R., 2001. A Comparison between Hot Liquid Water and Steam Fractionation of Corn Fiber. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40, 2934–2941. <https://doi.org/10.1021/ie990831h>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Arantes, V., Saddler, J.N., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol. Biofuels* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>
- Baks, T., Kappen, F.H.J., Janssen, A.E.M., Boom, R.M., 2008. Towards an optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch–water mixtures with alpha-amylase from *B. licheniformis*. *J. Cereal Sci.* 47, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.03.011>
- Bar-On, Y.M., Phillips, R., Milo, R., 2018. The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711842115>
- Béguin, P., Aubert, J.-P., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>
- Beldman, G., Leeuwen, M.F.S.-V., Rombouts, F.M., Voragen, F.G.J., 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* 146, 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08653.x>
- Bidlack, J., 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants, in: *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. pp. 51–56.
- Biely, P., 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286–290. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90004-6)
- Bombeck, P.-L., Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Montplaisir, D., Richel, A., Beauregard, M., 2017. Predicting the most appropriate wood biomass for selected industrial applications: comparison of wood, pulping, and enzymatic treatments using fluorescent-tagged carbohydrate-binding modules. *Biotechnol. Biofuels* 10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0980-0>
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382, 769–781. <https://doi.org/10.1042/BJ20040892>
- Bouvier, J.-M., Campanella, O.H., 2014. *Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials*. John Wiley & Sons.
- Broust, F., Girard, P., Steene, L.V.D., 2013. Biocarburants de seconde génération et bioraffinerie [WWW Document]. Ref TIP958WEB - Innov. Technol. URL <https://www.techniques->

- ingenieur.fr/base-documentaire/innovation-th10/innovations-en-energie-et-environnement-42503210/biocarburants-de-seconde-generation-et-bioraffinerie-re110/ (accessed 7.7.18).
- Brown, S.B., 1991. Chemical Processes Applied to Reactive Extrusion of Polymers. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 21, 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.ms.21.080191.002205>
- Calvo-Flores, F.G., Dobado, J.A., 2010. Lignin as Renewable Raw Material. *ChemSusChem* 3, 1227–1235. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000157>
- Canas, S., Belchior, A.P., Spranger, M.I., Bruno-de-Sousa, R., 2011. HPLC method for the quantification of phenolic acids, phenolic aldehydes, coumarins and furanic derivatives in different kinds of toasted wood used for the ageing of brandies. *Anal. Methods* 3, 186–191. <https://doi.org/10.1039/C0AY00269K>
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Chen, Q., Marshall, M.N., Geib, S.M., Tien, M., Richard, T.L., 2012. Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. *Bioresour. Technol.* 117, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.085>
- Chen, Z., Hu, M., Zhu, X., Guo, D., Liu, S., Hu, Z., Xiao, B., Wang, J., Laghari, M., 2015. Characteristics and kinetic study on pyrolysis of five lignocellulosic biomass via thermogravimetric analysis. *Bioresour. Technol.* 192, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.062>
- Choudhury, G.S., Gogoi, B.K., 1996. Protease Inactivation in Fish Muscle by High Moisture Twin-Screw Extrusion. *J. Food Sci.* 61, 1219–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10964.x>
- Chouvel, H., Chay, P., Cheftel, J., 1983. Enzymatic hydrolysis of starch and cereal flours at intermediate moisture contents in a continuous extrusion-reactor. *Lebensm.-Wiss. Technol. Food Sci. Technol.*
- Chovau, S., Degrauwe, D., Van der Bruggen, B., 2013. Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 26, 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.064>
- Danisco US Inc., 2007. Accelerase 1000 – Cellulase enzyme complex for lignocellulosic biomass hydrolysis – Technical bulletin no.1 : saccharification.
- Davin, L.B., Lewis, N.G., 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.06.011>
- De Choudens, C., Angelier, R., Combette, P., 1984. Pâtes mécaniques de résineux, pâtes chimicomécaniques de feuillus: nouveau procédé de fabrication. *Rev.-ATIP* 38, 405–417.
- De Choudens, C., Angelier, R., Combette, P., Lesas, C., 1989. Procédé de fabrication de pâtes chimicomécaniques ou chimicothermo-mécaniques blanchies. Patent 87, 11082.
- de Mesa-Stonestreet, N.J., Alavi, S., Gwartz, J., 2012. Extrusion-enzyme liquefaction as a method for producing sorghum protein concentrates. *J. Food Eng.* 108, 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.07.024>
- del Río, J.C., Rencoret, J., Prinsen, P., Martínez, Á.T., Ralph, J., Gutiérrez, A., 2012. Structural Characterization of Wheat Straw Lignin as Revealed by Analytical Pyrolysis, 2D-NMR, and Reductive Cleavage Methods. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5922–5935. <https://doi.org/10.1021/jf301002n>
- DeMartini, J.D., Pattathil, S., Miller, J.S., Li, H., Hahn, M.G., Wyman, C.E., 2013. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. *Energy Environ. Sci.* 6, 898–909. <https://doi.org/10.1039/C3EE23801F>
- Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2012. Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2, e201209015. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209015>
- Du, J., Cao, Y., Liu, G., Zhao, J., Li, X., Qu, Y., 2017. Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at

- high solid concentrations. *Bioresour. Technol.* 229, 88–95.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.011>
- du Preez, J.C., Bosch, M., Prior, B.A., 1986. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 228–233.
<https://doi.org/10.1007/BF00261920>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., González, A., Ballesteros, M., 2014. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresour. Technol.* 158, 262–268.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.041>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2013. Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 48, 775–781.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.003>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2017. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renew. Energy* 114, 1427–1441.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>
- Ebringerová, A., 2005. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromol. Symp.* 232, 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Fan, L., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987. Enzymatic Hydrolysis, in: *Cellulose Hydrolysis, Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 21–119.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-72575-3_3
- Fretzdorff, B., Seiler, K., 1987. The effects of twin-screw extrusion cooking on cereal enzymes. *J. Cereal Sci.* 5, 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80012-7)
- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2001. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochem.* 36, 571–578. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00253-3)
- Gasser, C.A., Hommes, G., Schäffer, A., Corvini, P.F.-X., 2012. Multi-catalysis reactions: new prospects and challenges of biotechnology to valorize lignin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1115–1134. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4178-x>
- Gatt, E., Rigal, L., Vandenbossche, V., 2018. Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: A review. *Ind. Crops Prod.* 122, 329–339.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.069>
- Geng, W., Jin, Y., Jameel, H., Park, S., 2015. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. *Bioresour. Technol.* 187, 43–48.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.067>
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Ghose, T.K., Bisaria, V.S., 1987. Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. *Pure Appl. Chem.* 59, 1739–1751. <https://doi.org/10.1351/pac198759121739>
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gomes, D., Rodrigues, A.C., Domingues, L., Gama, M., 2015. Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4131–4143.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6535-z>
- Gossett, J.M., Stuckey, D.C., Owen, W.F., McCarty, P.L., 1982. Heat treatment and anaerobic digestion of refuse. *J. Env. Eng Div ASCE U. S.* 108:EE3.
- Goupy, J., 2000. Modélisation par les plans d'expériences. *Tech. Ing. Mes. Contrô* R275–1.
- Govindasamy, S., 1995. Influence of extrusion variables on subsequent saccharification behaviour of sago starch. *Food Chem.* 54, 289–296. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00049-0](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00049-0)
- Govindasamy, S., Campanella, O.H., Oates, C.G., 1997a. Enzymatic hydrolysis of sago starch in a twin-screw extruder. *J. Food Eng.* 32, 403–426. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00017-4)
- Govindasamy, S., Campanella, O.H., Oates, C.G., 1997b. The single screw extruder as a bioreactor for sago starch hydrolysis. *Food Chem.* 60, 1–11.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00100-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00100-8)

- Grohman, K., Torget, R., 1985. Optimization of Dilute Acid Pretreatment of Biomass”, *Biotechnol. Bioeng.* 15.
- Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O., Biliaderis, C.G., 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 373–403. <https://doi.org/10.1080/10408399509527706>
- Hakulin, S., Linko, Y.-Y., Linko, P., Seiler, K., Seibel, W., 1983. Enzymatic Conversion of Starch in Twin-Screw HTST-Extruder. *Starch - Stärke* 35, 411–414. <https://doi.org/10.1002/star.19830351203>
- Harborne, J.B., Corner, J.J., 1961. Plant polyphenols. 4. Hydroxycinnamic acid–sugar derivatives. *Biochem. J.* 81, 242–250.
- Harper, J.M., 1981. *Extrusion of foods*. CRC press.
- Hébert-Ouellet, Y., Meddeb-Mouelhi, F., Khatri, V., Cui, L., Janse, B., MacDonald, K., Beaugregard, M., 2017. Tracking and predicting wood fibers processing with fluorescent carbohydrate binding modules. *Green Chem.* 19, 2603–2611. <https://doi.org/10.1039/C6GC03581G>
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009a. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009b. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007a. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007b. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D., 2008. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 99, 8940–8948. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.015>
- Hong, J., Ye, X., Zhang, Y.-H.P., 2007. Quantitative Determination of Cellulose Accessibility to Cellulase Based on Adsorption of a Nonhydrolytic Fusion Protein Containing CBM and GFP with Its Applications. *Langmuir* 23, 12535–12540. <https://doi.org/10.1021/la7025686>
- Ivanova, V.N., Dobрева, E.P., Emanuilova, E.I., 1993. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biotechnol.* 28, 277–289. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90176-N](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90176-N)
- Jannah, A., 2013. La tige de Maïs [WWW Document]. *Cours Biol. L2*. URL <https://coursbiologie.net/la-tige-de-mais.html> (accessed 7.6.18).
- Janssen, L.P., 2004. *Reactive extrusion systems*. CRC Press.
- Jørgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 862–870. <https://doi.org/10.1002/bit.21115>
- Kabel, M.A., Carvalho, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J.C., Gírio, F.M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2002. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 50, 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00045-0)
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A., 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 43, 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2013. Thermo-Mechanical Pretreatment of Feedstocks, in: Gu, T. (Ed.), *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 31–65.
- Kaya, F., Heitmann, J.A., Joyce, T.W., 1994. Cellulase binding to cellulose fibers in high shear fields. *J. Biotechnol.* 36, 1–10. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90016-7)

- Khatri, V., Hébert-Ouellet, Y., Meddeb-Mouelhi, F., Beaugard, M., 2016. Specific tracking of xylan using fluorescent-tagged carbohydrate-binding module 15 as molecular probe. *Biotechnol. Biofuels* 9, 74. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0486-1>
- Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Adjallé, K., Barnabé, S., Beaugard, M., 2018a. Determination of optimal biomass pretreatment strategies for biofuel production: investigation of relationships between surface-exposed polysaccharides and their enzymatic conversion using carbohydrate-binding modules. *Biotechnol. Biofuels* 11, 144. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1145-5>
- Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Beaugard, M., 2018b. New insights into the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polymers by using fluorescent tagged carbohydrate-binding modules. *Sustain. Energy Fuels* 2, 479–491. <https://doi.org/10.1039/C7SE00427C>
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol., Pretreatment of Biomass* 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Bals, B., Balan, V., Dale, B.E., 2008. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings. *Bioresour. Technol., Cellulose Conversion in Dry Grind Plants* 99, 5206–5215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.031>
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W., 1998. Comprehensive cellulose chemistry. Volume 1: Fundamentals and analytical methods. *Compr. Cellul. Chem. Vol. 1 Fundam. Anal. Methods.*
- Kubicek, C.P., 2013. Fungi and Lignocellulosic Biomass, in: *Fungi and Lignocellulosic Biomass, Biomass and Biofuels Series*. pp. 1–15 & 99–118.
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 3948–3962. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>
- Kurdin, J., Bohn, W., 1984. Mechanical pulping by extrusion, in: *1984 Pulping Conference*.
- About, J.J.M., 1985. Conversion of Liquified Starch into Glucose Using a Novel Glucoamylase System. *Starch - Stärke* 37, 157–161. <https://doi.org/10.1002/star.19850370504>
- Latieule, S., 2015. Lignine, une matière première qui monte. *Formule Verte* 26–31.
- Lawton, B.T., Henderson, G.A., Derlatka, E.J., 1972. The effects of extruder variables on the gelatinisation of corn starch. *Can. J. Chem. Eng.* 50, 168–172. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450500205>
- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4)
- Lenting, H.B.M., Warmoeskerken, M.M.C.G., 2001. Mechanism of interaction between cellulase action and applied shear force, an hypothesis. *J. Biotechnol., Biotechnology in the Textile Industry - Perspectives for the New Millennium* 89, 217–226. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00300-5)
- Li, H., Jiao, A., Xu, X., Wu, C., Wei, B., Hu, X., Jin, Z., Tian, Y., 2013. Simultaneous saccharification and fermentation of broken rice: an enzymatic extrusion liquefaction pretreatment for Chinese rice wine production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 1141–1148. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0868-0>
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>
- Ling, S., Kaplan, D.L., Buehler, M.J., 2018. Nanofibrils in nature and materials engineering. *Nat. Rev. Mater.* 3, 18016. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2018.16>
- Linko, P., Antila, J., Olkku, J., 1978. Retention of amylolytic activity in HTST-extrusion cooking. *Kem.-Kemi* 5, 691.
- Linko, P., Colonna, P., Mercier, C., 1981. High-temperature, short-time extrusion cooking [Cereal products]. *Adv. Cereal Sci. Technol.*

- Linko, P., Hakulin, S., Linko, Y.-Y., 1983a. Extrusion cooking of barley starch for the production of glucose syrup and ethanol. *J. Cereal Sci.* 1, 275–284. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(83\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(83)80015-0)
- Linko, P., Linko, Y.-Y., Olkku, J., 1983b. Extrusion cooking and bioconversions. *J. Food Eng.* 2, 243–257. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(83\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0260-8774(83)90014-6)
- Liu, J., Wang, X., Xu, D., 2010. QM/MM Study on the Catalytic Mechanism of Cellulose Hydrolysis Catalyzed by Cellulase Cel5A from *Acidothermus cellulolyticus*. *J. Phys. Chem. B* 114, 1462–1470. <https://doi.org/10.1021/jp909177e>
- Liu, R., Yu, H., Huang, Y., 2005. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose* 12, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10570-004-0955-8>
- Lundquist, K., Josefsson, B., Nyquist, G., 1978. Analysis of Lignin Products by Fluorescence Spectroscopy. *Holzforsch. - Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 32, 27–32. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1978.32.1.27>
- Lynd, L.R., 2017. The grand challenge of cellulosic biofuels. *Nat. Biotechnol.* 35, 912.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U., 1999. Biocommodity Engineering. *Biotechnol. Prog.* 15, 777–793. <https://doi.org/10.1021/bp990109e>
- Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N., 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15, 804–816. <https://doi.org/10.1021/bp9900864>
- Martínez, Á.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.002>
- Merali, Z., Ho, J.D., Collins, S.R.A., Gall, G.L., Elliston, A., Käsper, A., Waldron, K.W., 2013. Characterization of cell wall components of wheat straw following hydrothermal pretreatment and fractionation. *Bioresour. Technol.* 131, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.023>
- Mercier, C., Feillet, P., 1975. Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products [Wheat, rice, corn]. *Cereal Chem.*
- Merino, S.T., Cherry, J., 2007. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization, in: Olsson, L. (Ed.), *Biofuels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 95–120.
- Miller, G., 1963. Cellodextrins. *Methods Carbohydr Chem* 3, 134–139.
- Montague, L., Slayton, A., Lukas, J., 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. NREL Technical Report 2002.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I., 2007. “Blue” laccases. *Biochem. Mosc.* 72, 1136–1150. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>
- N'Diaye, S., Rigal, L., Larocque, P., Vidal, P.F., 1996. Extraction of hemicelluloses from poplar, *Populus tremuloides*, using an extruder-type twin-screw reactor: A feasibility study. *Bioresour. Technol.* 57, 61–67. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00041-7)
- Nishiyama, Y., Johnson, G.P., French, A.D., Forsyth, V.T., Langan, P., 2008. Neutron Crystallography, Molecular Dynamics, and Quantum Mechanics Studies of the Nature of Hydrogen Bonding in Cellulose I β . *Biomacromolecules* 9, 3133–3140. <https://doi.org/10.1021/bm800726v>
- Norman, B.E., 1981. New Developments in Starch Syrup Technology, in: Birch, G.G., Blakebrough, N., Parker, K.J. (Eds.), *Enzymes and Food Processing*. Springer Netherlands, pp. 15–50. https://doi.org/10.1007/978-94-011-6740-6_3
- Novozymes A/S, n.d. CELLIC Ctec and Htec2—Enzymes for Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. Novozymes Luna 01.
- Ogawa, K., Takenaka, Y., Sada, M., Kobayashi, T., 1994. Production of Concentrated Sugar Solution from Starch. *JPH06261781 (A)*.
- O'sullivan, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207. <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>

- Pandey, K.K., Upreti, N.K., Srinivasan, V.V., 1998. A fluorescence spectroscopic study on wood. *Wood Sci. Technol.* 32, 309–315. <https://doi.org/10.1007/BF00702898>
- Parker, M.L., Waldron, K.W., 1995. Texture of Chinese water chestnut: Involvement of cell wall phenolics. *J. Sci. Food Agric.* 68, 337–346. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680313>
- Pereira, A.N., Mobedshahi, M., Ladisch, M.R., 1988. Preparation of cellodextrins, in: *Methods in Enzymology, Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose*. Academic Press, pp. 26–38. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60104-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60104-2)
- Pintiaux, T., Viet, D., Vandenbossche, V., Rigal, L., Rouilly, A., 2015. Binderless Materials Obtained by Thermo-Compressive Processing of Lignocellulosic Fibers: A Comprehensive Review. *BioResources* 10, 1915–1963. <https://doi.org/10.15376/biores.10.1>
- Radhika, K., Ravinder, R., Ravindra, P., others, 2011. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: a review and future directions. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 6, 8–20.
- Ramachandriya, K.D., Wilkins, M., Atiyeh, H.K., Dunford, N.T., Hiziroglu, S., 2013. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfite pretreated Eastern redcedar. *Bioresour. Technol.* 147, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.048>
- Ramos, L.P., da Silva, L., Ballem, A.C., Pitarelo, A.P., Chiarello, L.M., Silveira, M.H.L., 2015. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour. Technol.* 175, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.087>
- Reddy, N., Yang, Y., 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 23, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.002>
- Rehm, H., Reed, G., 1998. *Biotechnology*, Vol. 8a: Biotransformations I. Wiley-VCH, Weinheim.
- Reinikainen, P., Suortti, T., Olkku, J., Mälkki, Y., Linko, P., 1986. Extrusion Cooking in Enzymatic Liquefaction of Wheat Starch. *Starch - Stärke* 38, 20–26. <https://doi.org/10.1002/star.19860380106>
- Roland, J.-C., Roland, F., Bouteau, F., El-Maarouf-Bouteau, H., 2008. *Atlas de biologie végétale - 9ème édition Organisation des plantes à fleurs*, Dunod. ed, Sciences Sup.
- Rollin, J.A., Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Zhang, Y.-H.P., 2011. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 22–30. <https://doi.org/10.1002/bit.22919>
- Ropars, M., Marchal, R., Pourquié, J., Vandecasteele, J.P., 1992. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. *Bioresour. Technol.* 42, 197–204. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90023-Q](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90023-Q)
- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 402–420. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)80004-F](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80004-F)
- Roubroeks, J.P., Mastromauro, D.I., Andersson, R., Christensen, B.E., Åman, P., 2000. Molecular Weight, Structure, and Shape of Oat (1→3),(1→4)-β-d-Glucan Fractions Obtained by Enzymatic Degradation with Lichenase. *Biomacromolecules* 1, 584–591. <https://doi.org/10.1021/bm000017+>
- Rubio, M., Tortosa, J.F., Quesada, J., Gómez, D., 1998. Fractionation of lignocellulosics. Solubilization of corn stalk hemicelluloses by autohydrolysis in aqueous medium. *Biomass Bioenergy* 15, 483–491. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(98\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(98)00054-3)
- Saha, B.C., 2000. α-1-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 403–423. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00044-6)
- Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T.T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeyssens, M., Tomme, P., Knowles, J.K.C., 1988. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene* 63, 11–21. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90541-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90541-0)

- Samaniuk, J.R., Tim Scott, C., Root, T.W., Klingenberg, D.J., 2011a. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresour. Technol.* 102, 4489–4494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.117>
- Samaniuk, J.R., Tim Scott, C., Root, T.W., Klingenberg, D.J., 2011b. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresour. Technol.* 102, 4489–4494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.117>
- Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G., 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 32, 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.014>
- Sengupta, Saswati, Ghosh, A.K., Sengupta, Subhabrata, 1991. Purification and characterisation of a β -glucosidase (cellobiase) from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1076, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90269-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90269-6)
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., others, 2010. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory; 2008 April. NREL Report No. Contract No -AC36-99-G010337 Spons. US Dep. Energy.
- Speranza, A., Calzoni, G., Tastemain, C., 2005. Atlas de la structure des plantes. Belin Ed. Berl. Ger. 125–203.
- Su, W., Mu, Y., Wang, Y., Yang, F., Xie, C., Qin, L., 2014. Technology for producing starch syrup by employing enzymatic extrusion of broken rice. CN103642877 (A).
- Sun, R.C., Tomkinson, J., Wang, Y.X., Xiao, B., 2000. Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. *Polymer* 41, 2647–2656. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00436-X](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00436-X)
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydr. Res.* 340, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.10.022>
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Tarkow, H., Feist, W., 1969. A mechanism for improving digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. *Adv. Chem. Ser.* 197.
- Torget, R., Walter, P., Himmel, M., Grohmann, K., 1991. Dilute-Acid Pretreatment of Corn Residues and Short-Rotation Woody Crops. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28–29, 75. <https://doi.org/10.1007/BF02922590>
- Torget, R.W., Kim, J.S., Lee, Y.Y., 2000. Fundamental Aspects of Dilute Acid Hydrolysis/Fractionation Kinetics of Hardwood Carbohydrates. 1. Cellulose Hydrolysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39, 2817–2825. <https://doi.org/10.1021/ie990915q>
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012a. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012b. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.*, Special issue on ACB 2011 30, 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51, 780–785.
- Van Soest, P. van, Robertson, J., Lewis, B., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- van Zuilichem, D.J., van Roekel, G.J., Stolp, W., van't Riet, K., 1990. Modelling of the enzymatic conversion of cracked corn by twin-screw extrusion cooking. *J. Food Eng.* 12, 13–28. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(90\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0260-8774(90)90016-2)
- Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez-Melendez, O., Evon, P., Barzana, E., Vilarem, G., Rigal, L., 2016. Suitability assessment of a continuous process combining thermo-

- mechano-chemical and bio-catalytic action in a single pilot-scale twin-screw extruder for six different biomass sources. *Bioresour. Technol.* 211, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.072>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., 2014a. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Ind. Crops Prod.* 55, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., 2014b. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Ind. Crops Prod.* 55, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Rigal, L., 2015a. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Ind. Crops Prod.* 67, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.041>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Rigal, L., 2015b. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Ind. Crops Prod.* 67, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.041>
- Vandenbossche, V., Doumeng, C., Rigal, L., 2014c. Thermomechanical and Thermo-mechano-chemical Pretreatment of Wheat Straw using a Twin-screw Extruder. *BioResources* 9, 1519–1538. <https://doi.org/10.15376/biores.9.1.1519-1538>
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol.* 153, 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Várnai, A., Siika-aho, M., Viikari, L., 2013. Carbohydrate-binding modules (CBMs) revisited: reduced amount of water counterbalances the need for CBMs. *Biotechnol. Biofuels* 6, 30. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-30>
- Vasanthan, T., Yeung, J., Hoover, R., 2001. Dextrinization of Starch in Barley Flours with Thermostable alpha-Amylase by Extrusion Cooking. *Starch - Stärke* 53, 616–622. [https://doi.org/10.1002/1521-379X\(200112\)53:12<616::AID-STAR616>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-379X(200112)53:12<616::AID-STAR616>3.0.CO;2-M)
- Vergnes, B., Berzin, F., 2004. Modelling of flow and chemistry in twin screw extruders. *Plast. Rubber Compos.* 33, 409–415. <https://doi.org/10.1179/174328904X24916>
- Vergnes, B., Chapet, M., 2016. Extrusion Procédés d'extrusion bivis. Tech. Ing. Plasturgie Procédés Extrus. base documentaire : TIB150DUO.
- Vilarem, G., Rigal, L., Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez, L.M., Hernandez, M., Vivaldo-Lima, E., Barzana, E., Ballesteros, M., Duque, A., Manzanares, P., Siika-aho, M., Uusitalo, J.M., Mata-Segreda, J., Guillouet, S., Lombart, E., Cameleyre, X., 2014. Procédé de traitement enzymatique d'une matière ligno-cellulosique solide. WO2013182827A8.
- Villaverde, J.J., Li, J., Ek, M., Ligeró, P., de Vega, A., 2009. Native Lignin Structure of *Miscanthus x giganteus* and Its Changes during Acetic and Formic Acid Fractionation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6262–6270. <https://doi.org/10.1021/jf900483t>
- Wyman, C.E., 2013. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. John Wiley & Sons.
- Xiao, B., Sun, X.F., Sun, R., 2001. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polym. Degrad. Stab.* 74, 307–319. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00163-X)
- Xiao, Z., Storms, R., Tsang, A., 2004a. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 832–837. <https://doi.org/10.1002/bit.20286>

- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2004b. Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates, in: Finkelstein, M., McMillan, J.D., Davison, B.H., Evans, B. (Eds.), Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO, Biotechnology for Fuels and Chemicals. Humana Press, pp. 1115–1126.
- Xu, E., Wu, Z., Jiao, A., Long, J., Li, J., Jin, Z., 2017. Dynamics of rapid starch gelatinization and total phenolic thermomechanical destruction moderated via rice bio-extrusion with alpha-amylase activation. *RSC Adv* 7, 19464–19478. <https://doi.org/10.1039/C7RA00477J>
- Xu, E., Wu, Z., Wang, F., Li, H., Xu, X., Jin, Z., Jiao, A., 2015. Impact of High-Shear Extrusion Combined With Enzymatic Hydrolysis on Rice Properties and Chinese Rice Wine Fermentation. *Food Bioprocess Technol.* 8, 589–604. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1429-0>
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D., 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Appl. Energy* 104, 801–809. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>
- Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 2, 26–40. <https://doi.org/10.1002/bbb.49>
- Zhang, X., Qin, W., Paice, M.G., Saddler, J.N., 2009. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. *Bioresour. Technol.* 100, 5890–5897. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.082>
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2006. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 888–898. <https://doi.org/10.1002/bit.20906>
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004a. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004b. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zheng, J., Rehmann, L., 2014. Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 18967–18984. <https://doi.org/10.3390/ijms151018967>
- Zhou, Y., Stuart-Williams, H., Farquhar, G.D., Hocart, C.H., 2010. The use of natural abundance stable isotopic ratios to indicate the presence of oxygen-containing chemical linkages between cellulose and lignin in plant cell walls. *Phytochemistry* 71, 982–993. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.001>
- Zoia, L., King, A.W.T., Argyropoulos, D.S., 2011. Molecular Weight Distributions and Linkages in Lignocellulosic Materials Derivatized from Ionic Liquid Media. *J. Agric. Food Chem.* 59, 829–838. <https://doi.org/10.1021/jf103615e>
- Zugenmaier, P., 2001. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Prog. Polym. Sci.* 26, 1341–1417. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00019-3)

2. Chapitre II :

Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

-
- Prétraitement physico-chimique en extrusion de la paille de blé pour faciliter l'étape d'hydrolyse.
 - Etude de l'influence des facteurs de consistance et de charge enzymatique sur l'hydrolyse de la paille de blé après bioextrusion.
 - Etude de l'influence de la bioextrusion : comparaison des résultats hydrolytiques avec et sans cette étape.
-

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

2.1. Prétraitement de la paille de blé

La compréhension de la déconstruction enzymatique de la biomasse lignocellulosique se fait ici dans le contexte particulier de la bioextrusion. Comme expliqué précédemment (« Introduction »), l'idée de l'introduction d'enzymes à la fin du procédé d'extrusion découle de précédentes observations expérimentales. L'inclusion de ce concept de bioextrusion dans le procédé plus global de production de bioéthanol de 2^{ème} génération, implique la prise en compte des étapes en amont et en aval. C'est pour cette raison qu'il a été décidé de travailler à partir de matière prétraitée en extrusion réactive. Afin de considérer l'étude de la bioextrusion comme l'étude d'une étape singulière du procédé dans son ensemble (Fig. 2-1). De plus, l'intérêt du prétraitement pour l'hydrolyse enzymatique a été démontré de nombreuses fois (Hendriks and Zeeman, 2009b). Par ailleurs, du point de vue de la viabilité économique du procédé il est important de réussir à intégrer plusieurs étapes du procédé, afin d'en réduire le nombre total et donc le coût (Chovau et al., 2013).

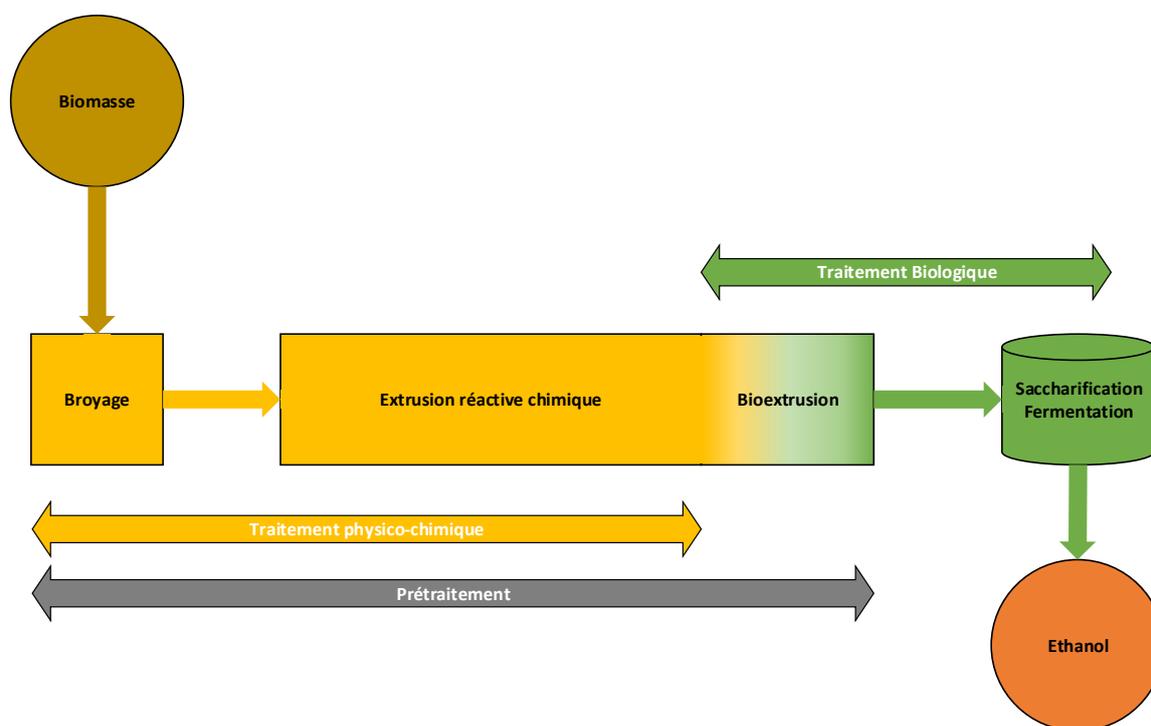


Figure 2-1: Représentation schématique du procédé dans son ensemble, depuis la biomasse jusqu'au produit final, l'éthanol.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

2.1.1. Conditions d'extrusion réactive alcaline

2.1.1.1. Extrusion alcaline

Les conditions de prétraitement alcalin de la paille de blé (M.1.1.) sont inspirées de Vandebossche et al., 2014. L'extrudeuse utilisée est une Clextal BC 45 (M.1.5.). Elle possède 7 modules de 200 mm chacun, chauffés par induction et refroidis par circulation d'eau. Le profil utilisé est schématiquement représenté en Fig. 2-2. La Fig. 2-3 indique les conditions thermiques fixées et mesurées lors du prétraitement. Enfin le Tableau 2-2 présente les autres conditions physico-chimiques définies pour l'étape d'extrusion. L'injection de H₃PO₄ permet de neutraliser la matière en sortie d'extrusion afin de la préparer pour des conditions plus douces d'hydrolyse enzymatique.

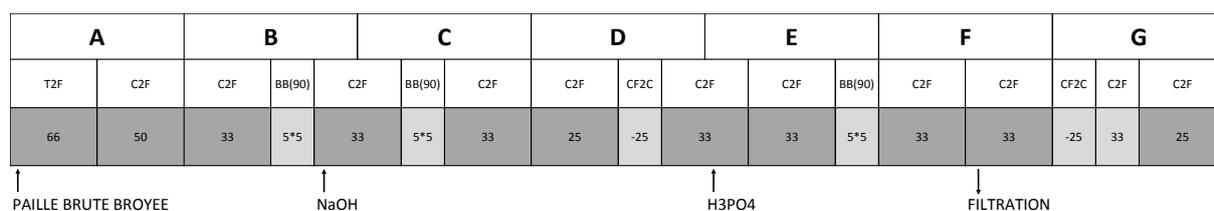


Figure 2-2 : Profil de vis pour le prétraitement alcalin de la paille de blé. La première ligne indique les différents modules de A à G. La deuxième ligne indique le type de vis utilisé. La troisième ligne indique le pas de vis utilisé, il est négatif dans le cas des contrefilets et pour les bilobes indiqués sous la forme « largeur en mm*nombre d'unités ». La longueur des rectangles pour chaque type de vis est proportionnelle à la longueur réelle dans le profil. Elle est soit de 100 cm (gris foncé), soit de 50 cm (gris clair). T2F, trapézoïdale double filet ; C2F, convoyage double filet ; CF2C, contrefilet à double filets conjugués ; BB, bilobes.

Tableau 2-1 : Conditions de température et pH suivant le profil pour le prétraitement alcalin de la paille de blé.

		A	B	C	D	E	F	G
T consigne	°C	-	-	130	130	100	50	50
T réelle		-	-	130	131	100	87	59
T filtrat							72	
T matière							74,3	
T extrudat								57
pH filtrat						6-7		
pH extrudat								6-7

Figure 2-3 : Conditions physico-chimiques générales au cours de l'étape de prétraitement alcalin.

Tableau 2-2 : Conditions physico-chimiques durant l'étape d'extrusion réactive alcaline.

Ratio S/L	%NaOH	%H ₃ PO ₄	Vitesse de vis	Débits			EMS
				Paille	Extrudat	Filtrat	
%	(%) g/g matière sèche		rpm	kg/h	kg/h	kg/h	W.h.kg ⁻¹
29,1	6,7	4,5	341	16,7	15,6	2,99	258

Les débits sont indiqués en kg de matière sèche par heure. EMS, énergie mécanique spécifique (M.3.2.)

L'intensité mesurée lors du procédé est de 17,4 A. C'est une valeur basse qui se traduit par une énergie mécanique spécifique relativement faible indiquant une faible contrainte mécanique appliquée à la matière.

2.1.1.2. Essorage de la biomasse

La biomasse issue du prétraitement en extrusion présente un taux d'humidité encore trop élevé (67,5%) pour tester des consistances élevées en bioextrusion. Une partie de cette humidité est mobilisable par centrifugation. Ce type d'extraction physique « douce » a été utilisé afin de limiter les modifications de la biomasse par séchage traditionnel. L'essorage est effectué à l'aide d'uneessoreuse centrifuge à bol ROUSSELET®. Les conditions utilisées sont résumées dans le Tableau 2-3.

Tableau 2-3 : Conditions expérimentales de centrifugation de la biomasse.

V_{rotation}	Pression	M_{S(initial)}	M_{S(finale)}
rpm	bar	%	%
2000	5	32,5%	38,8%

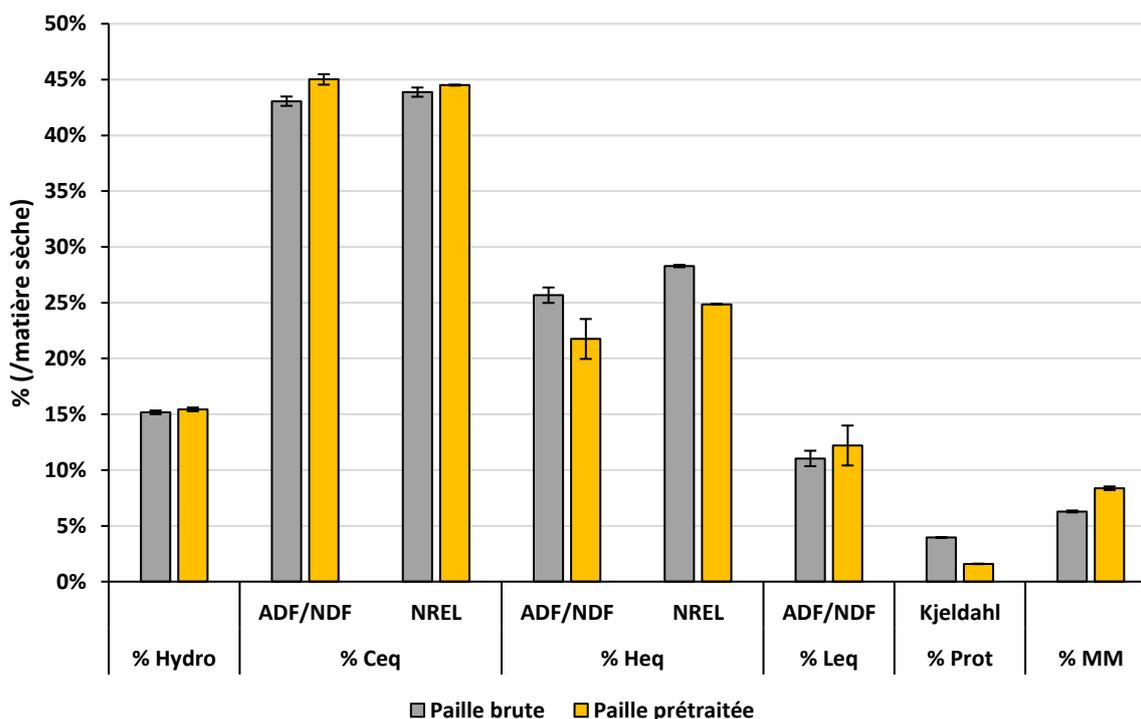
L'essoreuse est maintenue à vitesse constante, jusqu'à l'arrêt de l'écoulement du liquide issu de la biomasse (environ 30 min). Le bol de l'essoreuse ne permet d'accueillir qu'entre 3,5 et 4 kg maximum de paille de blé prétraitée. Afin d'obtenir une quantité de matière suffisante pour travailler en extrusion, la biomasse est séparée en plusieurs lots et l'étape est répétée en suivant les mêmes conditions.

2.1.2. Influence du prétraitement

2.1.2.1. Composition chimique des biomasses

Les compositions chimiques de la paille brute et de la paille prétraitée sont similaires (Graphique 2-1). On peut noter toutefois une faible diminution de la proportion en équivalents hémicelluloses et en protéines après prétraitement, ainsi qu'une très faible augmentation de la proportion en équivalents cellulose. L'augmentation de la teneur en matières minérales est cohérente avec l'ajout de sels lors du traitement alcalin et de la neutralisation. Les deux méthodes de dosage ADF/NDF et NREL (M.2.2.4. et M.2.2.5.) donnent des résultats similaires. C'est résultats sont cohérent avec d'autres prétraitements alcalins en conditions « douces » de résidus lignocellulosiques (Duque et al., 2014).

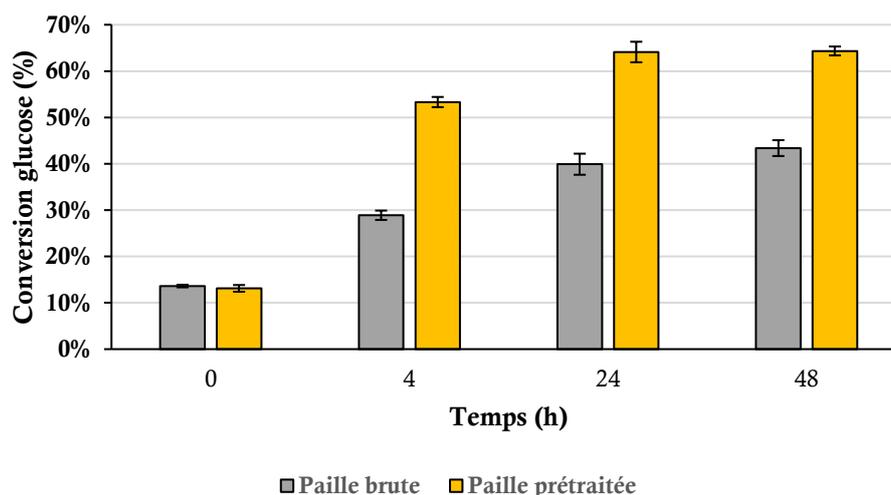
Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.



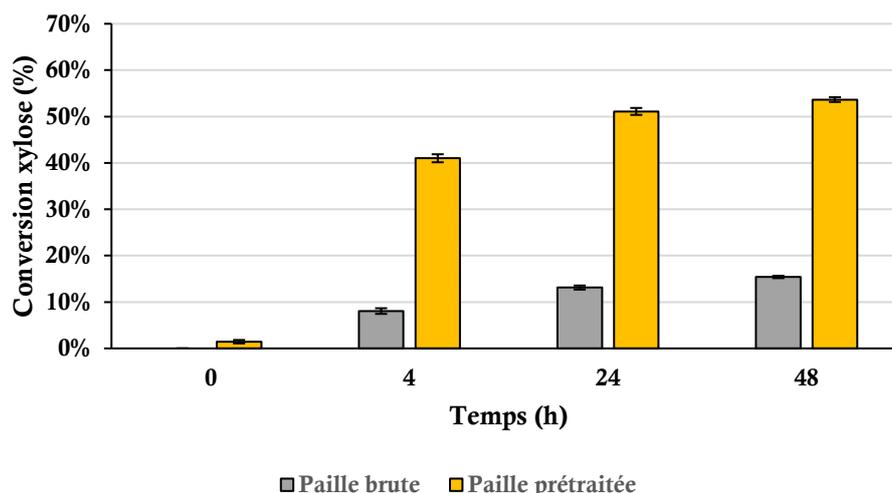
Graphique 2-1 : Composition chimique des biomasses, avant et après prétraitement. %Hydro, le pourcentage en hydrosolubles ; % Ceq, le pourcentage en équivalents cellulose ; % Heq, le pourcentage en équivalents hémicelluloses ; % Leq, le pourcentage en équivalents lignines ; % Prot, le pourcentage en protéines ; % MM, le pourcentage en matières minérales.

2.1.2.2. Hydrolysabilité

Si le prétraitement n'impacte que faiblement la composition chimique de la biomasse, les tests d'hydrolysabilité (M.2.3.2.) montrent eux une réelle différence de comportement des matières face à l'hydrolyse enzymatique (Graphiques 2-2 et 2-3).



Graphique 2-2 : Comparaison des taux de conversion en glucose de la paille brute et prétraitée après les tests d'hydrolysabilité



Graphique 2-3 : Comparaison des taux de conversion en xylose de la paille brute et prétraitée après les tests d'hydrolysabilité.

A partir de 4 h de réaction d'hydrolyse, la conversion du glucose est 1,8 fois plus élevée et celle du xylose plus de 4 fois. Cette différence diminue légèrement au bout de 48 h. À la fin de l'hydrolyse pour la paille prétraitée, la conversion du glucose est 1,5 fois plus élevée et celle du xylose près de 2,5 fois plus élevée (Graphique 2-3 et 2-3 et Tableau 2-4).

Tableau 2-4 : Différences relatives d'hydrolysabilité et vitesses de conversion initiales après prétraitement.

Ecart relatif				V _i de conversion	
conversion 4 h		conversion 48 h			
Glucose	Xylose	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose
%	%	%	%	%/h	%/h
0,8	4,1	0,5	2,5	67,9	242,9

La vitesse initiale de réaction est calculée comme le coefficient directeur de la droite entre les points de conversion à 0 h et 4 h. Les écarts relatifs sont obtenus en soustrayant les valeurs obtenues sans prétraitement aux valeurs obtenues après prétraitement.

L'hydrolyse est non seulement plus importante, mais aussi plus rapide. La vitesse initiale est jusqu'à 242,9 fois plus importante après prétraitement pour la conversion du xylose.

2.1.3. Conclusion

L'étape de prétraitement en conditions alcalines « douces » (sur le modèle du projet BABETHANOL) permet d'améliorer l'hydrolysabilité de la biomasse. Ce prétraitement est léger (non-optimisé) et a pour but de déconstruire en partie le ciment ligno-hémicellulosique. Le temps de séjour réduit ne permet qu'une faible solubilisation des hémicelluloses, les effets sur la composition chimique de la biomasse sont faibles, cependant cette étape de prétraitement permet une nette amélioration de l'efficacité de la catalyse enzymatique. Ces résultats conviennent à l'objectif fixé pour la matière de départ du projet. La réalisation d'un prétraitement réduit permet de concentrer l'étude sur l'hydrolyse enzymatique, en cherchant les conditions optimales pour limiter les besoins en prétraitement chimique.

2.2. Plan expérimental : Etude de l'influence des facteurs de consistance et de charge enzymatique

L'objectif principal de la bioextrusion est d'améliorer l'hydrolyse enzymatique pour des milieux à hautes consistances. Les différents résultats présentés dans la partie «1.3. Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: a review.» vont dans ce sens, ils démontrent une bonne initiation de la réaction enzymatique grâce à la bioextrusion. L'hydrolyse en milieu concentré en substrat permet de limiter la quantité d'eau utilisée, ainsi que les coûts liés à son retrait (distillation) (Lin and Tanaka, 2006). Cependant, la concentration en solide est couramment associée à une baisse de l'efficacité hydrolytique. Celle-ci est associée à une moins bonne efficacité de l'agitation, un contact réduit entre les enzymes et les substrats, une augmentation des adsorptions non-spécifiques (particulièrement par la lignine), une perte d'activité enzymatique due aux forces de cisaillement plus élevées (Ramachandriya et al., 2013). Une concentration de produits de réaction inhibiteurs tels que des sucres et des acides organiques (acides acétique et phénoliques), ainsi qu'un problème majeur de transfert de masse sont aussi décrits comme responsables de la diminution du rendement (Hodge et al., 2008; Kim et al., 2008). En outre, l'augmentation de la charge enzymatique souvent utilisée pour pallier ces limites a elle-même ses inconvénients. Les plus couramment décrits sont la compétition accrue pour les sites accessibles du substrat ainsi que la gêne stérique entre enzymes due à la proximité des sites accessibles (appelée « enzyme jamming ») (Várnai et al., 2013; Xiao et al., 2004a).

A l'issue de la revue de littérature sur les différentes expériences de bioextrusion, la technique statistique des plans d'expériences ressort comme indispensable à la compréhension des mécanismes complexes mis en jeu au cours du procédé. Presque tous les exemples de bioextrusion d'amidon mettent en avant l'utilisation de cette méthode. Deux facteurs, en particulier, sont soulignés comme étant déterminants dans l'efficacité de déconstruction enzymatique de la biomasse :

- Le ratio S/L (ou consistance)
- La charge enzymatique

L'un des intérêts de l'extrusion est la grande flexibilité au niveau des entrées liquides. Ces facteurs peuvent donc être facilement modulés par la modification des débits d'injection liquide.

2.2.1. Définition du domaine d'expérimentation

2.2.1.1. Ratio S/L (S)

Des tests préliminaires ont permis de définir le domaine d'expérimentation. La limite basse est fixée à 5%. D'une part c'est dans ces conditions que sont réalisées la plupart des hydrolyses enzymatiques en batch, et d'autre part, c'est expérimentalement la limite de fonctionnement en régime stable avec l'extrudeuse. En effet, à partir de cette valeur, la grande quantité de liquide injectée au début de l'extrusion fini par remonter le long des vis et noyer l'entrée d'alimentation. Une valeur haute de 40% a été fixée. Celle-ci correspond à des résultats préliminaires du projet BABETHANOL ainsi qu'à une contrainte pratique associée à la teneur en humidité de la matière première issu du prétraitement alcalin en extrusion après essorage (environ 60%).

2.2.1.2. Charge enzymatique (E)

Pour la charge enzymatique, nous avons suivi les conseils techniques de Novozymes. La borne basse est indiquée à 1,5% (g d'enzyme/g cellulose) et la borne haute à 30%. La valeur basse est considérée comme la bonne valeur de faisabilité commerciale tandis que la haute est donnée en tant qu'indicateur du maximum cellulosique accessible aux enzymes (Novozymes A/S).

Un plan d'expérience de type surface de réponse (Doehlert, M.3.3.) est mis en place à partir des facteurs et du domaine d'expérimentation définis. La répartition des points expérimentaux pour deux facteurs se fait suivant les sommets d'un hexagone régulier, avec un point central (Fig. 2-4). La répartition régulière des points expérimentaux permet notamment une extension assez simple du plan d'expériences. Le modèle mathématique postulé utilisé avec les plans pour surfaces de réponse est un modèle du second degré avec interactions d'ordre 2. L'équation suivante décrit ce modèle pour deux facteurs.

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2$$

La variable x_1 est associée au facteur de ratio S/L et la variable x_2 à la charge enzymatique.

y la valeur de la réponse du modèle

x_i le niveau attribué au facteur i

a_0 la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude

a_i l'effet (ou effet principal) du facteur i

a_{ij} l'interaction entre les facteurs i et j

Dans ce cas d'étude, a_1 indique donc l'effet du facteur S (ratio S/L) et a_2 l'effet du facteur E (charge enzymatique).

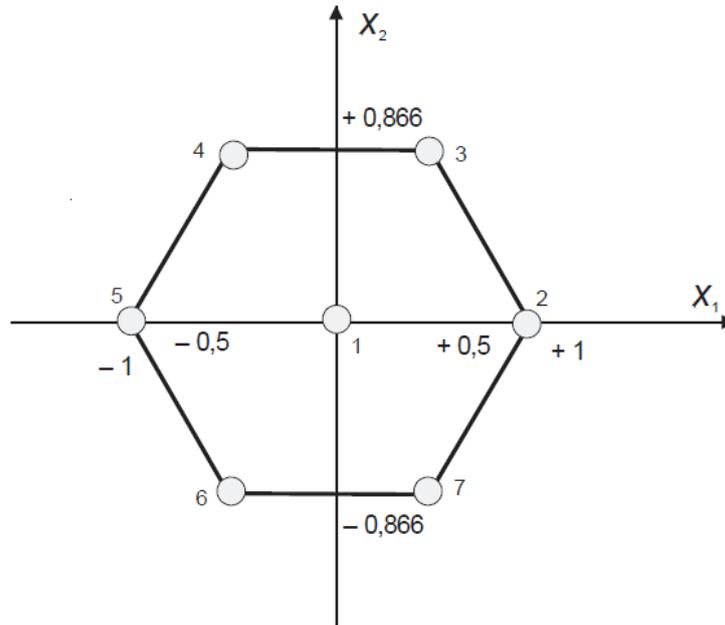


Figure 2-4 : Plan de Doehlert pour l'étude de deux facteurs.

Dans un premier temps, le plan d'expérience est réalisé à partir de milieux réactionnels tous passés en bioextrusion préalable. Les conditions de charge enzymatique et ratio S/L sont fixés lors de cette étape. Les extrudats récoltés à la sortie de l'extrudeur sont ensuite introduits dans des réacteurs fermés avec agitation (Fig. 2-5). Toutes les conditions sont réalisées suivant une cinétique de 48 h. Des mesures sont faites aux points 0,25 h (après bioextrusion et prélèvement), 4 h, 10 h, 24 h et 48 h. Un plan d'expérience différent est obtenu pour chaque point de cinétique. Le premier objectif de ce plan d'expérience est d'**analyser l'influence des deux facteurs sur l'hydrolyse enzymatique qui suit la bioextrusion.**

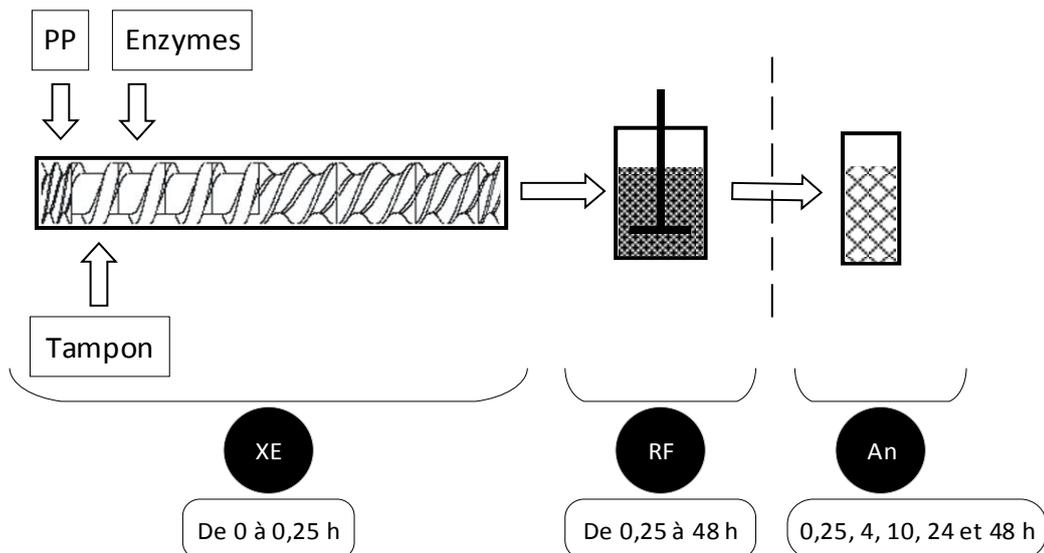


Figure 2-5 : Représentation schématique du protocole expérimental de bioextrusion. XE, étape de bioextrusion ; RF, étape d'hydrolyse successive en réacteur fermé et agité ; An, étape analytique sur un prélèvement du milieu réactionnel dilué à 5% (m/m matière sèche) ; PP, la paille de blé prétraitée.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

Le facteur temps n'a pas été intégré dans le plan de Doehlert comme un troisième facteur pour des raisons statistiques. D'une part l'aspect logarithmique d'une cinétique d'hydrolyse est en général mal représenté par un modèle du second degré, d'autre part, la réalisation d'un plan d'expérience à chaque point cinétique permet d'obtenir plus d'informations.

2.2.2. Conditions de bioextrusion

2.2.2.1. Cocktail enzymatique

Les caractéristiques du cocktail enzymatique Cellic Ctec 2 (M.1.4.) sont présentées dans le Tableau 2-5 et les activités enzymatiques dans le Tableau 2-6.

Tableau 2-5 : Caractéristiques du cocktail enzymatique Cellic ctec 2

Caractéristiques	MS ¹	Densité	Protéines ²	Glucose ³	Cellobiose ³	pH conseillé	Température conseillé
Unité	%		mg/mL	g/L	g/L		°C
Cellic ctec 2	56,13	1,18	276,7	22,23	0,85	4,8 à 6	50

¹ Matière sèche mesurée selon la norme française NF V 03-903 (M.2.2.1.)

² Dosage des protéines réalisé avec le kit de dosage micro Lowry, Peterson's modification de Sigma-Aldrich®

³ Dosés par HPLC (M.2.1.2.)

Tableau 2-6 : Activités enzymatiques mesurées du cocktail Cellic Ctec2 utilisé (M.2.3.1.).

	Cellulases	Endocellulases	Exocellulases	β -glucosidase	Xylanases
Unité	FPU/mL	CMCU/mL	AVCU/mL	CBU/mL	EXU/mL
Cellic Ctec2	123,30	3538,01	199,04	141,20	14098,89

Les activités des cellulases et hémicellulases sont mesurées selon (Ghose, 1987) pour un pH de 5,5 et une température de 50°C.

La présence de monosaccharides est probablement liée au procédé de production des enzymes par Novozymes. Ceux-ci devront être pris en compte dans les bilans de production. La matière sèche, la densité et la concentration en protéines permettent d'effectuer par la suite les calculs de charge enzymatique.

2.1.1.1. Bioextrusion

L'étape de bioextrusion est réalisée à l'aide d'une extrudeuse bi-vis Clextral® EV 25® (M.1.5.). Elle est équipée de 10 modules de 100 mm chauffés individuellement par des colliers chauffants et refroidis par circulation d'eau. Les conditions d'extrusion sont représentées schématiquement sur la Fig. 2-6. Le profil de vis est une alternance de zones de convoyage séparées par des zones de mélange. L'objectif étant de favoriser un mélange dispersif et distributif pour imprégner le substrat avec les biocatalyseurs. Les zones de convoyage, sans contraintes sont dites « réactives » pour permettre l'initiation de l'hydrolyse enzymatique. Ces profils avec peu de contraintes sont caractéristiques de la bioextrusion (Gatt et al., 2018). L'injection du tampon est faite après le premier motif de mélange qui sert de zone de rétention, afin de limiter la remontée liquide dans le cas de débits importants. Les liquides sont injectés à l'aide de pompes à piston. La vitesse de rotation des vis est fixée à 150 rpm.

2.1.1.1. Prélèvement en conditions stables :

Plusieurs points expérimentaux (maximum 6) sont obtenus lors de la même campagne d'extrusion. Les conditions de charge enzymatique et de ratio S/L sont modifiées entre chaque point et les répliques sont toujours séparés d'au moins un point avec des conditions expérimentales différentes. Les prélèvements sont toujours effectués en conditions stables. Un temps de stabilisation d'au moins 15 min est laissé entre chaque nouvelle condition. Avant chaque prélèvement, un bilan des différents débits d'entrée avec le débit de sortie est réalisé afin de valider l'état stable du procédé. Le bilan est considéré valide pour des variations inférieures ou égales à 5%. L'échantillon utilisé pour la suite de l'hydrolyse en conditions fermées est un mélange homogène de trois productions de 3 min chacune pour lesquelles les débits sont validés.

2.1.1.2. Hydrolyse enzymatique en réacteurs fermés.

L'hydrolyse enzymatique est poursuivie à la sortie de l'extrusion par des conditions en réacteur fermé (Fig. 2-5). Les bioextrudats sont transférés dans des ballons tricol de 250 mL équipés d'un tube réfrigérant. Un système Tornado® de type Carousel 6 Plus System est équipé simultanément de 6 de ces ballons. La température est maintenue à 50°C par des plaques chauffantes et l'agitation (50 rpm) est assurée par des pâles mécaniques en silicone.

2.1.1.3. Préparation des échantillons pour les analyses.

Pour chaque point de cinétique, le milieu est bien homogénéisé avant d'effectuer un prélèvement de quelques grammes dans un tube de 50 mL (Fig. 2-5). La réaction enzymatique est stoppée en immergeant le tube dans l'eau bouillante pendant 5 min. Le tube est ensuite transféré dans un bain de glace pour créer un choc thermique et refroidir l'échantillon pendant 5 min. Les tubes sont équilibrés à 5% de matière sèche avant d'être centrifugés à 10 000g et 4°C pendant 5 min. La fraction liquide est récupérée afin d'analyser les composés solubles (M.2.1.1.).

2.2.3. Résultats et discussions du plan d'expérience en bioextrusion

2.2.3.1. Conditions expérimentales

2.2.3.1.1. Extrudats

Les bornes du domaine de définition (Tableau 2-7) sont adaptées afin de respecter le domaine expérimental défini précédemment « Définition du domaine d'expérimentation » et de permettre la meilleure répartition possible des points dans le domaine.

Ces valeurs de facteurs réelles, mesurées expérimentalement, sont rassemblées dans le Tableau 2-8. Leurs correspondances théoriques (x_1 et x_2) sont calculées à partir des valeurs du domaine de définition du plan d'expérience (Tableau 2-7).

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

Tableau 2-7 : Domaine de définition théorique du plan d'expérience adapté aux conditions expérimentales.

Facteurs	S	E
	%	%
Limite haute	42%	25%
Limite basse	2,5%	2,3%
Pas	19,8%	11,4%
A₀	22,3%	13,6%

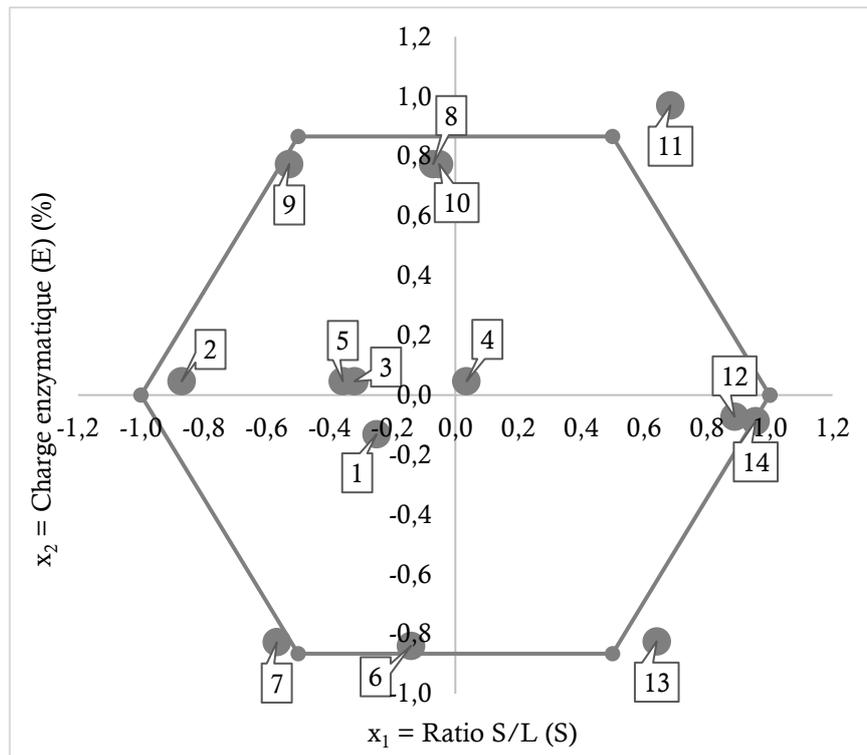
S, ratio S/L ; E, charge enzymatique. La charge enzymatique est exprimée en g de protéines par 100 g de cellulose. Pas et A₀ sont les valeurs théoriques utilisées pour obtenir des coordonnées centrées réduites telles que $x = \frac{A-A_0}{Pas}$.

Tableau 2-8 : Valeurs expérimentales des variables indépendantes ratio S/L (S) et charge enzymatique (E), et valeurs codées correspondantes.

	S	E*	x ₁	x ₂
	%	%	Valeurs codées	Valeurs codées
1	17,3%	12,1	-0,25	-0,13
2	5,1%	15,0	-0,87	0,05
3	15,9%	14,1	-0,32	0,05
4	23,0%	14,1	0,04	0,05
5	15,2%	14,1	-0,36	0,05
6	19,5%	4,1	-0,14	-0,84
7	11,0%	4,2	-0,57	-0,83
8	20,9%	22,4	-0,07	0,77
9	11,8%	22,4	-0,53	0,77
10	21,2%	22,4	-0,05	0,77
11	35,8%	24,7	0,68	0,97
12	39,8%	12,8	0,89	-0,07
13	34,9%	4,2	0,64	-0,82
14	41,1%	12,6	0,96	-0,09

La charge enzymatique (E) est exprimée en en g de protéines par 100 g de cellulose.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.



Graphique 2-4 : Représentation Graphique de la répartition des conditions expérimentales dans le domaine de définition.

Le Graphique 2-4 représente la répartition des points du plan d'expérience suivant leurs conditions expérimentales de charge enzymatique et ratio S/L. les valeurs codées permettent de positionner les points expérimentaux sur le Graphique (Tableau 2-8). Les points 3 et 5, 8 et 10 ainsi que 12 et 14 sont considérés comme des réplicas.

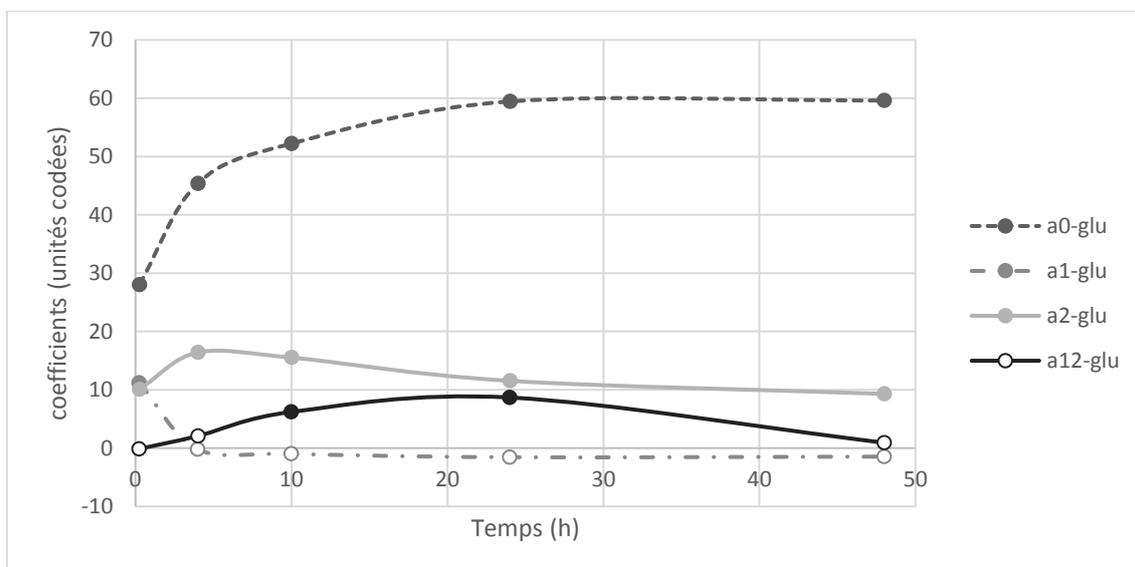
Tous les modèles présentés lors des résultats ont été validés par un test de Fisher à 5%. La corrélation entre les données expérimentales et le modèle est indiquée par le coefficient de détermination (R^2).

Il est à noter que l'intensité électrique du moteur est mesurée autour de 7 A pour toutes les expériences de bioextrusion réalisées. L'énergie mécanique spécifique associée oscille entre 170 et 240 W.h.kg⁻¹.

2.2.3.2. Influence des facteurs sur la production et la conversion des sucres après bioextrusion.

2.2.3.2.1. Taux de conversion du glucose après bioextrusion

Le détail du calcul des taux de conversion est présenté en M.2.1.2.. L'évolution des coefficients du modèle au cours du temps donne des informations quant à l'évolution de l'influence des différents facteurs durant la cinétique (Graphique 2-5). Dans le cas du glucose, une très faible influence négative non significative du ratio S/L est visible au cours de la cinétique. Ce coefficient n'est d'ailleurs significatif et positif qu'à la sortie d'extrusion. Le facteur ayant le plus d'influence est la charge enzymatique, le coefficient a_2 augmente jusqu'à 4 h puis diminue ensuite jusqu'à 48 h. Sa valeur est toujours positive, indiquant qu'une augmentation de la concentration en enzymes provoque une augmentation de la conversion en glucose. Néanmoins, l'écart en valeur absolue entre a_0 et a_2 augmente fortement dès 4 h. Cela implique que l'influence relative de a_2 par rapport à a_0 diminue dès le début de réaction en réacteur fermé. Il est à noter que le coefficient a_{12} , associé à l'influence de l'interaction entre les deux facteurs du modèle, est toujours positif mais n'est significatif que pour les modèles à 10 et 24 h.



Graphique 2-5 : coefficients des modèles de surfaces de réponse pour le taux de conversion du glucose en fonction du temps. Les points pleins sont au moins significatifs à 0.05% ; les points vides sont non significatifs.

L'observation des différentes surfaces de réponse (Graphiques 2-6a, b, c, d et e), en forme de parabolöide elliptique, confirme la prédominance du facteur E observée au niveau des coefficients. La zone maximale de conversion initialement située pour des ratios S/L entre 20 et 40% et des charges enzymatiques supérieures à 12% en sortie d'extrusion (Graphique 2-6a). Dès 4 h, cette zone se resserre en termes de charge enzymatique entre 12-13 et 22% (Graphique 2-6b). Le maximum de conversion ne correspond donc plus avec la concentration enzymatique maximale, ce qui est à relier avec une diminution de l'influence relative de a_2 sur le modèle (Graphique 2-5). À partir de ce point cinétique, un ratio S/L supérieur à 35% est aussi associé à une conversion plus faible, ce qui est à relier avec un coefficient a_1 devenu négatif (Graphique 2-5). Au cours de la cinétique, la zone optimale s'étend progressivement vers des

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

milieux plus dilués. En fin de cinétique, la borne basse de l'optimum est autour de 8 % de ratio S/L, proche de la limite basse (Graphique 2-6e).

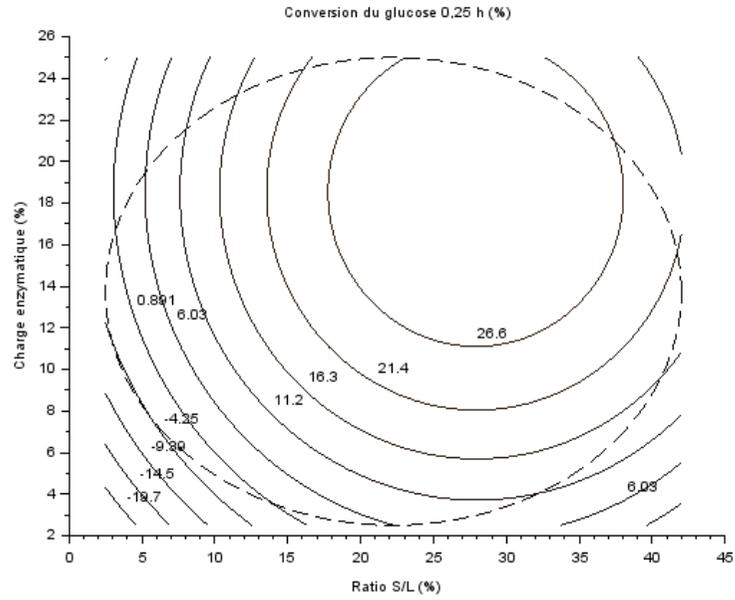
Après 48 h d'hydrolyse, l'optimum se situe donc entre 8 et 35% de ratio S/L entre 12 et 22% de charge enzymatique, avec une valeur de conversion du glucose de 57,8%. Le minimum de conversion est quant à lui situé au niveau des plus faibles charges enzymatiques avec une tendance pour milieux dilués en sortie d'extrusion (0,25 h), puis progressivement sans distinction de ratio S/L à partir de 4 h. Au bout de 48 h, le minimum de conversion en glucose d'après le modèle est de 32,1% (Graphique 2-6e).

La conversion des sucres durant la bioextrusion se distingue du reste de la cinétique en réacteur fermé par une influence positive du ratio S/L. Celle-ci est à relier aux meilleures conditions de conversion obtenues pour de hautes consistances en sortie d'extrusion. En ce qui concerne les conditions en réacteur fermé, la conversion du glucose dépend principalement de la charge enzymatique. Une influence positive de l'interaction entre charge enzymatique et ratio S/L est par ailleurs mesurée. Il est aussi à noter qu'à partir de 4 h, le maximum en termes de conversion est différent du maximum en termes de concentration en enzymes. Il est donc inutile de travailler avec des charges enzymatique si élevées. D'une part elles ne permettent pas une viabilité économique du procédé (Novozymes A/S), de l'autre elles ne permettent plus d'amélioration de la conversion du glucose. Ce phénomène pourrait s'expliquer par un effet d'inhibition de la synergie entre endo et exocellulases observées à partir d'un certain niveau de saturation en enzymes dans le milieu (Zhang and Lynd, 2004a).

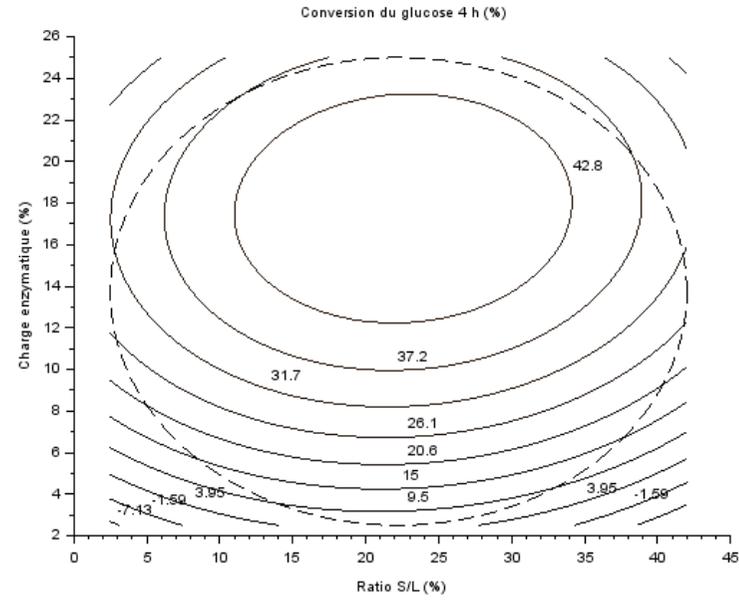
Alors que plusieurs publications montrent une diminution liée à l'augmentation de la charge solide (Du et al., 2017; Jørgensen et al., 2007), elle est minime dans ce cas d'étude. Ces bons résultats obtenus avec l'étape de bioextrusion peuvent être attribués à de bonnes conditions de mélange qui pourraient notamment augmenter la possibilité de rencontre entre enzymes et substrats.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

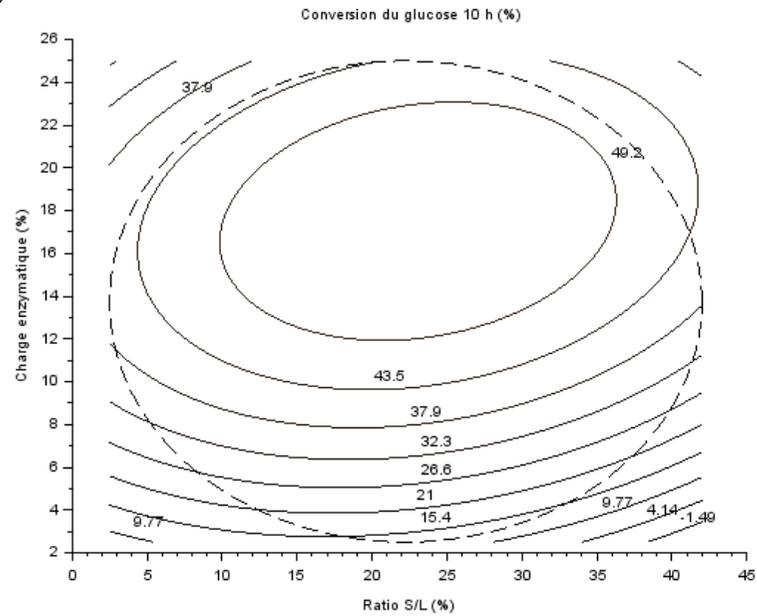
(e)



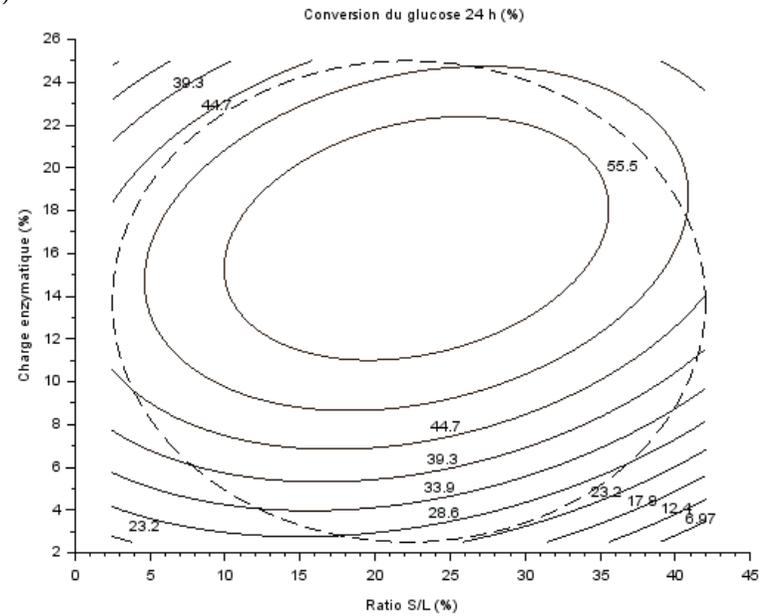
(b)

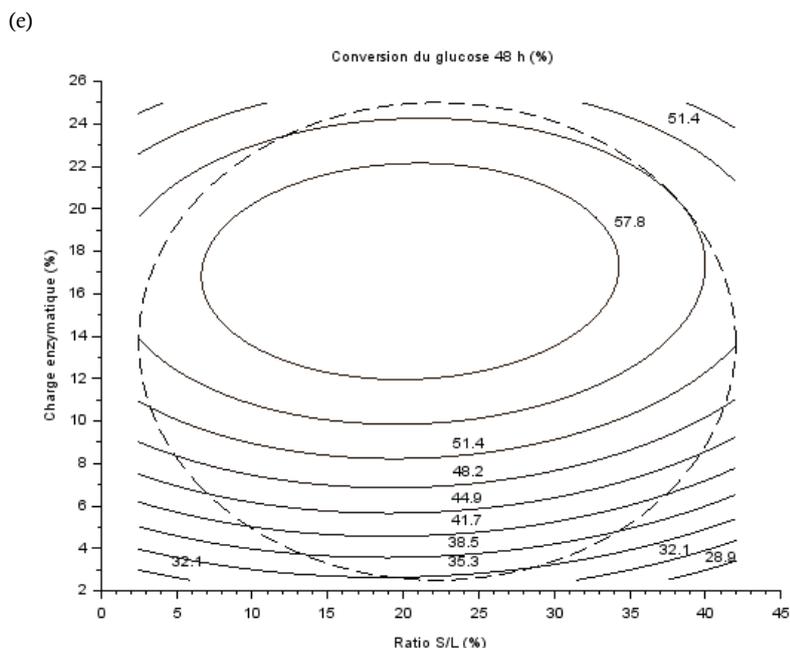


(c)



(d)

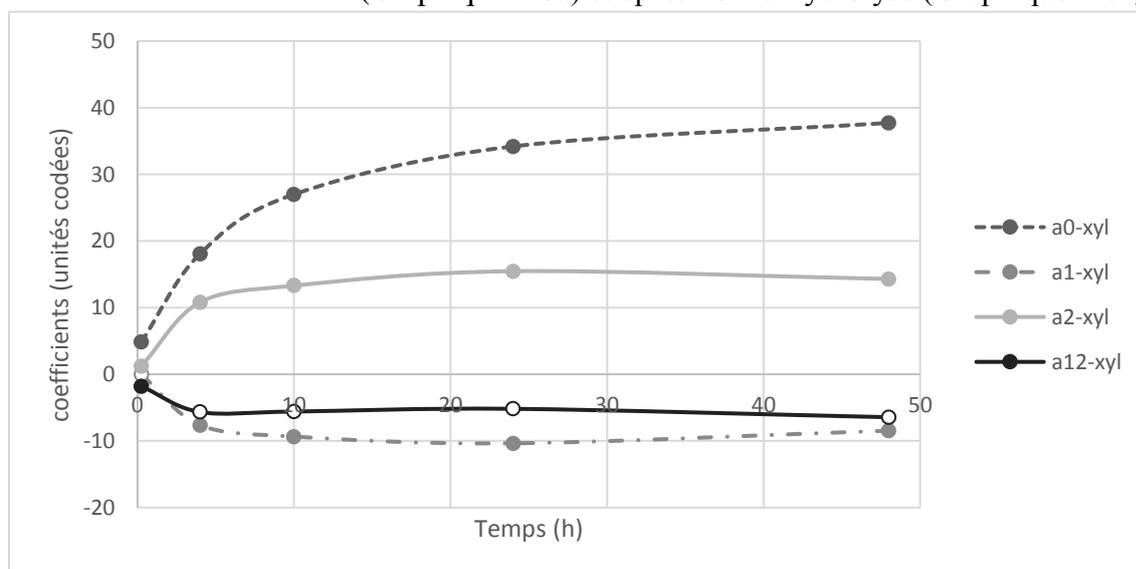




Graphique 2-6 : Surfaces de réponse obtenues pour les taux de conversion du glucose à partir des plans d'expériences à 0,25 h (a), 4 h (b), 10 h (c), 24 h (d), 48 h (e). Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

2.2.3.2.2. Taux de conversion du xylose après bioextrusion

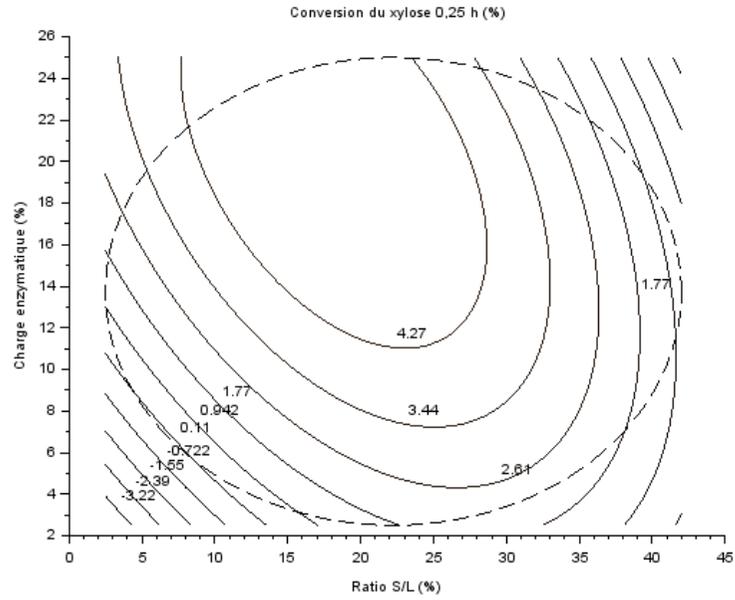
Le taux de conversion du xylose nous renseigne sur la dégradation des chaînes principales des polymères hémicellulosiques. L'influence du ratio S/L et de la charge enzymatique est décrite, au cours du temps, par les coefficients des modèles à deux facteurs sur le Graphique 2-7. Là encore, le cas en sortie d'extrusion apparaît nettement différent du reste de la cinétique. À 0,25 h, tous les coefficients sont faibles et le coefficient a_1 est non significatif. Le coefficient a_{12} est quant à lui négatif et significatif. Celui-ci indique, durant cette étape de mélange intense, une interaction entre les facteurs qui a pour effet de diminuer l'efficacité de l'hydrolyse. Ces résultats sont traduits par une nette différence entre les surfaces de réponse à la sortie de la bioextrusion (Graphique 2-8a) et après 48 h d'hydrolyse (Graphique 2-8e).



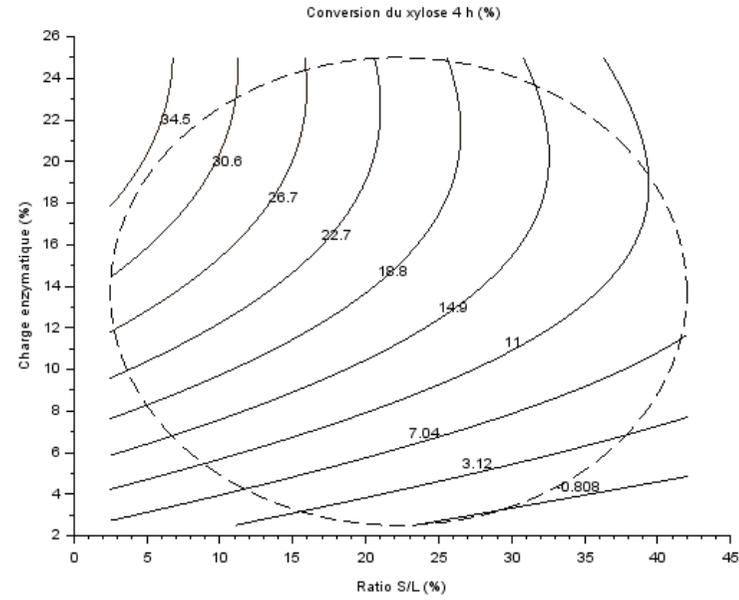
Graphique 2-7 : coefficients des modèles de surfaces de réponse pour le taux de conversion du xylose en fonction du temps. Les points pleins sont au moins significatifs à 0.05% ; les points vides sont non significatifs.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

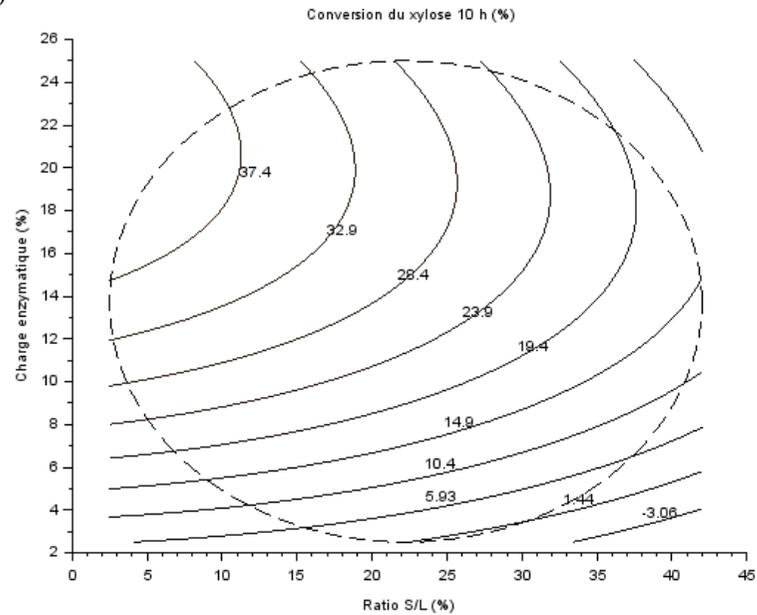
(a)



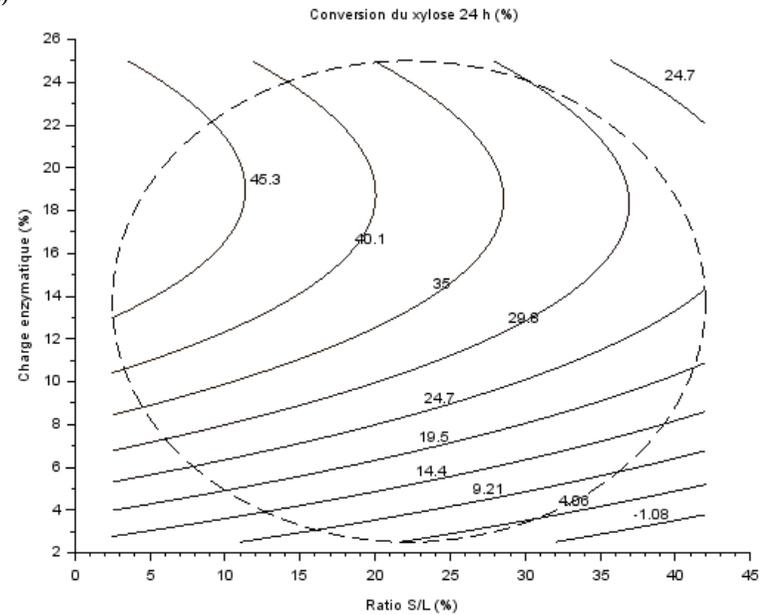
(b)



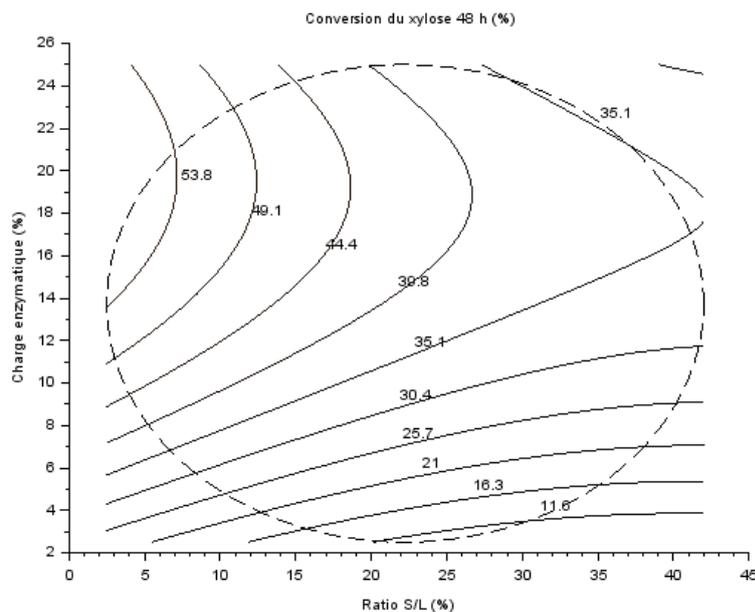
(c)



(d)



(e)

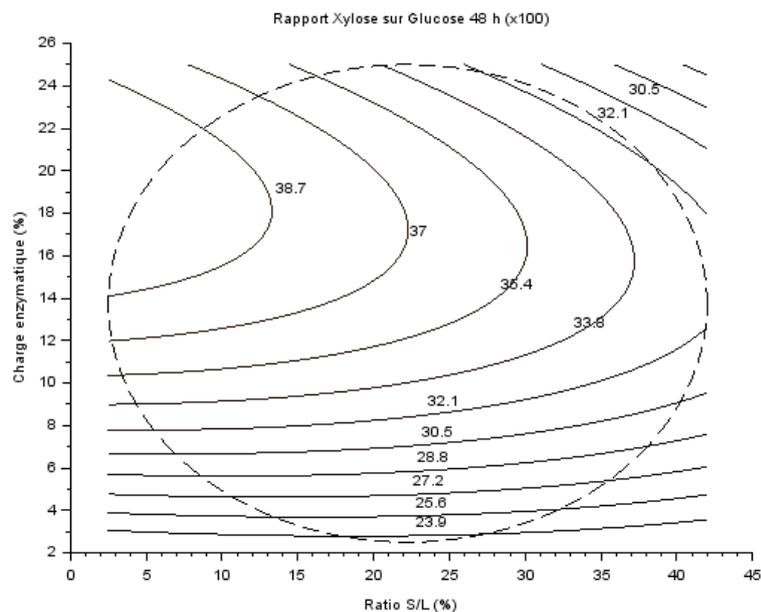


Graphique 2-8 : Surfaces de réponse obtenues pour les taux de conversion du xylose à partir des plans d'expériences à 0,25 h (a), 4 h (b), 10 h (c), 24 h (d), 48 h (e). Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

Pour le reste de la cinétique, c'est le coefficient a_2 qui est le plus élevé et traduit une influence majeure de la charge enzymatique. Ces valeurs sont, relativement au coefficient a_0 , plus élevées pour le xylose que pour le glucose. Par ailleurs, la valeur du coefficient a_2 augmente jusqu'à 24 h alors qu'elle diminue dès 4 h pour le glucose. L'influence négative et significative du ratio S/L est nettement plus importante que pour le glucose. Cette valeur reste stable de 4 à 48 h. L'écart en termes de valeurs absolues entre les coefficients a_1 et a_2 est faible jusqu'à 4 h. Cela traduit une influence similaire des deux facteurs sur la conversion. À partir de 10 h l'écart se creuse en faveur de la charge enzymatique.

2.2.3.2.3. Comparaison C6/C5

La conversion du glucose et celle du xylose sont nettement différentes. Si l'on recoupe les surfaces de réponse, il apparaît que certaines zones permettent une bonne conversion du glucose tout en limitant celle du xylose. La surface de réponse présentée en Graphique 2-9 est obtenue par le calcul du ratio quantité de xylose sur celle de glucose calculées en mg dans le milieu (exprimé en pourcents). Celle-ci permet une approche visuelle montrant qu'en travaillant avec des charges enzymatiques supérieures à 12% et des ratios S/L supérieurs à 13%, le taux de xylose par rapport au glucose diminue. Premièrement, cela implique une valorisation globale de la biomasse moins importante. Or l'utilisation des pentoses dans le procédé de production de bioéthanol apparaît comme essentiel pour la rentabilité économique du procédé (Radhika et al., 2011; Sassner et al., 2008). D'autre part, cela privilégie la production de C6 sur celle de C5 qui sont plus simples à utiliser et permettent de meilleurs rendements en terme de production d'éthanol (du Preez et al., 1986; Radhika et al., 2011). En outre, la concentration enzymatique influence nettement ce rapport entre xylose et glucose, en deçà de 12%. Cela confirme une influence plus importante de la concentration enzymatique pour la conversion du xylose que pour celle du glucose déjà observée pour les taux de conversion.



Graphique 2-9 : Surface de réponse obtenue à partir du plan d'expérience à 48 h. Elle représente le rapport entre quantité de xylose et quantité de glucose produites dans le milieu réactionnel. Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

Comme pour le glucose, un comportement différent est observable en sortie d'extrusion par rapport au reste de la cinétique. L'étape de bioextrusion semble limiter l'influence négative du ratio S/L.

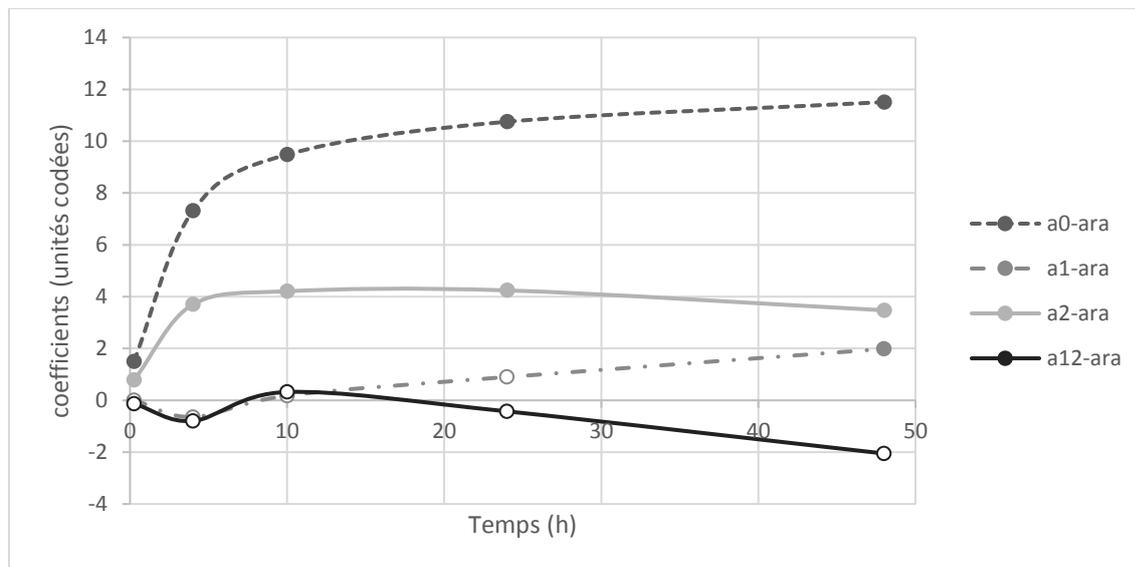
Pour le reste de la cinétique, en termes de conversion du xylose, les deux facteurs présentent une influence forte tout au long de la cinétique. Le maximum de conversion se trouve toujours pour des milieux dilués et des concentrations enzymatiques élevées. L'hydrolyse des hémicelluloses dépend par ailleurs plus de la charge enzymatique que celle de la cellulose. Cela s'explique en partie par la dominante cellulolytique du cocktail qui a pour objectif la dégradation de la cellulose plus que celle des hémicelluloses. La charge enzymatique est d'ailleurs calculée d'après la quantité de cellulose et non d'hémicelluloses. Néanmoins, la comparaison entre glucose et xylose (Graphique 2-9) montre que certaines conditions sont moins favorables à la valorisation des pentoses.

2.2.3.2.4. Taux de conversion de l'arabinose après bioextrusion

Le taux de conversion de l'arabinose nous renseigne aussi sur l'hydrolyse des ramifications des polymères d'hémicelluloses. L'influence du ratio S/L et de la charge enzymatique est décrite, au cours du temps, par les coefficients des modèles à deux facteurs sur le Graphique 2-10.

Comme pour le xylose, c'est le coefficient a_2 qui prédomine sur les modèles liés aux taux de conversion. Le coefficient a_1 quant à lui traduit une influence très faible du ratio S/L.

Celui-ci n'est significatif qu'en fin de cinétique où sa valeur est positive, contrairement à tous les autres sucres.



Graphique 2-10 : Coefficients des modèles de surfaces de réponse pour le taux de conversion de l'arabinose en fonction du temps. Les points pleins sont au moins significatifs à 0.05% ; les points vides sont non significatifs.

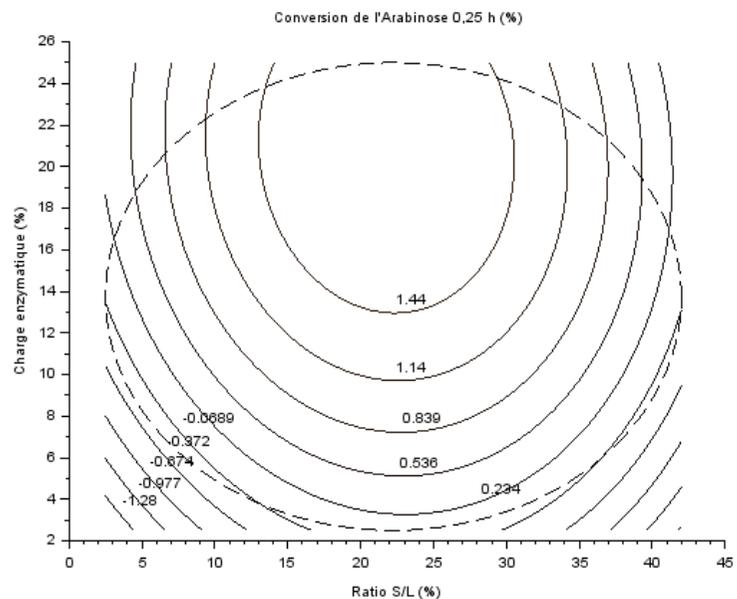
La surface de réponse à la sortie de l'extrudeur est similaire à celle du xylose (Graphiques 2-11a et 2-8a). Ce résultat pourrait être associé à l'interdépendance en termes de substrat. L'hydrolyse du xylose rendrait l'arabinose plus disponible facilitant ainsi son hydrolyse.

Dans l'ensemble, les surfaces de réponse de conversion de l'arabinose aux différents points cinétiques sont similaires (Graphiques 2-11a, b, c, d et e). Elles sont par ailleurs semblables à celles du glucose de par la nette prédominance du facteur E. La zone optimale se situe au niveau des fortes charges enzymatiques. Celle-ci s'étend sur un domaine de ratios S/L plus élevé au cours du temps. La zone optimale à 48 h se situe pour des charges enzymatiques entre 12 et 24% et des ratios S/L entre 15 et 38% (Graphique 2-11e). La zone minimale est quant à elle située au niveau des faibles charges enzymatiques durant toute la cinétique. À 48 h, le minimum de conversion est de 1,5% et le maximum de 10,7% suivant le modèle calculé (Graphique 2-11e).

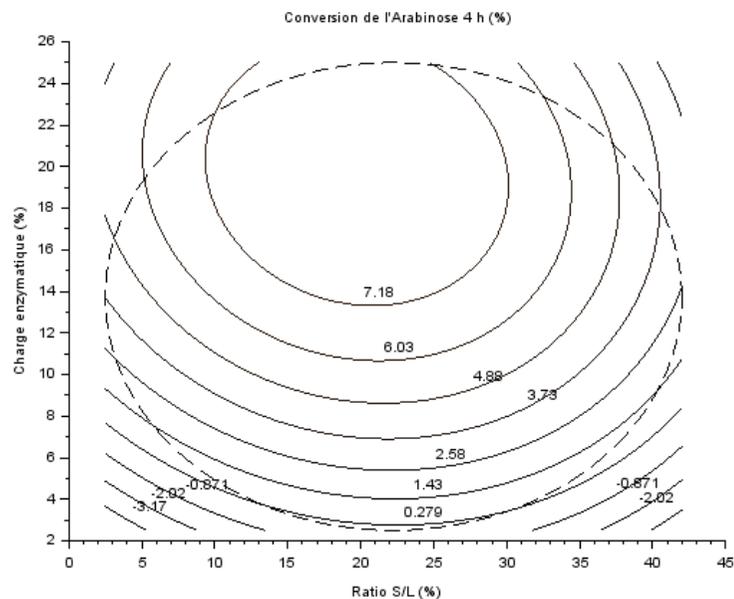
Il est à noter qu'aucune présence d'arabinose n'est observable à aucun point de la cinétique pour le point d'expérience numéro 7 (S = 11%, E = 4,2%)

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

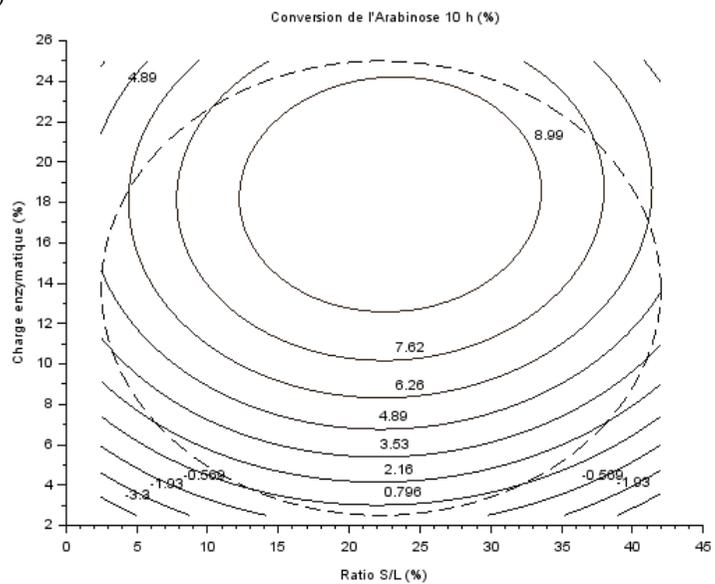
(a)



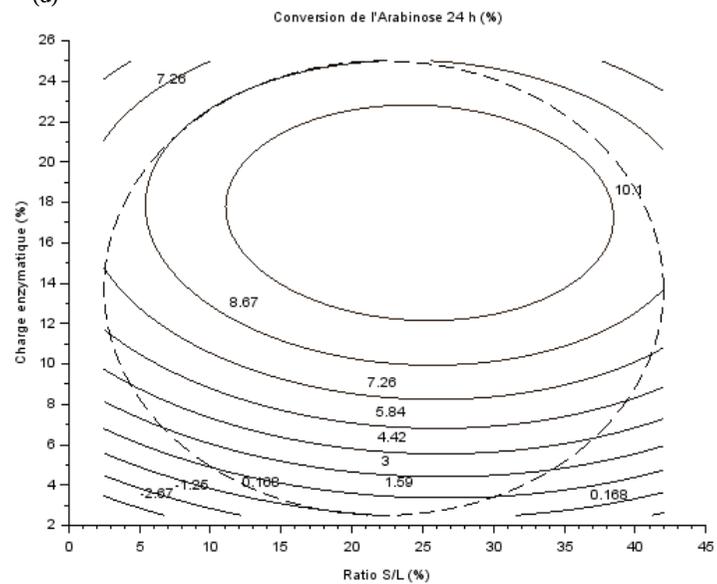
(b)



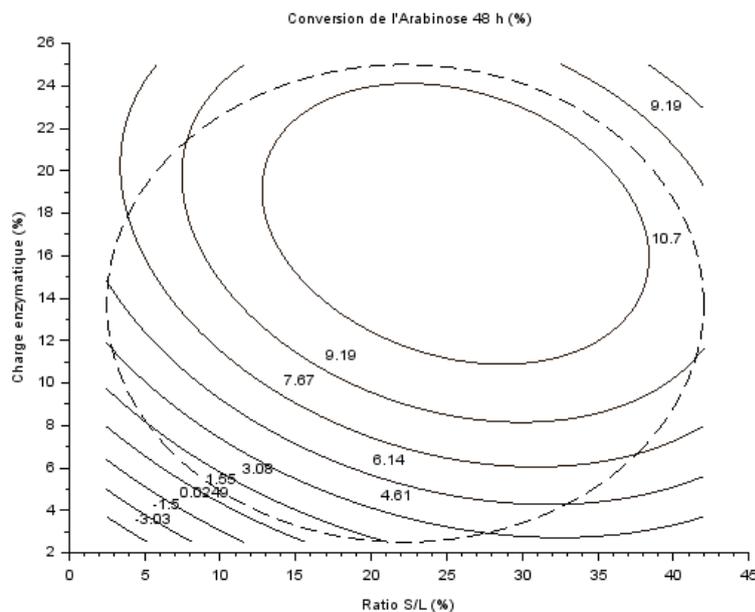
(c)



(d)



(e)



Graphique 2-11 : Surfaces de réponse obtenues pour les taux de conversion de l'arabinose à partir des plans d'expériences à 0,25 h (a), 4 h (b), 10 h (c), 24 h (d) et 48 h (e). Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

2.2.3.2.5. Imperfection des calculs de conversion

Les valeurs de conversion obtenues à $t = 0$ h pour le plan d'expérience sans bioextrusion préalable sont utilisées pour corriger les valeurs de conversion obtenues après bioextrusion. L'intérêt principal est de pouvoir prendre en compte l'ensemble des contributions (cocktail enzymatique et biomasse) dans toutes les conditions réelles d'expérimentation. Cependant, les enzymes n'ayant pas été préalablement désactivées, il est possible qu'un faible taux de conversion lié à l'hydrolyse soit pris en compte. En effet, certaines réactions d'hydrolyse secondaire sont décrites comme rapides (Zhang and Lynd, 2004a). Néanmoins, les conditions de températures ambiante durant le prélèvement, ainsi que la durée totale jusqu'à inactivation d'environ 5 min permettent de penser que cette interaction est limitée.

2.2.3.2.6. Conclusion

L'ensemble des résultats de conversion observés permettent plusieurs conclusions sur l'étape de bioextrusion ainsi que sur les différences de conversion entre les sucres.

Les taux de conversion positifs observés à la sortie de l'étape de bioextrusion confirment bien l'existence d'une activité enzymatique en extrusion comme observé par Duque et al., 2014 et Vandebossche et al., 2015. Des différences notables entre les modèles et surfaces de réponse à la sortie de la bioextrusion par rapport au reste de la cinétique sont observées. Cela indique un comportement hydrolytique différent en extrusion. Cette différence se fait notamment en limitant l'influence du ratio S/L pour le xylose, ou en la rendant positive pour le glucose.

Les taux de conversion en réacteurs fermés sont principalement influencés par la charge enzymatique. La conversion du xylose dans ces conditions se distingue par une nette influence négative du ratio S/L.

Les maxima de conversion du glucose (57,8%) et du xylose (53,8%) sont comparables après 48 h. Dans le cas de l'arabinose, le maximum observé est plus de 5 fois inférieur. Cela souligne une hydrolyse nettement marginale des ramifications des polymères hémicellulosiques. Au niveau des faibles charges enzymatiques, un minimum de 32,1% est calculé pour le glucose alors qu'il est de seulement 11,6% pour le xylose. Par ailleurs, c'est dans ces conditions que sont observés les rapports entre quantités de xylose et de glucose les plus faibles. Ces résultats soulignent l'importance de la charge enzymatique dans le cas du cocktail utilisé pour l'hydrolyse des hémicelluloses.

2.2.3.3. Influence des facteurs sur la cinétique de conversion des sucres après bioextrusion.

La plupart des cinétiques de conversion des sucres présentent un aspect logarithmique comme représenté sur la Fig. 2-7. Les courbes des taux de conversion des sucres en fonction du temps ont pour la plupart une allure logarithmique (Fig. 2-7). Cependant, comme elles ne correspondent pas toutes au même modèle mathématique, il est compliqué de les comparer dans leur ensemble. Néanmoins il est possible de calculer les coefficients directeurs des droites entre deux points de cinétique. Ceux-ci renseignent sur la vitesse de conversion des sucres. C'est une information supplémentaire et complémentaire à l'information statique donnée par la mesure de la valeur de conversion. Les vitesses V_{Ei} décrivant les vitesses initiales en bioextrusion ne sont pas représentées. Cependant le calcul des taux de conversion des sucres à 0,25 h est proportionnel aux valeurs V_{Ei} à un facteur 4 près. Les Graphiques 2-6a, 2-8a et 2-11a permettent donc d'analyser l'influence des facteurs sur cette réponse.

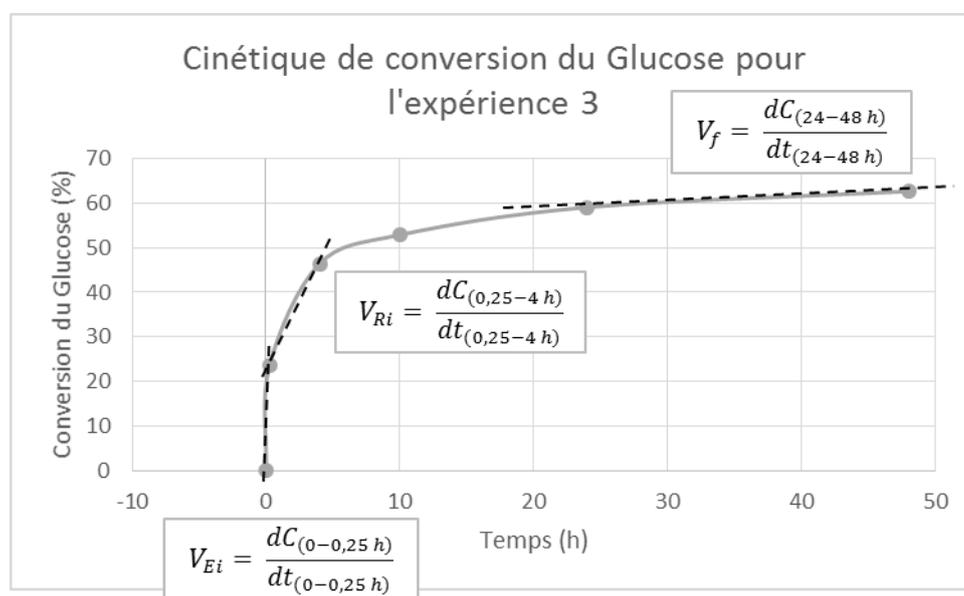


Figure 2-7 : Représentation schématique des vitesses de conversion calculées par rapport à la cinétique de conversion. L'exemple de cinétique présenté ici est celle de la conversion du glucose pour l'expérience 3.

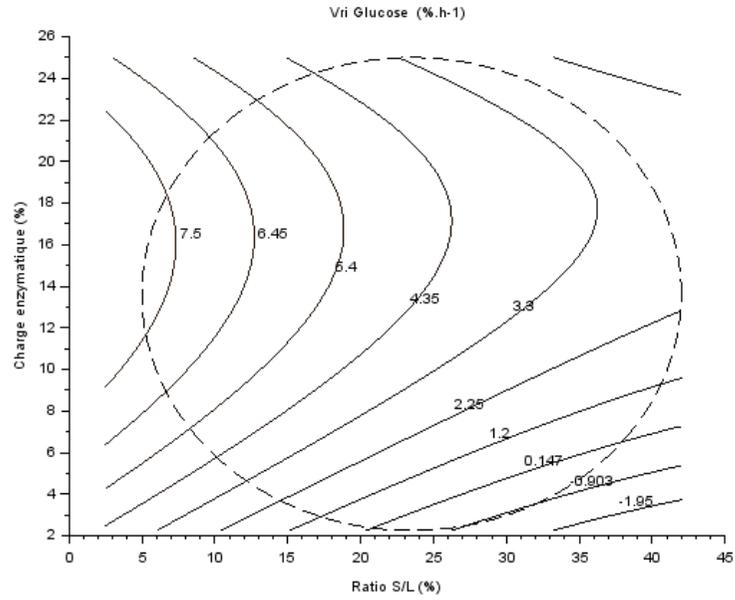
2.2.3.3.1. Vitesses initiales de conversion

Les vitesses initiales de conversion sont ici calculées comme le coefficient directeur de la droite entre les points 0,25 h et 4 h. Elles permettent de visualiser l'influence des facteurs sur la vitesse de conversion à la sortie de l'extrusion. Ces vitesses correspondent à des conversions mesurées sur une biomasse imprégnée dans de bonnes conditions de mélange dont l'hydrolyse se poursuit dans les conditions des réacteurs fermés. Les Graphiques 2-12a et b montrent des surfaces de réponse similaires entre les V_{Ri} du glucose et du xylose. Une nette influence du ratio S/L s'observe pour les conditions les plus diluées avec une charge enzymatique élevée (>12%). C'est dans ces conditions que sont observées les vitesses les plus élevées (>7%.h⁻¹). Pour des ratios S/L supérieurs à 15%, ainsi que des charges enzymatiques inférieures à 12%, la pente semble plutôt orientée par le facteur E. Dans ces conditions, correspondant à des conditions présentant de faibles taux de conversion (Graphiques 6b et 8b), se trouvent les vitesses de conversion les plus basses (proches de 0%.h⁻¹). Les faibles valeurs des coefficients a_{12} indique une absence d'influence de l'interaction entre les deux facteurs.

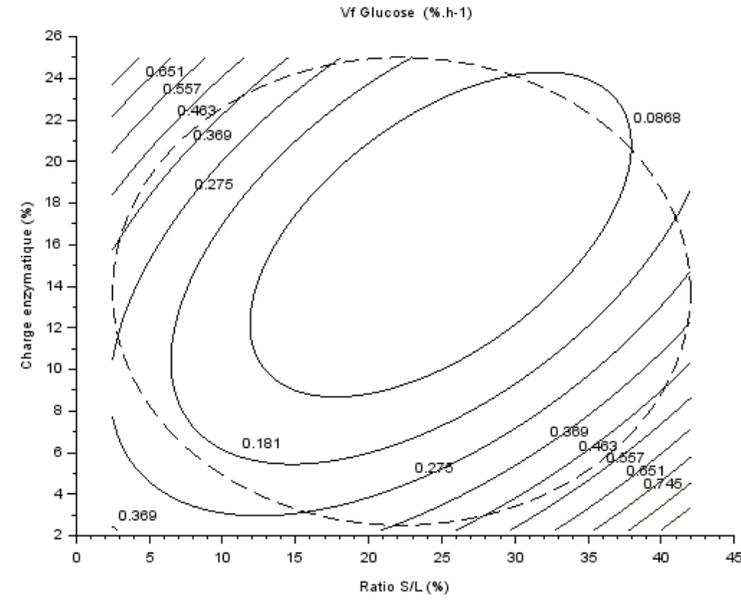
L'aspect des surfaces de réponse sur les Graphiques 6a et 8a sont nettement différentes de celles correspondantes aux V_{Ri} . En effet, les zones optimales se situent plutôt pour des charges enzymatiques élevées et des ratio S/L moyens, voir élevés pour le cas du glucose. Le Tableau 2-9 indique une influence quasi-nulle, pour le xylose, et positive, pour le glucose, du ratio S/L. Cela contraste nettement avec les influences prédominantes et négatives du ratio S/L

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

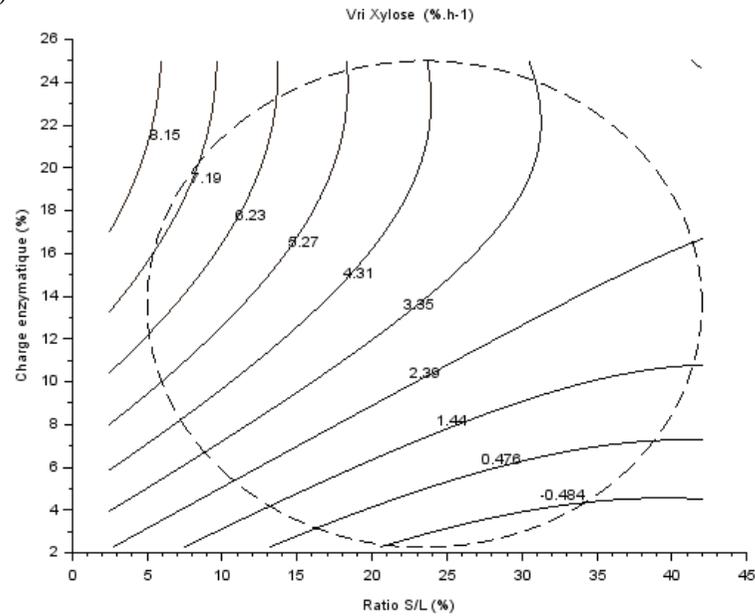
(a)



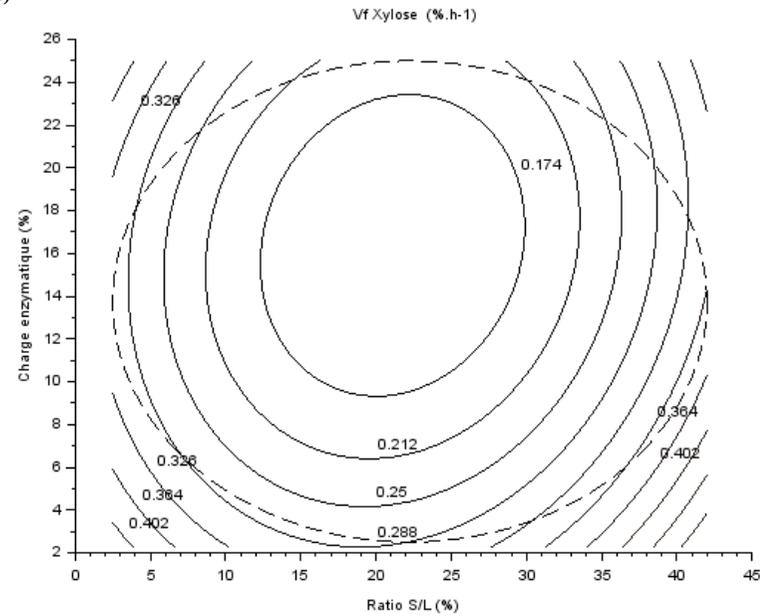
(d)



(b)

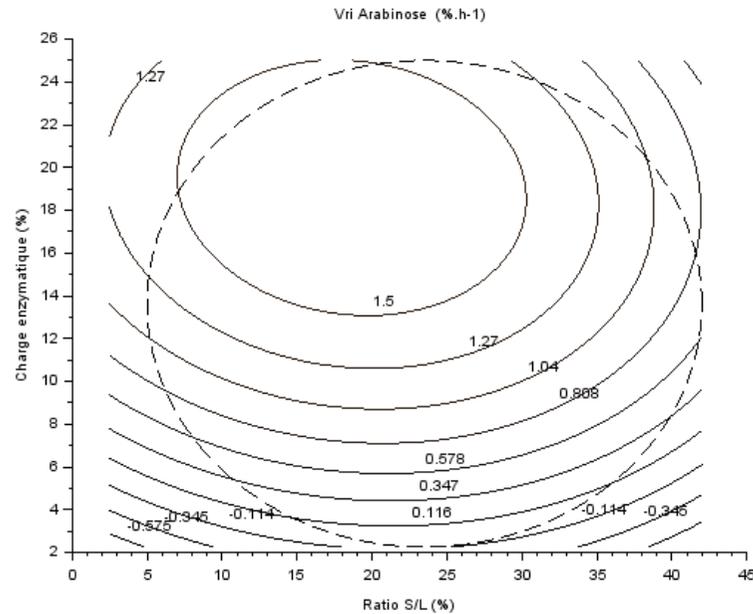


(e)

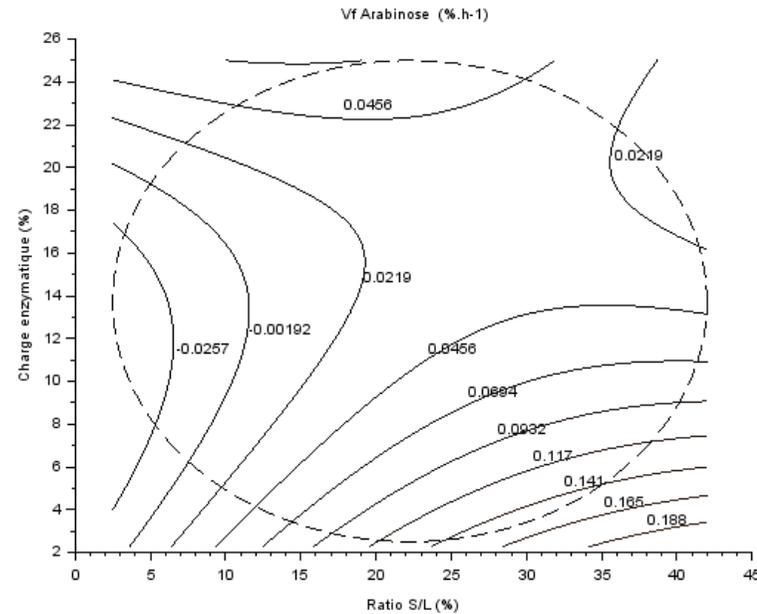


Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

(c)



(f)



Graphique 2-12 : Surfaces de réponse pour la vitesse initiale de conversion en réacteur fermé (V_{Ri}) du glucose (a), du xylose (b), de l'arabinose (c) ainsi que la vitesse finale de conversion (V_f) du glucose (d), du xylose (e) et de l'arabinose (f). Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

Tableau 2-9 : Caractéristiques des modèles obtenus pour les vitesses initiales en réacteur fermé et finales de conversions du glucose, du xylose et de l'arabinose.

	V_{Ri} Glucose	V_f Glucose	V_{Ri} Xylose	V_f Xylose	V_{Ri} Arabinose	V_f Arabinose
	Unités codées					
a0	4,61***	0,06	3,45***	0,12*	1,53***	0,03
a1	-3,07***	0,04	-2,70***	0,03	-0,18	0,04
a2	1,78**	-0,10	2,62***	-0,05	0,78***	-0,03
a11	0,91	0,26*	1,27	0,21*	-0,67**	-0,03
a22	-3,07**	0,22	-1,53	0,13	-0,84***	0,07**
a12	0,59	-0,32*	-0,74	-0,04	-0,13	-0,07
R²	0,89	0,74	0,90	0,74	0,96	0,71

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

pour les V_{Ri} . Une hypothèse serait que les bonnes conditions de mélange permises lors de la bioextrusion réduisent les limitations liées à la concentration en substrat.

La surface de réponse pour les V_{Ri} et celle proportionnelle aux V_{Ei} sont quant à elles semblables dans le cas de l'arabinose (Graphiques 12c et 11a). Elles sont toutes les deux principalement positivement influencées par la charge enzymatique avec une influence mineure et négative du ratio S/L (Tableau 2-9).

2.1.1.1.1. Vitesses finales de conversion

Comme indiqué sur la Fig. 2-7, dans la plupart des cas, la cinétique de conversion présente un plateau à partir de 24 h. Dans l'ensemble les valeurs sont donc faibles et proches les unes des autres. Cette information indique que la plupart des hydrolyses enzymatiques atteignent ce palier dans les 48 h. Néanmoins, la proximité des valeurs est un facteur pouvant expliquer les faibles r^2 des différents modèles (Tableau 2-9), indiquant une médiocre représentation globale des surfaces de réponse. Les Graphiques 2-12a, b et c montrent, tous les trois, un large domaine central, pour des charges enzymatiques supérieures à 10%, avec des V_f proches de 0. Dans ces conditions, la plupart des réactions d'hydrolyse sont terminées. D'autres zones présentent des V_f plus élevées, notamment pour des ratios S/L élevés et des charges enzymatiques faibles. Dans ces conditions les faibles taux de conversion observés (Graphiques 2-12d, e et f) sont à associer à des cinétiques hydrolytiques incomplètes en 48 h.

2.1.1.1.2. Conclusion

La comparaison des vitesses initiales de conversion V_{Ei} et V_{Ri} confirme les distinctions entre les comportements hydrolytiques en extrusion et en réacteur fermé observés pour les taux de conversion. Le modèle avec les V_{Ei} indique une limitation, voire un effet positif, du ratio S/L lors de la bioextrusion. Au contraire, le modèle avec les V_{Ri} montre un effet prédominant et négatif de l'augmentation de la concentration en substrat. Les surfaces de réponse pour les V_{Ri} du glucose et du xylose soulignent l'importance des conditions diluées, et probablement du vecteur aqueux, pour l'hydrolyse en réacteur fermé. Seule la conversion de l'arabinose montre une continuité dans le comportement en extrusion et en réacteurs fermés. L'analyse des modèles pour les V_f montre que dans la plupart des réactions, les plateaux hydrolytiques sont atteints dans les 48 h.

2.1.1.2. Influence des facteurs sur la concentration en sucres dans le milieu réactionnel.

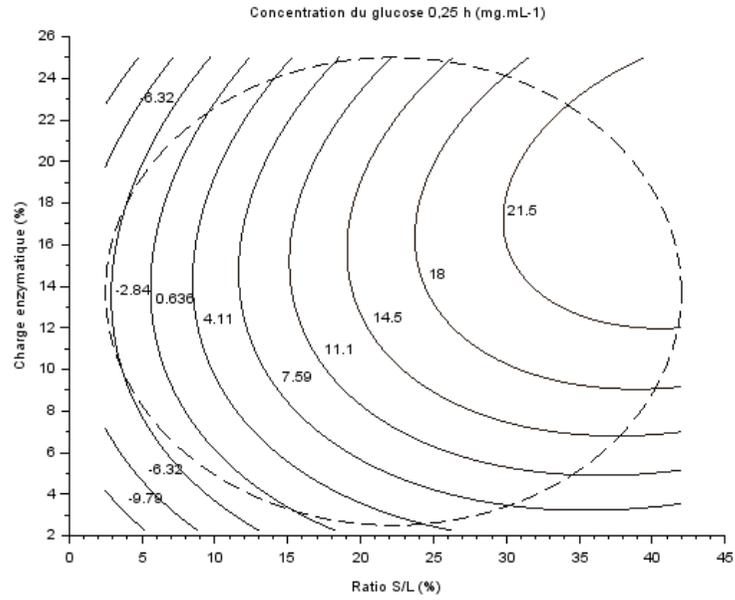
Les surfaces de réponse obtenues pour les concentrations en glucose avant dilution des échantillons sont présentées sur les Graphiques 2-13a à e. Celles-ci sont semblables à celles obtenues par Ramos et al., 2015, pour l'hydrolyse de bagasses de cannes à sucre prétraitée par explosion vapeur. Une double influence positive des deux facteurs s'observe jusqu'à 24 h. Le Graphique 2-14 indique cependant que c'est l'influence du facteur S qui prédomine sur le modèle. D'un point de vue cinétique, une nette diminution de l'influence de la charge enzymatique ainsi que de celle de l'interaction entre les deux facteurs est visible au cours du temps (Graphique 2-13). Celle-ci est associée à un glissement de la zone optimale depuis des zones avec une forte charge enzymatique vers des zones moins concentrées en catalyseurs (Graphiques 2-13). Si l'augmentation de la charge enzymatique permet une production de glucose plus rapide, son intérêt est visiblement réduit après 48 h.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

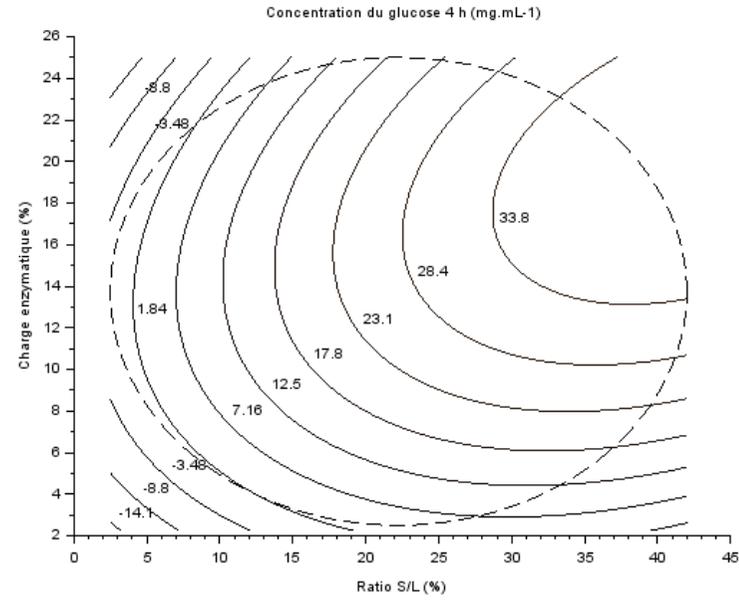
Les concentrations mesurées en glucose montrent de bonnes performances du cocktail Cellic Ctec2, même à haute consistance. Dans les conditions optimales observée par Ramos et al., 2015 (charge enzymatique de 10% et ratio S/L de 25%), une concentration de 51,6 g/L est obtenue au bout de 24 h. Avec les mêmes conditions de temps, de charge enzymatique et de ratio S/L, une concentration d'environ 36,9 g/L est obtenue dans le cas de cette étude. Cela souligne la cohérence des résultats obtenus ainsi que la performance du procédé, compte tenu d'un prétraitement limité et d'un pourcentage initial en cellulose plus faible (voir 2.1. Prétraitement de la paille de blé). Ramos et al., 2015 attribuent ces bons résultats à haute consistance à un bon ratio d'activité des endo/exocellulases, une faible inhibition par les produits finaux (cellobiose, glucose), un faible taux d'adsorption non-spécifique et la présence d'enzymes auxiliaires. Cependant l'importance respective de ces différents facteurs n'est pas détaillée.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

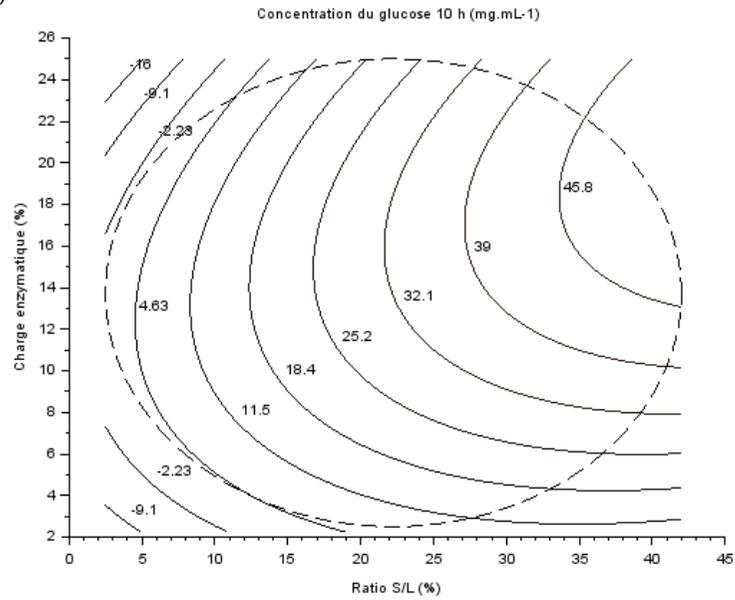
(e)



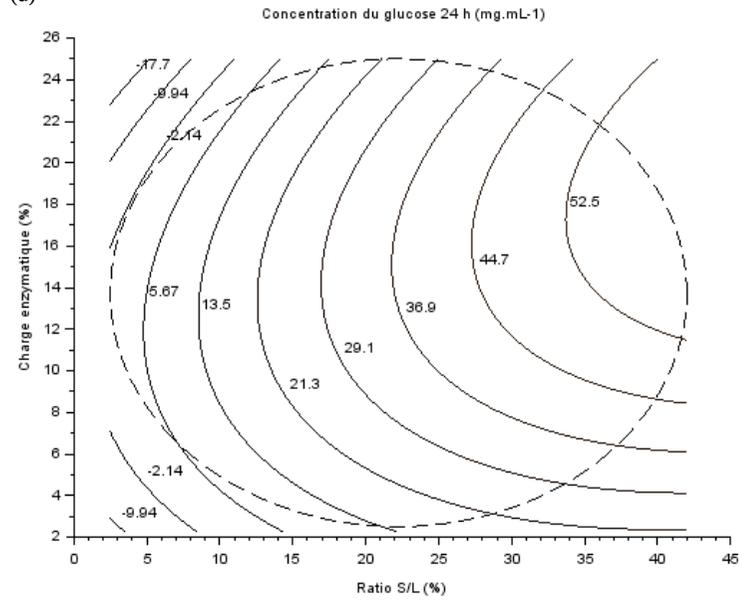
(b)



(c)

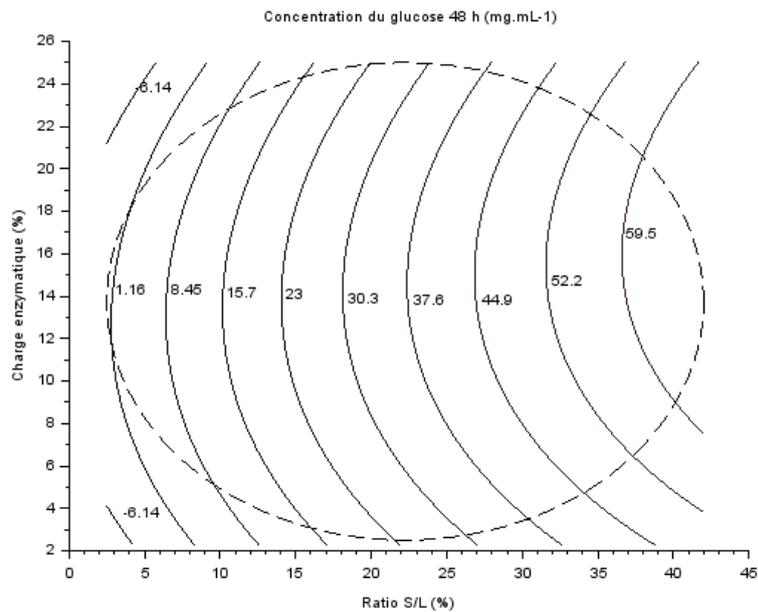


(d)

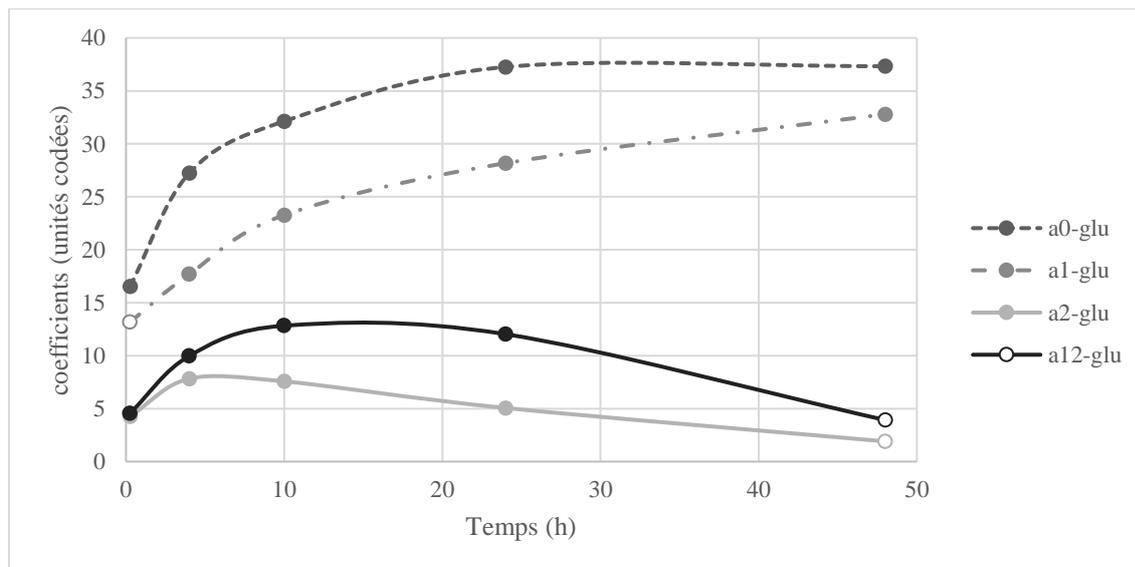


Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

(e)



Graphique 2-13 : Surfaces de réponse pour la concentration en glucose dans le milieu réactionnel à 0,25 h (a), 4 h (b), 10 h(c) 24 h (d) et 48 h (e). Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.



Graphique 2-14 : Coefficients des modèles de surfaces de réponse pour la concentration du glucose en milieu liquide en fonction du temps. Les points pleins sont au moins significatifs à 0.05% ; les points vides sont non significatifs.

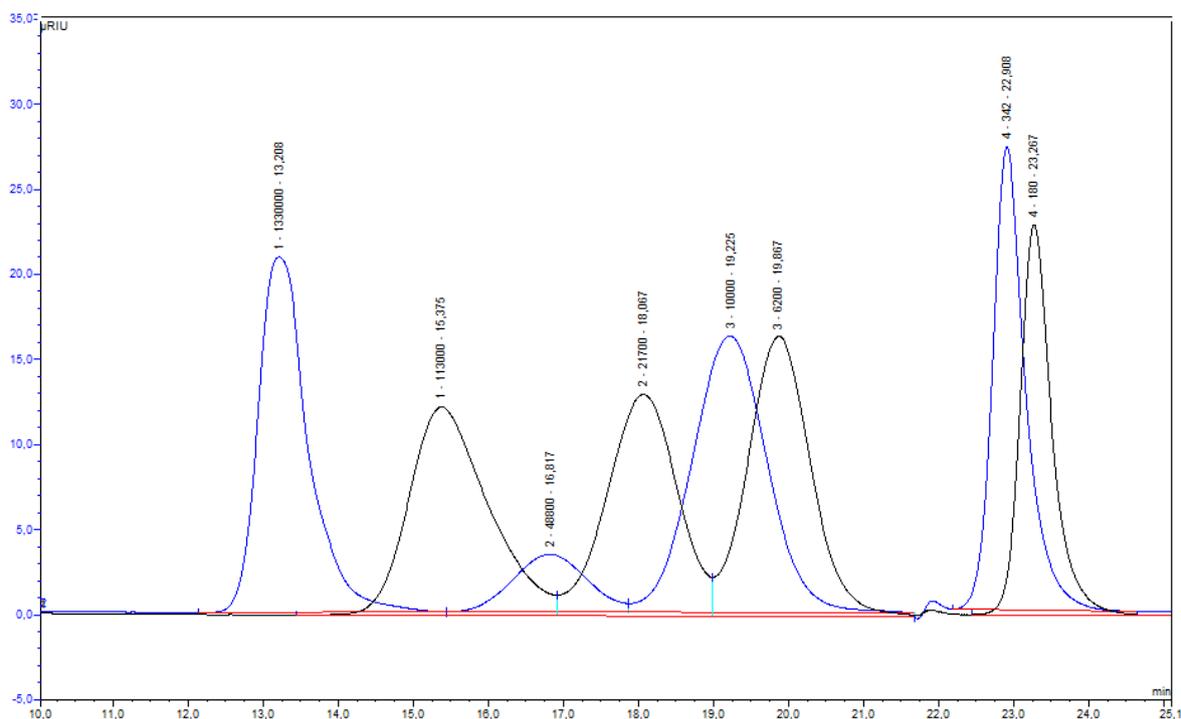
Les mêmes tendances s'observent pour le xylose et l'arabinose, avec toutefois une influence plus marquée de la charge enzymatique en début de cinétique. Après 48 h d'hydrolyse, les concentrations maximales observées pour le xylose sont de 23 g.L^{-1} et de $3,8 \text{ g.L}^{-1}$ pour l'arabinose.

Si la conversion est plus élevée dans les milieux dilués, la concentration en glucose est, elle, maximale dans les milieux concentrés. Il est important d'avoir ces deux données, car si la valorisation de la biomasse implique une conversion optimale, la concentration est une donnée essentielle pour la viabilité économique du procédé. En effet, des études préliminaires indiquent

que le coût de la distillation peut être considérablement réduit en augmentant la concentration en glucose dans les hydrolysats (Lin and Tanaka, 2006).

2.1.1.3. Influence des facteurs sur les masses moléculaires en milieu aqueux après bioextrusion

Toutes les données précédentes nous informent uniquement sur les produits finaux de réaction. Hors comme cela a été souligné dans le paragraphe «1.2.1.1.6. Synergie», le fonctionnement de l'ensemble enzymatique est synergique. Il se découpe en plusieurs opérations simultanée et implique notamment l'existence de substrats intermédiaires. L'analyse qualitative de masses moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique (CES, M.2.1.4.) visent à observer la présence et l'évolution au cours du temps de substrats de tailles différentes, solubles dans la fraction liquide des échantillons. Les molécules observées sont comparées par défaut à une gamme de pullulanes entre 180 et 1 220 000 Da (Graphiques 2-15). Afin d'identifier la part saccharidique et non-saccharidique des différentes fractions de masses moléculaires, les modules de détection UV et RI sont utilisés l'un à la suite de l'autre. Les chromatogrammes obtenus pour les standards confirment bien une détections des sucres en RI, alors qu'aucun signal n'est visible en UV (annexes). L'association des signaux UV et RI permet donc de discriminer des signaux purement saccharidiques, de molécules hétéropolymériques associant carbohydrates et autres composés (notamment issus de la fraction ligneuse) (Roubroeks et al., 2000; Zoia et al., 2011).



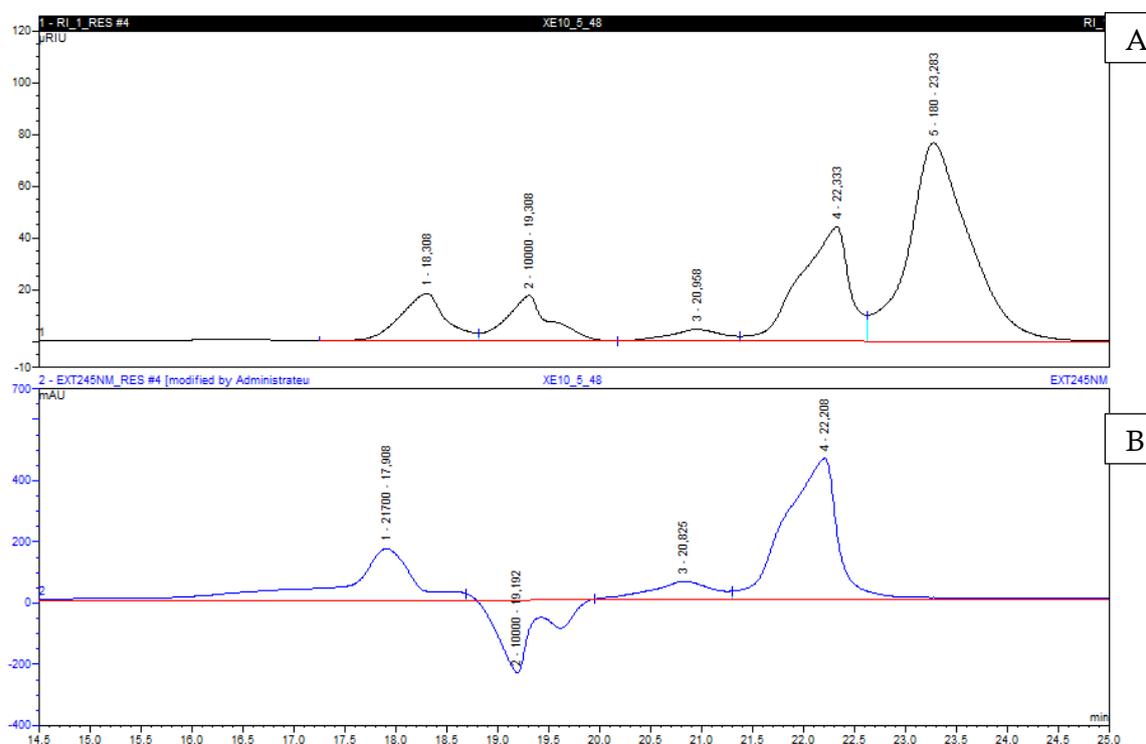
Graphique 2-15 : Chromatogramme RI de la CES des standards de pullulanes.

Le Graphique 2-16 présente le chromatogramme obtenu pour l'expérience 5 après 48 h d'hydrolyse. Celui-ci présente les pics d'intérêt, visibles sur l'ensemble des chromatogrammes des autres échantillons. Cinq pics principaux sont visibles en RI, avec un épaulement plus ou moins visible sur le pic numéro 2. L'enregistrement des signaux UV allant de 190 à 400 nm au

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

cours du programme de séparation en CES permet d'observer les longueurs d'ondes les plus adaptées à l'analyse des signaux obtenus. La surface de réponse obtenue (annexes) indique qu'en se plaçant à 245 nm, l'ensemble des signaux présente une absorbance élevée (positive ou négative).

Le pic 5 ne présente clairement aucune correspondance en signal UV et est donc associable à une fraction saccharidique. Il est associé à des Mm entre 230 et 270 Da, indiquant une composition monomérique (e.g. glucose 180 Da, xylose 150 Da, arabinose) et dimérique (e.g. cellobiose 342 Da, xylobiose 282 Da). Les pics 2 à 4 ont une nette correspondance entre leurs signaux en RI et en UV. Le pic 2 présente un cas particulier car le signal correspondant est négatif. Il ne s'agit donc pas d'un phénomène d'absorption, mais d'émission lumineuse, qui peut être relié au phénomène d'autofluorescence de composés polyphénoliques en réponse à leur excitation par des longueurs d'onde du domaine UV (Albinsson et al., 1999). Un léger décalage dans le temps est associé à la longueur de câble entre le détecteur UV et RI. L'existence d'un double signal RI et UV indique que ces fractions ont une composition hétérogène (probablement un mélange saccharidique et phénolique), alors que la similitude des signaux révèle un comportement homogène de ces composés. Le pic 1 possède lui aussi un signal Ri et UV. Néanmoins, dans ce cas, le décalage entre ces signaux est plus marqué traduisant probablement une fraction correspondante à des complexes lignine-carbohydate (LCC). Ces ensembles de hautes masses indiquent un comportement légèrement différent entre la fraction phénolique, qui sort plus tôt avec une large polydispersité, de la fraction carbohydate, qui sort un peu plus tard.



Graphique 2-16 : Chromatogrammes RI (A) et UV (B) (245 nm) de la CES de l'expérience 5, avec bioextrusion, après 48 h d'hydrolyse.

Lors de la compilation des données obtenues en CES par le biais des plans d'expérience, tous les modèles ne présentent pas une validité statistique suffisante pour être interprétés. Des

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

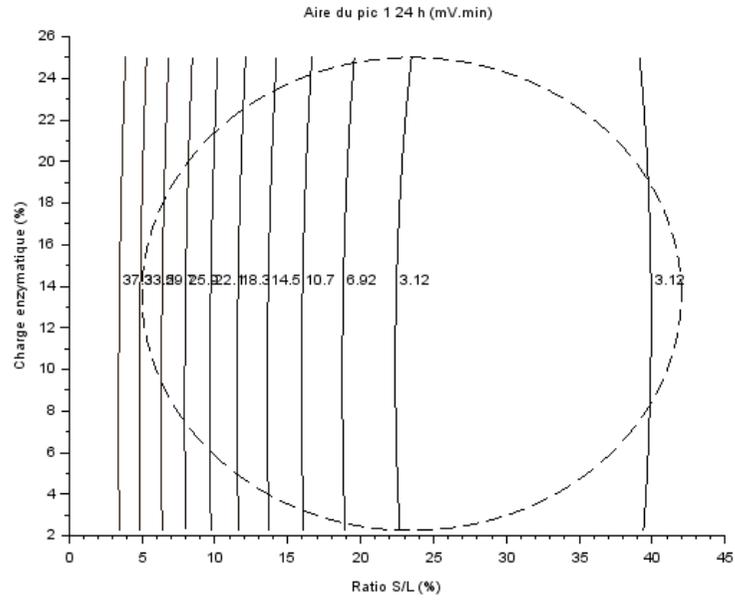
modèles fiables sont obtenus pour les aires des pics 1, 2, 3 et 5 et pour les masses molaires moyennes en masse (\bar{M}_m) des pics 2 et 5.

2.1.1.3.1. Influence des facteurs sur la teneur des fractions en CES.

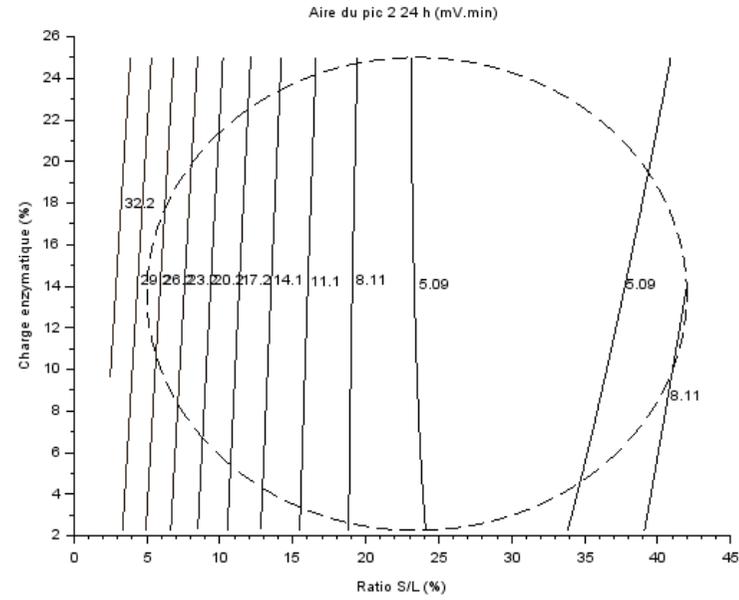
L'analyse des aires des fractions de masses moléculaires différentes indique deux cas différents. La teneur en fractions de plus grandes masses moléculaires (1, 2 et 3) dans le milieu réactionnel est quasi-uniquement influencée par le ratio S/L (Tableau 2-10). Les surfaces de réponse des modèles à 24 h de ces fractions sont présentées sur les Graphiques 2-17a, b et c. Ces aires montrent des évolutions très réduites au cours du temps et paraissent stables dans l'ensemble.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

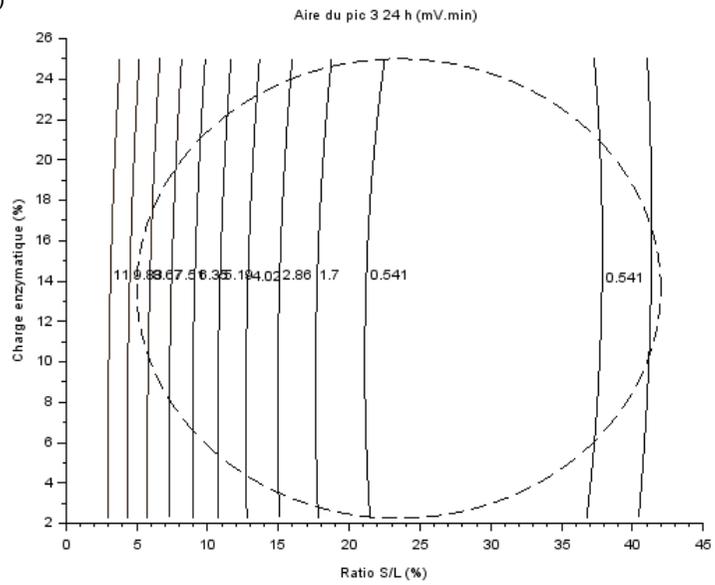
(a)



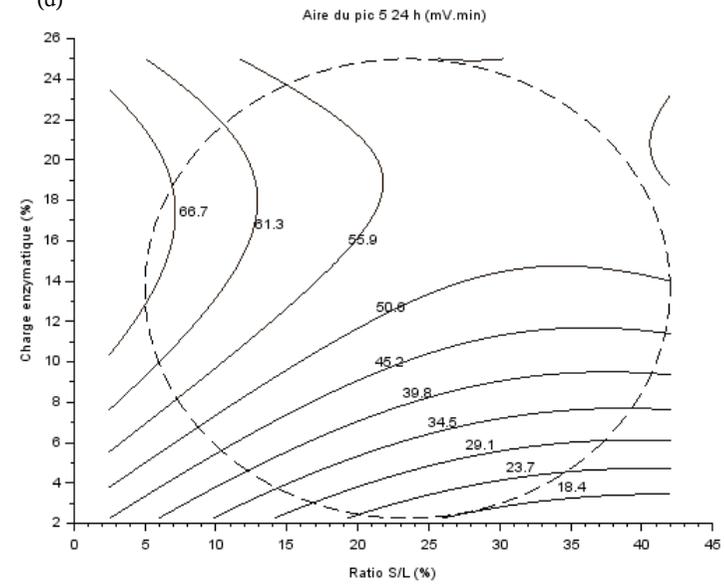
(b)



(c)



(d)



Graphique 2-17 : Surfaces de réponse pour les aires relatives aux pics 1 (a), 2 (b), 3 (c) et 5 (d) après 24 h d'hydrolyse. Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

Tableau 2-10 : Caractéristiques des modèles obtenus pour les aires relatives aux pics 1 (a), 2 (b), 3 (c) et 5 (d) après 24 h d'hydrolyse.

	Aire du pic 1	Aire du pic 2	Aire du pic 3	Aire du pic 5
	Unités codées			
a0	3,28	5,72**	0,26	52,27***
a1	-17,43***	-12,40***	-4,79***	-10,41**
a2	0,33	-0,10	0,13	15,03***
a11	19,27***	14,86***	6,51**	8,05
a22	0,54	0,08	0,22	-16,16**
a12	-0,26	-2,29	-0,26	5,73
R²	0,910	0,927	0,863	0,914

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

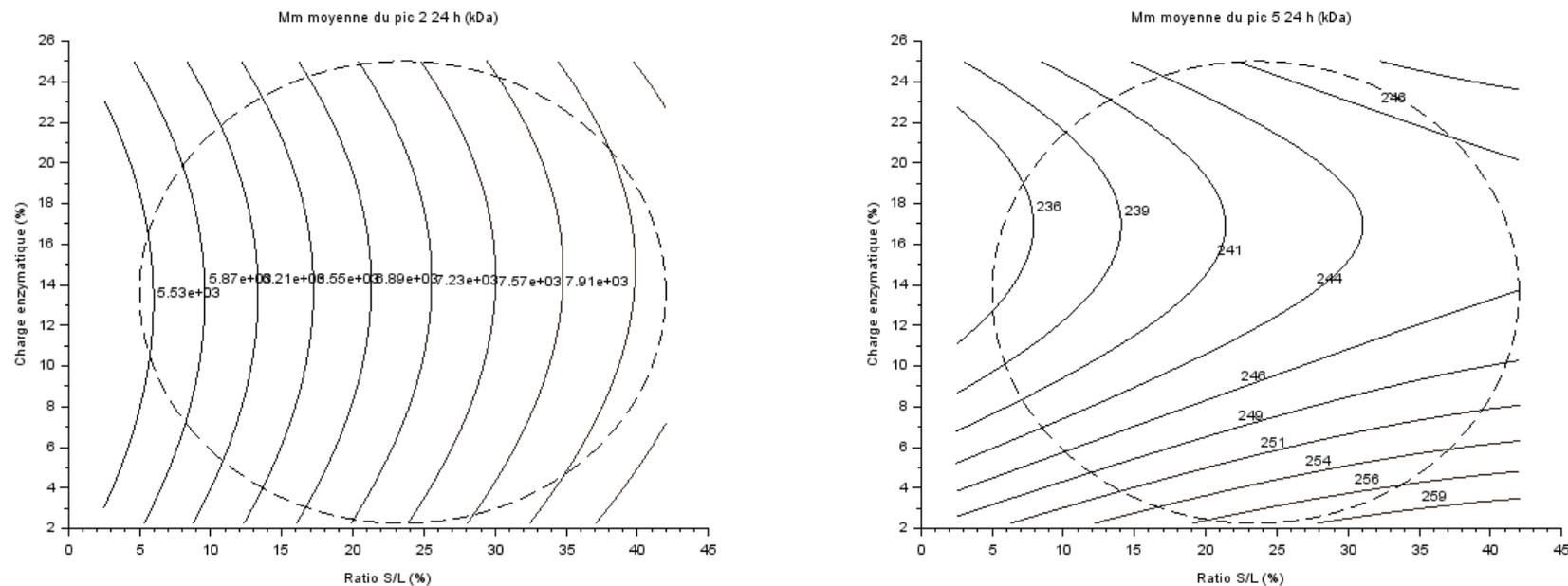
À l'inverse, l'aire de la fraction associable aux monomères (pic n°5, Graphique 2-17d) présente un comportement semblable aux taux de conversion du glucose et du xylose (Graphiques 2-6d et 2-8d), avec une prédominance de l'influence du facteur E (Tableau 2-10). L'augmentation de la valeur des aires est clairement associable à l'accumulation dans le milieu de produits finaux de dégradation.

2.1.1.3.2. Etude qualitative des masses moléculaires lors de l'hydrolyse enzymatique.

Dans le cas de cette étude, la complexité polymérique des résidus polyphénoliques s'ajoute à la forte polydispersité déjà existante dans la fraction holocellulosique (hémicelluloses, cellulose). L'étude des masses molaires moyennes en nombre (\bar{M}_n) n'est donc pas fiable, d'autant plus que la masse molaire moyenne en masse (\bar{M}_m) augmente. Cependant, l'étude de l'évolution des \bar{M}_m permet notamment d'observer l'évolution des fractions au cours du temps.

Les influences des facteurs pour les \bar{M}_m associées aux pics 2 et 5, correspondent nettement à celle observées pour les aires (Graphiques 2-17b et d). Les \bar{M}_m du pic n°2 indiquent une claire prédominance du ratio S/L (Graphique 2-18a, Tableau 2-11). Plus la concentration en substrat augmente et plus les \bar{M}_m sont élevées. Les \bar{M}_m du pic n°5 sont, elles, majoritairement associées à l'influence de la charge enzymatique pour les faibles concentrations en enzymes, et aux ratios S/L pour les fortes concentrations en enzymes (Graphique 2-18b). Entre 0,25 et 48 h une diminution globale des \bar{M}_m est observée.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.



Graphique 2-18 : Surfaces de réponse pour les \bar{M}_m relatives aux pics 2 (a) et 5 (b) après 24 h d'hydrolyse.. Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

Tableau 2-11 : Caractéristiques des modèles obtenu pour les \bar{M}_m relatives aux pics 2 et 5 après 24 h d'hydrolyse.

	\bar{M}_m pic 2	\bar{M}_m pic 5
	Unités codées	
a0	6971,88	242,25
a1	1602,47	5,89
a2	-28,59	-5,50
a11	-177,21	-1,89
a22	437,80	9,48
a12	-72,19	-0,02
R²	0,961	0,941

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

2.1.1.3.3. Discussions

D'après les résultats obtenus, les fractions ayant une \bar{M}_m approximative supérieure à 700 Da sont principalement associées à la concentration en substrat (pics 1, 2 et 3). La présence de ces fractions polymériques semble donc principalement dépendre d'un phénomène d'extraction, facilité par un milieu dilué. Les correspondances UV des signaux RI de ces fractions indiquent une composition hétérogène des polymères avec une probable fraction phénolique. La faible évolution des aires au cours de la réaction pourrait donc indiquer une extraction solide/liquide de ces composés qui sont présents dans le milieu mais ne subissent pas ou peu l'hydrolyse enzymatique.

Le pic 4 ne présente aucun modèle statistique assez valide pour analyser son comportement sur le domaine de définition. Cependant, pour l'ensemble des échantillons il correspond à des masses moléculaires de petits oligomères (entre 600 et 700 Da) et un spectre d'absorption net avec un pic bien défini ayant un maximum à 245 nm (annexes), pouvant être associé à des dérivés sucres-acides hydroxycinnamiques (Harborne and Corner, 1961).

Le pic 5 est clairement associé à la fraction oligo/monomérique issue de l'hydrolyse enzymatique dont le comportement correspond à ce qui a été observé pour les taux de conversion des sucres. La sensibilité insuffisante de la colonne de CES utilisée et l'étape d'hydrolyse secondaire très rapide (Zhang and Lynd, 2004a), ne permettent pas l'observation détaillée de la dépolymérisation provoquée par l'hydrolyse enzymatique des fractions moléculaires présentes en solution aqueuse. Cependant, la baisse progressive de la \bar{M}_m au cours du temps indique l'accumulation de plus petites molécules au cours de la réaction. Ce résultat peut être provoqué soit par la présence de C5 plus légers (e.g. xylose par rapport au glucose), soit par l'hydrolyse de dimères présents en début de réaction (e.g. le cellobiose, xylobiose) et alourdissant la fraction associée aux molécules de plus petites tailles.

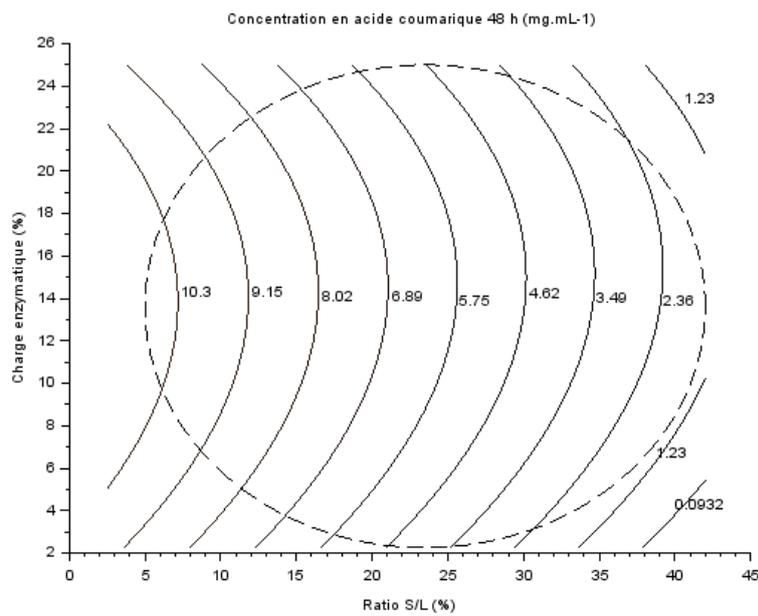
Enfin, l'utilisation des pullulanes comme standards ne permet qu'une comparaison imparfaite. En effet, les substrats polysaccharidiques n'ont pas le même type de liaison osidique et peuvent potentiellement être hétérogènes et/ou ramifiés. Il se peut donc que des fragments hémicellulosiques et celluloseux apparaissent de même taille, alors que leur composition chimique est différente. Le couplage des signaux RI et UV permet de distinguer des signaux purement polysaccharidiques de mélanges comportant probablement des fractions phénoliques. Cependant, il serait nécessaire d'opérer une hydrolyse totale des fractions en solution afin de connaître leur composition chimique et savoir plus précisément le type de fragments solubilisés à la suite de l'hydrolyse enzymatique.

2.1.1.4. Acides et aldéhydes phénoliques dans le milieu réactionnel.

del Río et al., 2012 ont identifié une lignine p-hydroxyphenyle-guaiacyl-syringyle dans la paille de blé. Celle-ci présente un ratio H :G :S de 6 :64 :30, monomères auxquels sont associés des p-coumarates et ferulates.

Les analyses HPLC (M.2.1.3.) dans les fractions liquides issues des bioextrudats après 48 h d'hydrolyse montre la présence de plusieurs composés probablement issus de la dégradation de cette fraction. Parmi les signaux identifiés, de faibles concentrations en d'acide coumarique, acide férulique, vanilline sont observées. Les concentrations de l'acide

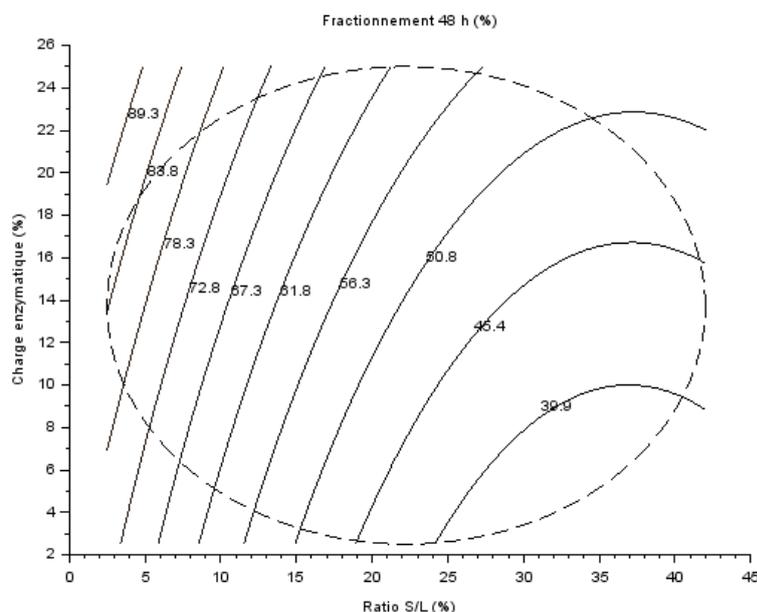
coumarique (Graphique 2-19) et de la vanilline sont principalement influencée par le ratio S/L, ce qui indique que leur présence est probablement associée à un phénomène d'extraction en milieu liquide de molécules issues de la déstructuration alcaline des lignines. Les valeurs obtenues pour l'acide férulique semblent identiques pour tous les échantillons (valeur moyenne mesurée de 28,4 mg/L). Celles-ci ne permettent pas d'obtenir de modèle suffisamment fiable pour être commenté.



Graphique 2-19 : Surface de réponse de la concentration en acide coumarique après 48 h d'hydrolyse enzymatique.

2.1.1.5. Fractionnement de la biomasse après bioextrusion

Les mesures de filtration de la biomasse après 48 h d'hydrolyse enzymatique (M.2.2.6.1.) nous permettent d'évaluer l'évolution de la taille des particules en fin de réaction suivant les facteurs de ratio S/L et de charge enzymatique (Graphique 2-20). Les données de fractionnement, exprimées en %, correspondent à l'écart relatif en matière sèche après filtration à 45 μ m. Plus cette valeur est élevée, plus la réduction de taille de particules est importante au cours de l'hydrolyse enzymatique.



Graphique 2-20 : Surface de réponse du fractionnement de la biomasse après 48 h d'hydrolyse enzymatique.

Tableau 2-12 : Caractéristiques du modèle obtenu pour le fractionnement de la biomasse

Coefficients	
	unités codées
a0	48,18***
a1	-24,57***
a2	10,53**
a11	20,84**
a22	2,73
a12	-3,37
R²	0,889

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

L'effet négatif du ratio S/L est prédominant (Tableau 2-12). Plus on augmente la consistance du milieu, moins on a de réduction des tailles de particules. Toutefois, le coefficient a2 montre aussi une nette influence positive de la charge enzymatique (Tableau 2-12). Celle-ci est particulièrement visible pour les ratios S/L élevés. Il semble que l'augmentation de la concentration enzymatique permette de palier à ce faible niveau de fractionnement observé.

Ces données traduisent un phénomène de réduction de taille des particules et plus généralement de déconstruction de la biomasse. Ces résultats sont à relier à l'évolution visuelle des mélanges. Pour les mélanges les plus dilués (ratio S/L inférieur à 20%) on observe un liquide libre dès la sortie d'extrusion. Pour les mélanges à plus haute consistance, un phénomène de liquéfaction progressif s'observe par l'apparition d'un liquide. Les expériences 12, 13 et 14 ne montrent, elles, aucun signe de liquéfaction, même après 48 h.

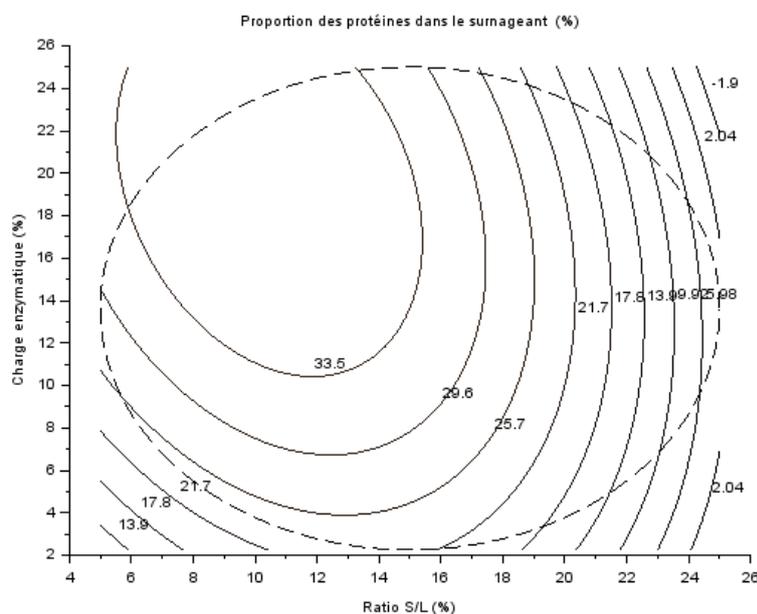
Les valeurs de taille de particules obtenues par filtration indiquent bien que le processus de dégradation biologique de la fraction holocellulosique s'accompagne d'un phénomène de dégradation physique. Cette dégradation s'accompagne d'une liquéfaction progressive visible,

résultant d'un fractionnement de la biomasse. Ce fractionnement semble principalement influencé par le ratio S/L. Néanmoins, une influence non négligeable de la charge enzymatique s'observe en particulier pour les hautes consistances.

2.1.1.6. Répartition enzymatique après bioextrusion.

Afin d'estimer l'adsorption enzymatique sur le substrat dans les conditions de mélange intensif de la bioextrusion, la répartition enzymatique dans les échantillons a été évaluée. Des mesures Kjeldhal ont été réalisées séparément sur le surnageant et le culot obtenu après centrifugation de différents bioextrudats (M.2.2.3.). Seuls les points 2 à 10 (Tableau 2-8) ont été utilisés pour ces mesures, car ils présentent une quantité suffisante de surnageant à la suite de la centrifugation pour permettre les mesures suivant la méthode Kjeldahl. Cela restreint donc le plan d'expérience en termes de ratio S/L entre 5 et 25%.

La surface de réponse présentée sur le Graphique 2-21 indique le pourcentage protéique présent dans le surnageant par rapport à l'ensemble de l'échantillon. Une forte influence négative du ratio S/L s'observe sur la surface et est confirmée par un coefficient a_1 négatif avec une valeur absolue élevée (Tableau 2-13). L'influence de la charge enzymatique est, elle, plus faible et plus visible pour des milieux dilués. Il est impossible d'associer clairement cette répartition avec un phénomène d'adsorption en particulier. Le modèle permet néanmoins d'observer une nette diminution de la proportion d'enzymes dans la phase liquide à partir d'un ratio S/L de 15%. Le modèle présenté ne couvre par l'ensemble du domaine de définition en termes de ratio S/L couvert lors de l'étude. Il est cependant probable que ce phénomène s'intensifie avec la concentration en substrat au-delà de 25%.



Graphique 2-21 : Surface de réponse pour la proportion des protéines dans le surnageant des bioextrudats à la sortie de l'étape de bioextrusion (0,25 h).

Tableau 2-13 : Caractéristiques du modèle obtenu pour le fractionnement de la biomasse

Coefficients	
	unités codées
a0	33,54***
a1	-12,78**
a2	4,15*
a11	-17,53*
a22	-6,96*
a12	-6,26
R²	0,98

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Les pH des différents liquides issus des échantillons testés ici ont été mesurés. Ces résultats permettent une approche du pH du milieu réactionnel, bien qu'il soit difficile de connaître le pH réel dans des conditions hétérogènes avec une charge en solide élevée. Pour les ratios S/L variant de 5,1 à 23% le pH varie de 5,0 à 5,7. Plus la charge solide est élevée, plus le pH semble élevé. Les milieux avec le moins de tampon sont plus basiques, probablement du fait d'ions OH⁻ présent dans la biomasse après prétraitement, même après neutralisation. Cette variation du pH, bien que conséquente est cependant à relativiser avec les valeurs de fonctionnement optimal du cocktail Cellic Ctec 2 dans une gamme de pH entre 4,8 et 6 environ (Novozymes A/S). Le pH est un paramètre critique quant au bon fonctionnement des enzymes, cependant le fonctionnement en conditions concentrées rend particulièrement compliqué son bon suivi. C'est une des limites clairement identifiée de l'hydrolyse enzymatique pour des ratios S/L très élevés.

2.1.1.7. Conclusion

Les données des taux de conversion, des vitesses de conversion ainsi que des masses moléculaires des sucres indiquent un comportement différent en bioextrusion du reste de la cinétique en réacteurs fermés. Ces différences s'illustrent principalement par l'influence du ratio S/L dans le cas de la conversion. Taux de conversion, ainsi que vitesses de conversion entre 0,25 et 4 h montrent une influence nulle voire positive du ratio S/L dans la conversion du xylose et du glucose. Il semble que l'utilisation de la bioextrusion permette de limiter l'influence négative couramment rencontrée avec l'augmentation de la concentration en solide (Du et al., 2017; Geng et al., 2015). Les bonnes conditions de mélange permettent aussi d'obtenir de bons résultats en termes de concentration des sucres dans le milieu. Au cours du temps ces concentrations sont progressivement moins influencées par la charge enzymatique et plus par le ratio S/L.

Les résultats relatifs aux masses moléculaires démontrent la présence de complexes lignine-carbohydrate. À cela s'ajoute les monomères phénoliques attestant d'une dégradation de la fraction ligneuse dans le milieu liquide. Ces composés sont associés à une inhibition des étapes de production de bioéthanol et de méthane (Gossett et al., 1982).

Cette dégradation biochimique s'accompagne d'une dégradation physique visible par l'augmentation de la proportion des particules de petite taille. Ce fractionnement se traduit par la liquéfaction progressive de la biomasse.

Enfin, une nette augmentation de la proportion d'enzymes dans la fraction solide s'observe en augmentant le ratio S/L. Ce résultat indique une association particulièrement intime entre enzymes et substrat solide à la sortie de la bioextrusion, particulièrement pour les milieux concentrés en substrat.

2.1.1.8. Etude de l'influence de l'étape de bioextrusion.

L'étude précédente nous a permis de visualiser les grandes tendances lors du processus hydrolytique après bioextrusion. Ici, nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'influence de cette étape de bioextrusion. Un second plan d'expérience est donc réalisé sans étape de bioextrusion préalable. Les milieux réactionnels sont donc du début à la fin situés dans des réacteurs fermés et agités. L'objectif ici est de **comparer l'hydrolyse enzymatique avec et sans mélange préalable en bioextrusion**, afin d'en faire ressortir **les influences de l'étape de bioextrusion**.

2.1.1.8.1. Matériel et méthodes

Un plan d'expérience recouvrant le domaine de définition précédemment réalisé pour la bioextrusion a été réalisé. Dans cette étude, le mélange entre la paille prétraitée et le cocktail enzymatique se fait directement en réacteurs fermés. Les conditions de réaction en milieu fermé sont exactement les mêmes que dans l'étude précédente, sans bioextrusion préalable. Les conditions expérimentales de tous les points du plan sont résumées dans le Tableau 2-14. Les points centraux 3, 4 et 10 sont des répliques.

Tableau 2-14 : Valeurs expérimentales des variables indépendantes ratio S/L (S) et charge enzymatique (E), et valeurs codées correspondantes.

	S	E	x1	x2
	%	%	unité codées	
1'	40,0%	13,0%	1,0	0,0
2'	5,0%	13,0%	-1,0	0,0
3'	22,5%	13,0%	0,0	0,0
4'	22,5%	13,0%	0,0	0,0
5'	22,5%	13,0%	0,0	0,0
6'	31,3%	23,4%	0,5	0,9
7'	13,8%	2,6%	-0,5	-0,9
8'	31,3%	2,6%	0,5	-0,9
9'	13,8%	23,4%	-0,5	0,9

*La charge enzymatique (E) est exprimée en en g protéines par g de cellulose.

Le traitement post-réactionnel des échantillons est le même que celui détaillé pour l'étude précédente. Les deux plans d'expérience ont des domaines de définition légèrement

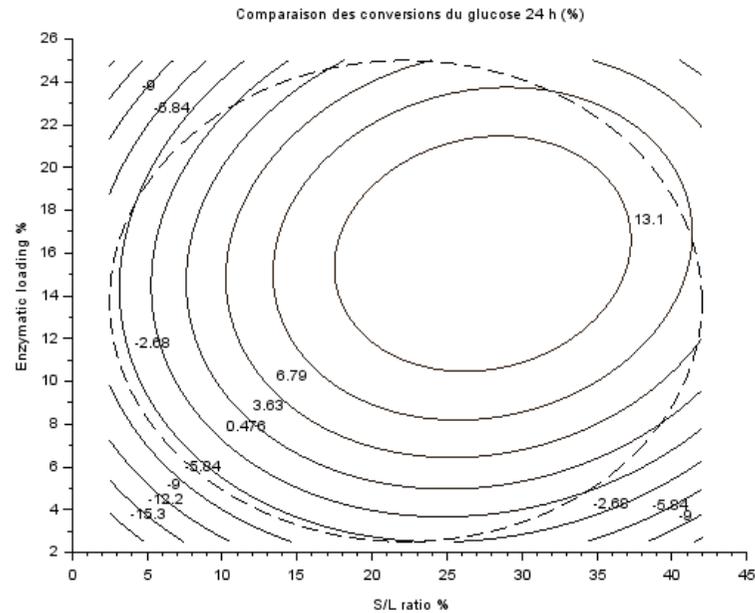
différents. Ceux-ci se recoupent sur le domaine allant d'un ratio S/L de 5 à 40% et d'une charge enzymatique entre 2,5 et 25%.

2.1.1.8.2. Influence de la bioextrusion sur le taux de conversion du glucose et du xylose après bioextrusion.

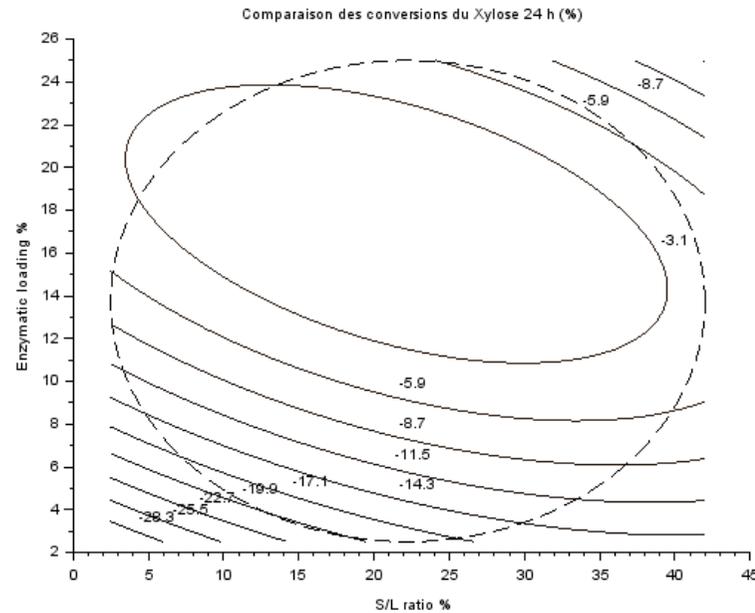
Le Graphique 2-22 permet la comparaison des coefficients des modèles obtenus avec et sans bioextrusion préalable entre 4 et 48 h. Ces surfaces de réponses sont obtenues à partir de modèles calculés suivant les valeurs de conversion avec bioextrusion, corrigées par les valeurs théoriques obtenues à partir des modèles sans bioextrusion. Elles indiquent donc un écart théorique de conversion entre les conditions avec et sans bioextrusion.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

(a)

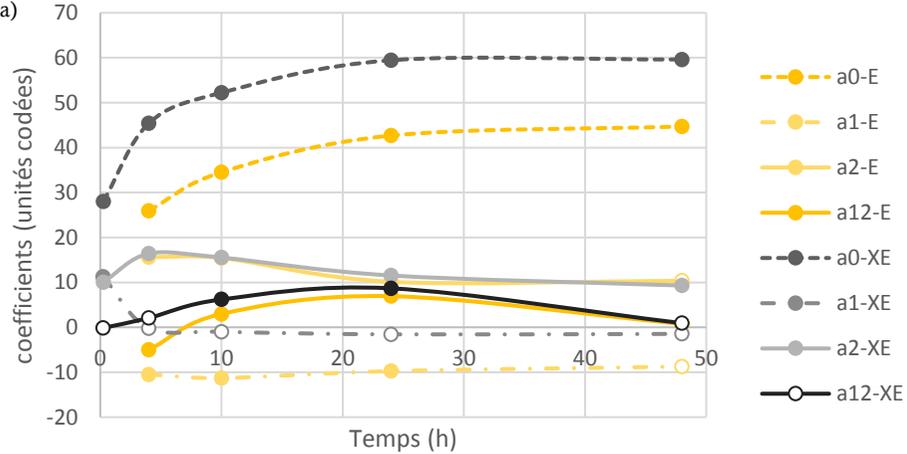


(b)

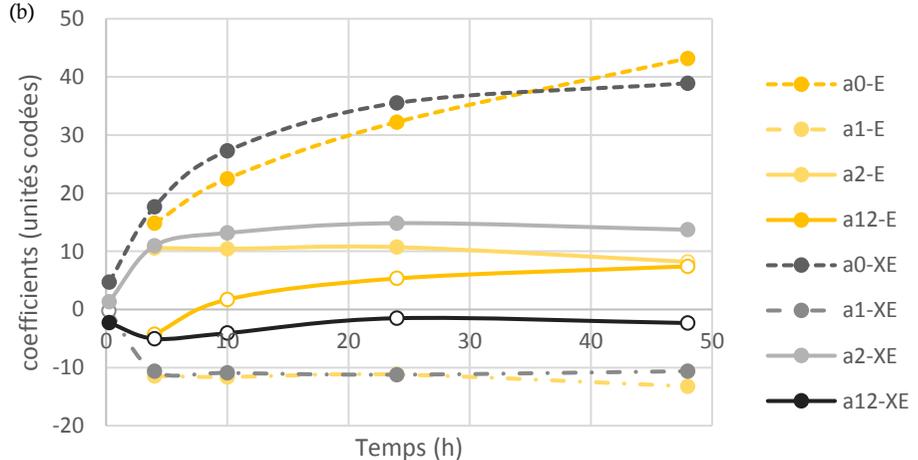


Graphique 2-22 : Surfaces de réponse obtenues pour la comparaison des taux de conversion du glucose (a) et du xylose (b) après 24 h d'hydrolyse. Les modèles sont obtenus en soustrayant aux valeurs obtenues avec bioextrusion les valeurs théoriques des modèles obtenus sans bioextrusion. Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

(a)



(b)



Graphique 2-23 : Comparaison des coefficients des modèles pour le taux de conversion du glucose (a) et du xylose (b) en fonction du temps. Les points pleins sont au moins significatifs à 0.05% ; les points vides sont non significatifs. E, sans bioextrusion ; XE, avec bioextrusion.

Seuls les résultats pour la conversion du glucose et du xylose sont ici présentés. Les coefficients des modèles des taux de conversion avec et sans bioextrusion sont comparés sur un même référentiel (Graphique 2-23).

Dans le cas du glucose, les coefficients a_2 et a_{12} sont visiblement similaires avec et sans bioextrusion, et soulignent une influence comparable de la charge enzymatique et de l'interaction entre les deux facteurs (Graphique 2-23). À l'inverse, l'influence du ratio S/L est visiblement différente. Celle-ci est nettement plus négative sans bioextrusion préalable. Les surfaces de réponse obtenues sont similaires de 4 à 48 h. Ainsi seule celle à 24 h est présentée sur le Graphique 2-22a. Le Graphique 2-22a indique que c'est dans les conditions de charges enzymatiques et ratio S/L élevés que l'effet positif de la bioextrusion est le plus important. Dans ces conditions, des augmentations de taux de conversion supérieures à 13% sont mesurées. Un léger effet négatif est visible pour les conditions les plus diluées. Dans ces conditions de faibles concentrations en substrats, une baisse du taux de conversion est calculée jusqu'à environ -6%.

Contrairement au glucose, l'ensemble des conditions du plan d'expérience présente une baisse des taux de conversion du xylose après bioextrusion (Graphique 2-22b). Cette influence négative s'accroît au cours du temps pour l'ensemble des points expérimentaux mesurés. L'allure de la surface de réponse est, elle, sensiblement la même au cours de la cinétique. La surface de réponse présentant les écarts des taux de conversion à 24 h avec et sans bioextrusion est présentée sur le Graphique 2-22b. Elle indique notamment que l'effet négatif de la bioextrusion s'accroît lorsque la charge enzymatique est diminuée. Les comportements des coefficients des modèles au cours du temps sont relativement similaires (Graphique 2-23b). Une influence plus faible de la charge enzymatique est observée sans bioextrusion, de même qu'une influence positive et nettement plus élevée de l'interaction entre les deux facteurs. L'origine de cette baisse de conversion semble donc bien liée au mélange intensif en extrusion qui pourrait provoquer une désactivation enzymatique ou encore une plus forte adsorption non spécifique des hémicellulases. Une nette diminution de la production de xylose est observée, cependant celle-ci ne permet pas de statuer de façon claire sur la déconstruction des hémicelluloses sans analyse plus poussée de la fraction poly/oligomérique.

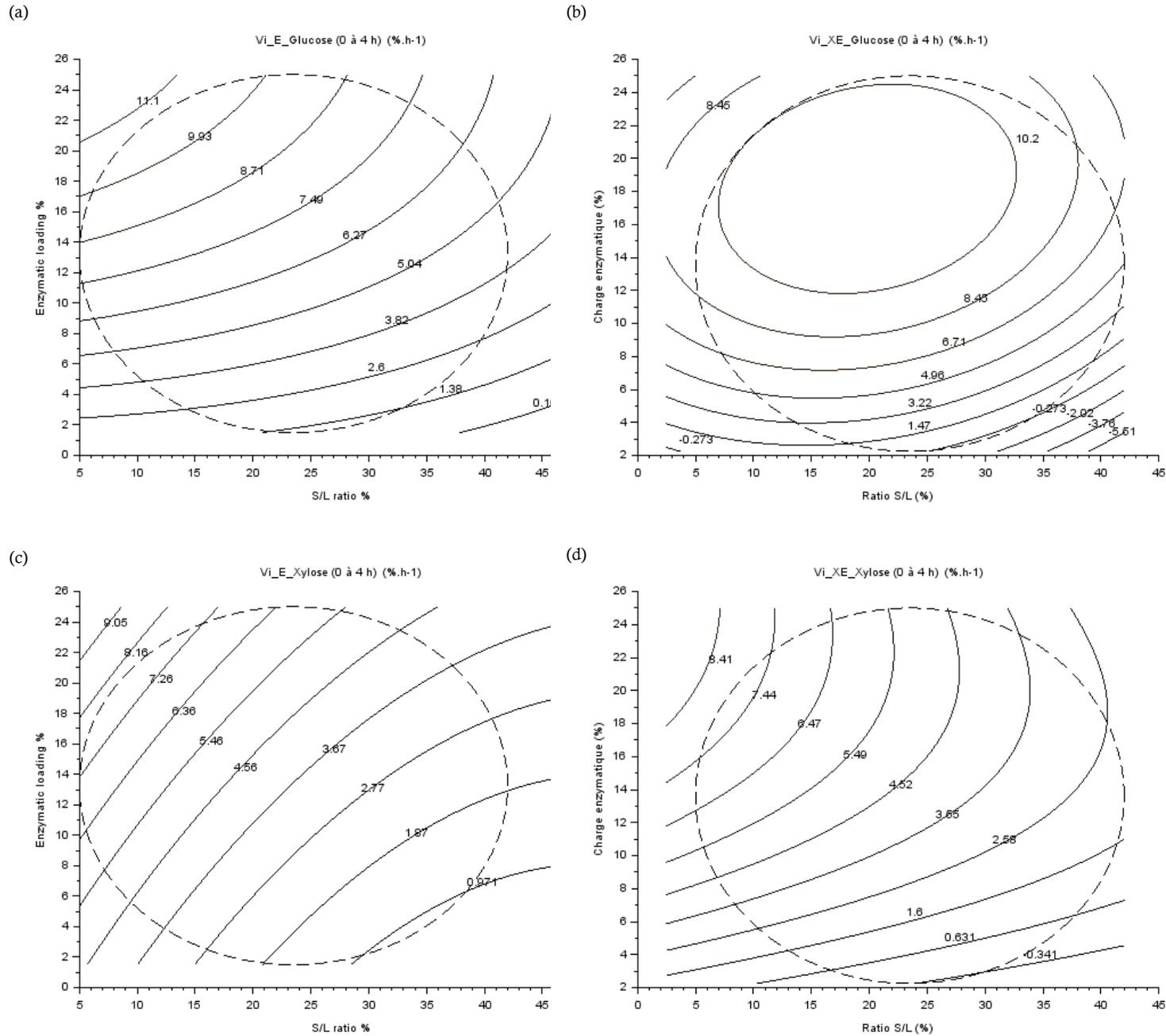
2.1.1.8.3. Influence de la bioextrusion sur la vitesse de conversion des sucres.

Les vitesses initiales de conversion du glucose et de xylose avec (XE) et sans (E) bioextrusion sont présentées sur les Graphique 2-24. Afin de pouvoir comparer ces vitesses, elles sont calculées cette fois de 0 à 4 h.

Les vitesses initiales de conversion du glucose sont plus élevées avec bioextrusion préalable. La différence est surtout visible pour les concentrations enzymatiques supérieures à 8%. En effet, la zone maximale visible sur la surface de réponse avec bioextrusion (Graphique 2-24a) s'étend sur une plage de ratios S/L bien plus large que sans bioextrusion (Graphique 2-24b). Cette différence traduit un écart plus important entre a_2 et a_1 en valeurs absolues, indiquant une plus forte influence du ratio S/L sans bioextrusion et une plus forte influence de la charge enzymatique avec bioextrusion. Ces résultats soulignent une accélération de la conversion du glucose permise par l'étape de bioextrusion.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.



Graphique 2-24 : Surfaces de réponse pour les vitesses initiales (entre 0 et 4 h) de conversion du glucose (a et b) et du xylose (c et d) sans (a et c) et avec (b et d) bioextrusion. Les cercles en pointillés délimitent les domaines de définition des plans d'expérience.

Les modèles, et par conséquent, les surfaces de réponses obtenues à partir des vitesses initiales de conversion du xylose sont, eux, similaires (Graphiques 2-24a et b Tableau 2-15). Les valeurs ainsi que la forme des surfaces sont comparables. Il est cependant à noter que pour les très faibles concentrations enzymatiques (< 6%), les vitesses initiales semblent plus élevées sans bioextrusion préalable.

Tableau 2-15 : Caractéristiques des modèles obtenus pour les vitesses initiales avec (XE) et sans (E) bioextrusion de conversions du glucose et du xylose.

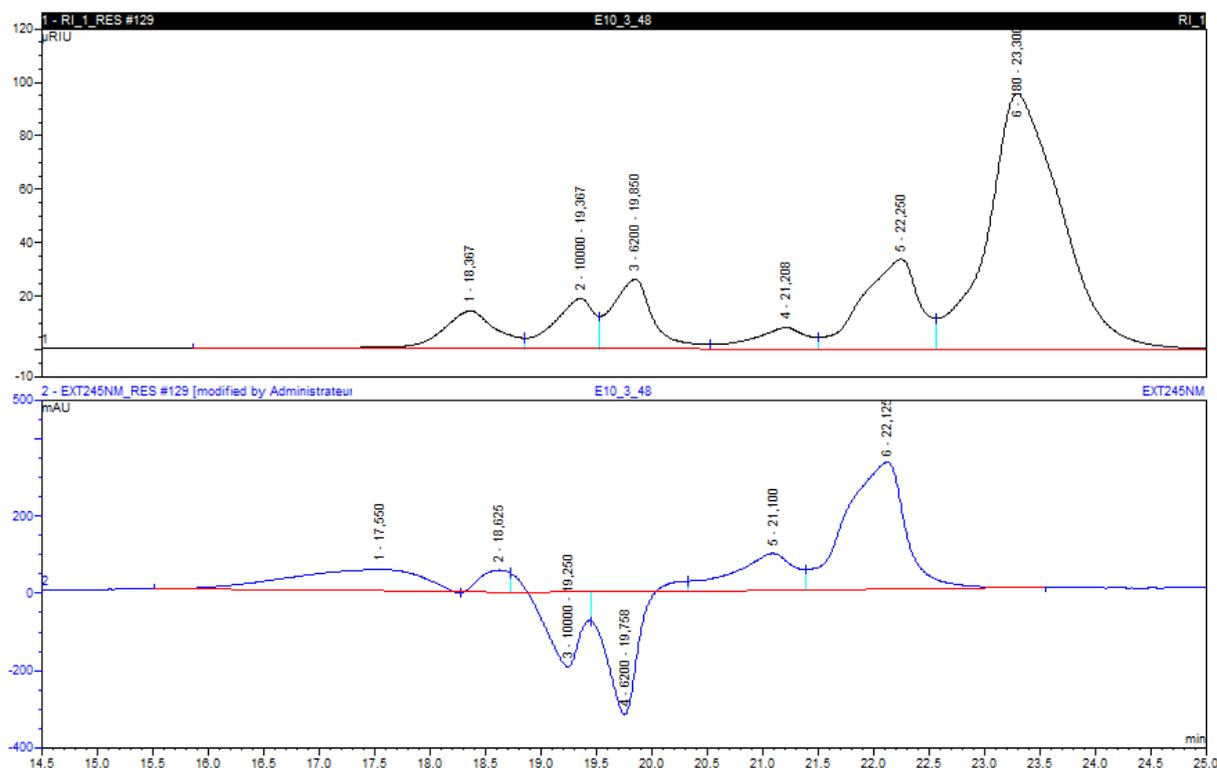
	Avec bioextrusion (XE)		Sans bioextrusion (E)	
	V _i Glucose	V _i Xylose	V _i Glucose	V _i Xylose
	Unités codées			
a0	10,88***	4,40***	6,11***	3,10**
a1	-1,69*	-2,55***	-2,78***	-2,69**
a2	4,80***	2,80***	3,93***	2,23*
a11	-4,23**	0,21	-0,50	1,34
a22	-5,77***	-1,83*	-1,21**	0,20
a12	1,65	-1,26	-1,26*	-0,39
R²	0,94	0,94	0,99	0,97

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

2.1.1.8.4. Influence de la bioextrusion sur les masses moléculaires en milieu aqueux.

La Graphique 2-25 présente les chromatogrammes de l'expérience 3', sans bioextrusion, après 48 h d'hydrolyse. L'allure générale du signal RI est similaire à celle du chromatogramme observé avec bioextrusion en Graphique 2-25. Le pic numéro 2 est cependant plus nettement séparé en deux pics distincts (pics 2 et 3). Les signaux UV à 245 nm présentent quant à eux des différences visibles au niveau des masses moléculaires les plus élevées. Il n'y a pas de pic clairement individualisé sans bioextrusion, et un signal négatif semble associé au pic positif des plus hautes masses moléculaires visibles en RI.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.



Graphique 2-25 : Chromatogrammes RI et UV (245 nm) de la CES de l'expérience 3', sans bioextrusion après 48 h d'hydrolyse.

Les fractions correspondant à des \bar{M}_m supérieures à 700 Da sont aussi principalement influencées par le ratio S/L. Elles sont nettement plus élevées dans les milieux à hautes concentrations en substrat (ratio S/L > 12,5%) des échantillons sans bioextrusion (E). À l'inverse, la fraction correspondante à de petits oligomères (entre 600 et 700 Da, pic 6) est nettement plus élevée avec bioextrusion. Ces résultats sont représentés sous la forme d'un ratio, des fractions avec des \bar{M}_m supérieure à 700 Da (pics 1, 2, 3 et 4 en RI) sur la fraction de petits oligomères (600 à 700 Da, pic 5 en RI) (Graphiques 2-25 a et b). La comparaison entre ce ratio à 24 h avec (XE) et sans (E) bioextrusion indique clairement des ratios plus élevés sans bioextrusion, particulièrement pour les hauts ratios S/L (Graphiques 2-26 a et b). Dans le cas sans bioextrusion, une augmentation progressive de ce ratio traduit l'augmentation au cours du temps des fractions avec les plus grosses masses moléculaires. Le facteur a_2 significatif, associé à ce modèle, montre par ailleurs une influence non négligeable de la charge enzymatique sur ce ratio. Dans le cas avec bioextrusion, il n'y a pas d'évolution claire du ratio, qui semble traduire un équilibre dans le milieu réactionnel au cours du temps. L'écart des ratios avec et sans bioextrusion s'accroît donc au cours du temps.

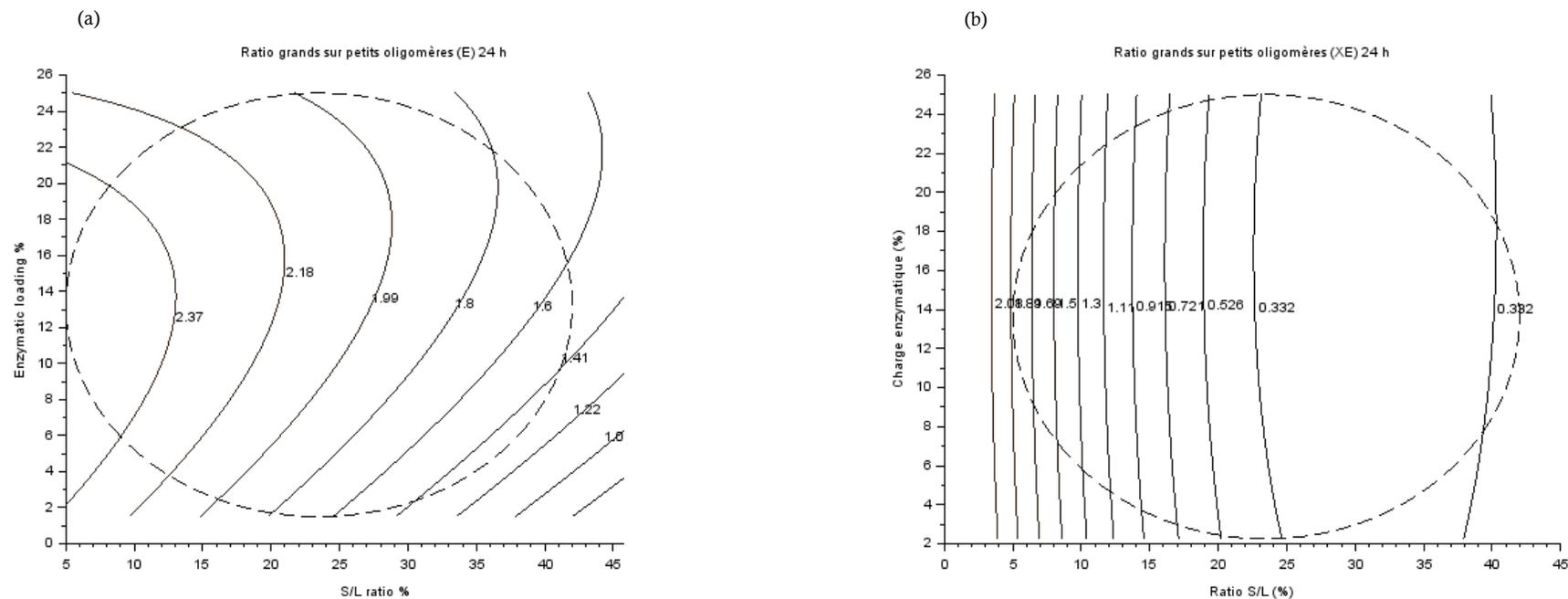
Du fait de l'influence majeure du ratio S/L (Tableau 2-16), les fractions avec une M_m supérieure à 700 Da sont probablement issues d'un phénomène d'extraction liquide de composés. Ces fractions polysaccharidiques ou associant polysaccharides et résidus ligneux, sont réduites après l'utilisation de l'étape de bioextrusion. À l'inverse, les petits oligomères, composés de 3 à 4 monomères saccharidiques et phénoliques, sont favorisés pour cette étape. Les actions thermomécaniques et/ou biochimiques semblent limiter les plus grosses masses moléculaires et favoriser de plus petites fractions, sur le court et long terme. Ces petites fractions

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

comportant une partie non saccharidique, avec des liaisons non osidiques, ne sont plus hydrolysables par l'action enzymatique.

Sans pouvoir clairement conclure sur le lien existant entre les fractions avec des \bar{M}_m élevées et celles avec des \bar{M}_m faibles, les deux semblent influencées par l'étape de bioextrusion. Il est possible que des hétéropolymères, composés de glucides et de phénols associés, soient dégradés par l'effet thermomécanique et/ou biochimique de la bioextrusion. Une fois la partie saccharidique hydrolysée, les petits hétéro-oligomères ne peuvent plus être catalysés par l'action enzymatique et s'accumulent dans le milieu réactionnel.

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.



Graphique 2-26 : Surfaces de réponse obtenues pour les ratios des fractions avec des \bar{M}_m supérieures à 700 Da sur la fraction de petits oligomères (600 à 700 Da) à 24 h, sans (a) et avec (b) bioextrusion. Le cercle en pointillés délimite le domaine de définition du plan d'expérience.

Tableau 2-16 : Caractéristiques des modèles obtenus pour les ratios des fractions avec des \bar{M}_m supérieures à 700 Da sur la fraction de petits oligomères (600 à 700 Da) à 24 h, sans (E) et avec (XE) bioextrusion.

	E	XE
	Unités codées	
a0	1,98***	0,35**
a1	-0,65**	-0,90***
a2	0,21*	-0,03
a11	-0,08	0,97***
a22	-0,29*	0,05
a12	0,29	-0,01
R²	0,983	0,953

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

1.1.1.1.1. Discussions et conclusions

L'étape de bioextrusion permet visiblement une amélioration de la conversion finale et de la vitesse initiale de conversion du glucose. Les améliorations de rendement en fin d'hydrolyse sont à associer à une amélioration cinétique des vitesses de conversion entre 0 et 4 h. Ces effets positifs sont particulièrement visibles dans des conditions de ratio S/L et de charge enzymatique élevés. Cela permet de supposer que l'extrusion agit particulièrement en limitant les contraintes liées à la concentration en substrat et en enzymes pour la dégradation de la cellulose. Néanmoins, l'étape de bioextrusion présente une influence clairement négative quant à la conversion du xylose. Cette diminution de la conversion s'observe particulièrement pour les faibles concentrations enzymatiques.

En ce qui concerne les masses moléculaires, des différences s'observent pour les fractions hétérogènes associant résidus ligneux et carbohydrates. Il semble que les fractions ayant les plus hautes \bar{M}_m soient réduites au profit des plus petites après bioextrusion. Cela peut indiquer une influence positive de la bioextrusion sur la dégradation des LCC (complexes lignine-carbohydrate).

1.2. Conclusion du chapitre

En recoupant les informations sur les bioextrudats et issues de la comparaison sans bioextrusion, une nette différence de comportement hydrolytique se dégage. Les conversions et vitesses de conversion diffèrent entre la sortie de la bioextrusion et le reste de la cinétique. Les optima sont alors plutôt situés pour des charges enzymatiques et des ratios S/L élevés. C'est aussi dans ces conditions que s'observe des gains intéressants en termes de conversion du glucose. Les conditions intenses de mélange distributif et dispersif en bioextrusion limitent les contraintes liées aux hautes concentrations en substrat et en enzymes décrites en introduction. Cependant elles semblent aussi être responsable d'une diminution de la production de xylose et d'arabinose, sans pouvoir conclure sur l'état d'avancement de la déconstruction des hémicelluloses ni l'activité des hémicellulases. Ce mélange implique une association intime entre les enzymes et le substrat. Plus la concentration en substrat est élevée et plus la part d'enzymes libres en milieu liquide diminue.

Le prétraitement alcalin de la paille de blé utilisée provoque une déstructuration et dégradation partielle des fractions ligneuses et hémicellulosiques. Cela peut contribuer à la formation de complexes lignine-carbohydrate dans le milieu, observés en CES. Ceux-ci forment un substrat complexe pour l'hydrolyse enzymatique. L'étape de bioextrusion semble limiter les fractions de hautes \bar{M}_m . Cependant une accumulation de petits hétérooligomères, non-hydrolysable par voie enzymatique, s'observe dans le milieu liquide.

L'hydrolyse secondaire, des carbohydrates solubles en milieu aqueux, est très rapide (Zhang and Lynd, 2004a). Si les analyses de la fraction liquide permettent d'observer les produits finaux de conversion, ce n'est qu'une technique indirecte de mesure de la dégradation de la biomasse. En effet, une des étapes clef de l'hydrolyse est l'hydrolyse primaire, concernant la catalyse enzymatique directement sur le substrat solide (Zhang and Lynd, 2004a). Il est probable qu'une partie des informations relatives à la dégradation de la biomasse se trouve sur cette fraction solide. Le prochain chapitre s'intéresse donc au résidu solide d'hydrolyse afin d'observer d'autres informations pouvant clarifier les phénomènes mis en jeu lors de la

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

bioextrusion pour la dégradation de la lignocellulose. La figure 2-8 suivante permet de faire la synthèse des différentes conditions optimales observées sur les surfaces de réponse.

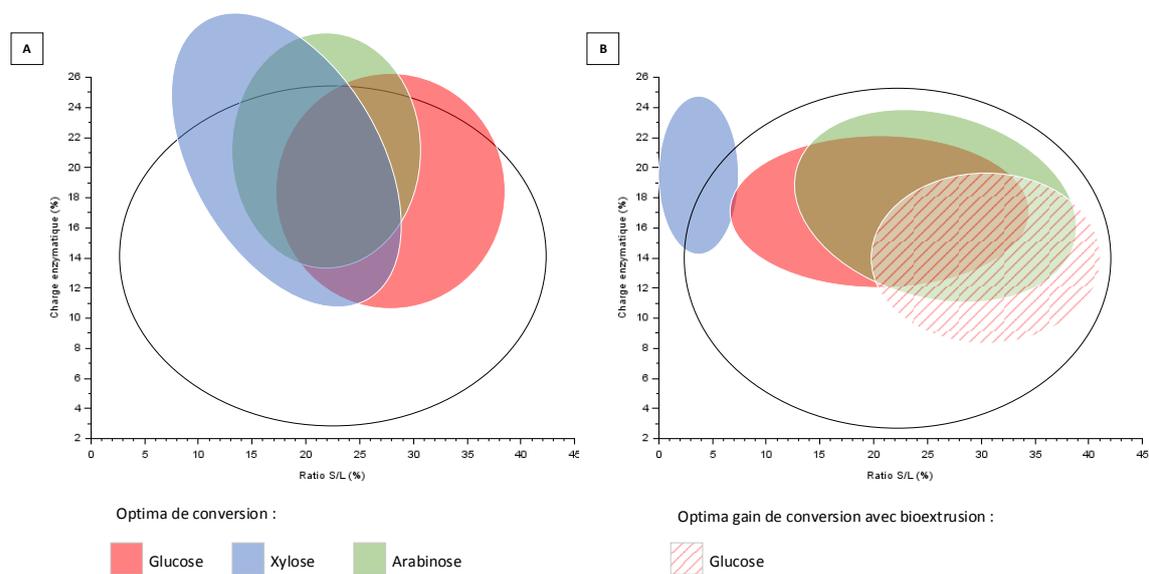


Figure 2-8 : Schéma de synthèse des différents optima observés par plans d'expérience. A, optima observés à la sortie de la bioextrusion (0,25 h) ; B, optima observés après 48 h d'hydrolyse post-bioextrusion. Le cercle noir délimite le domaine de définition des plans d'expérience.

1.3. Références

- Abdul Khalil, H.P.S., Bhat, A.H., Ireana Yusra, A.F., 2012. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. *Carbohydr. Polym.* 87, 963–979. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.078>
- Adler, E., 1977. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11, 169–218. <https://doi.org/10.1007/BF00365615>
- Allen, S.G., Schulman, D., Lichwa, J., Antal, M.J., Laser, M., Lynd, L.R., 2001. A Comparison between Hot Liquid Water and Steam Fractionation of Corn Fiber. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40, 2934–2941. <https://doi.org/10.1021/ie990831h>
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Baks, T., Kappen, F.H.J., Janssen, A.E.M., Boom, R.M., 2008. Towards an optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch–water mixtures with alpha-amylase from *B. licheniformis*. *J. Cereal Sci.* 47, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.03.011>
- Béguin, P., Aubert, J.-P., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>
- Beldman, G., Leeuwen, M.F.S.-V., Rombouts, F.M., Voragen, F.G.J., 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* 146, 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08653.x>
- Bidlack, J., 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants, in: *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. pp. 51–56.
- Biely, P., 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286–290. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(85\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(85)90004-6)
- Bouvier, J.-M., Campanella, O.H., 2014. *Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials*. John Wiley & Sons.
- Brown, S.B., 1991. Chemical Processes Applied to Reactive Extrusion of Polymers. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 21, 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.ms.21.080191.002205>
- Calvo-Flores, F.G., Dobado, J.A., 2010. Lignin as Renewable Raw Material. *ChemSusChem* 3, 1227–1235. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000157>
- Chen, Q., Marshall, M.N., Geib, S.M., Tien, M., Richard, T.L., 2012. Effects of laccase on lignin depolymerization and enzymatic hydrolysis of ensiled corn stover. *Bioresour. Technol.* 117, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.085>

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- Choudhury, G.S., Gogoi, B.K., 1996. Protease Inactivation in Fish Muscle by High Moisture Twin-Screw Extrusion. *J. Food Sci.* 61, 1219–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10964.x>
- Chouvel, H., Chay, P., Cheftel, J., 1983. Enzymatic hydrolysis of starch and cereal flours at intermediate moisture contents in a continuous extrusion-reactor. *Lebensm.-Wiss. Technol. Food Sci. Technol.*
- Davin, L.B., Lewis, N.G., 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 407–415. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.06.011>
- De Choudens, C., Angelier, R., Combette, P., 1984. Pâtes mécaniques de résineux, pâtes chimicomécaniques de feuillus: nouveau procédé de fabrication. *Rev.-ATIP* 38, 405–417.
- De Choudens, C., Angelier, R., Combette, P., Lesas, C., 1989. Procédé de fabrication de pâtes chimicomécaniques ou chimicothermo-mécaniques blanchies. Patent 87, 11082.
- de Mesa-Stonestreet, N.J., Alavi, S., Gwartz, J., 2012. Extrusion-enzyme liquefaction as a method for producing sorghum protein concentrates. *J. Food Eng.* 108, 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.07.024>
- Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2012. CELLULOSE DEGRADATION BY OXIDATIVE ENZYMES. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2, e201209015. <https://doi.org/10.5936/csbj.201209015>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., González, A., Ballesteros, M., 2014. Sugar production from barley straw biomass pretreated by combined alkali and enzymatic extrusion. *Bioresour. Technol.* 158, 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.041>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, I., Negro, M.J., Oliva, J.M., Saez, F., Ballesteros, M., 2013. Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 48, 775–781. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.003>
- Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2017. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: Fundamentals and applications. *Renew. Energy* 114, 1427–1441. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.06.050>
- Ebringerová, A., 2005. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromol. Symp.* 232, 1–12. <https://doi.org/10.1002/masy.200551401>
- Fan, L., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987. Enzymatic Hydrolysis, in: *Cellulose Hydrolysis, Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 21–119. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72575-3_3

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- Fretzdorff, B., Seiler, K., 1987. The effects of twin-screw extrusion cooking on cereal enzymes. *J. Cereal Sci.* 5, 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(87\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(87)80012-7)
- Garrote, G., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2001. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. *Process Biochem.* 36, 571–578. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00253-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00253-3)
- Gasser, C.A., Hommes, G., Schäffer, A., Corvini, P.F.-X., 2012. Multi-catalysis reactions: new prospects and challenges of biotechnology to valorize lignin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1115–1134. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4178-x>
- Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gomes, D., Rodrigues, A.C., Domingues, L., Gama, M., 2015. Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4131–4143. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6535-z>
- Govindasamy, S., 1995. Influence of extrusion variables on subsequent saccharification behaviour of sago starch. *Food Chem.* 54, 289–296. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00049-O](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00049-O)
- Govindasamy, S., Campanella, O.H., Oates, C.G., 1997a. Enzymatic hydrolysis of sago starch in a twin-screw extruder. *J. Food Eng.* 32, 403–426. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00017-4)
- Govindasamy, S., Campanella, O.H., Oates, C.G., 1997b. The single screw extruder as a bioreactor for sago starch hydrolysis. *Food Chem.* 60, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00100-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00100-8)
- Grohman, K., Torget, R., 1985. Optimization of Dilute Acid Pretreatment of Biomass”, *Biotechnol. Bioeng.* 15.
- Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O., Biliaderis, C.G., 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 373–403. <https://doi.org/10.1080/10408399509527706>
- Hakulin, S., Linko, Y.-Y., Linko, P., Seiler, K., Seibel, W., 1983. Enzymatic Conversion of Starch in Twin-Screw HTST-Extruder. *Starch - Stärke* 35, 411–414. <https://doi.org/10.1002/star.19830351203>
- Harper, J.M., 1981. Extrusion of foods. CRC press.
- Hébert-Ouellet, Y., Meddeb-Mouelhi, F., Khatri, V., Cui, L., Janse, B., MacDonald, K., Beauregard, M., 2017. Tracking and predicting wood fibers processing with fluorescent carbohydrate binding modules. *Green Chem.* 19, 2603–2611. <https://doi.org/10.1039/C6GC03581G>

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100, 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Ivanova, V.N., Dobрева, E.P., Emanuilova, E.I., 1993. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biotechnol.* 28, 277–289.
[https://doi.org/10.1016/0168-1656\(93\)90176-N](https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90176-N)
- Janssen, L.P., 2004. Reactive extrusion systems. CRC Press.
- Kabel, M.A., Carneiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajó, J.C., Gírio, F.M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 2002. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 50, 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00045-0)
- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2013. Thermo-Mechanical Pretreatment of Feedstocks, in: Gu, T. (Ed.), *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 31–65.
- Kaya, F., Heitmann, J.A., Joyce, T.W., 1994. Cellulase binding to cellulose fibers in high shear fields. *J. Biotechnol.* 36, 1–10. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(94\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0168-1656(94)90016-7)
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 3358–3393.
<https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W., 1998. Comprehensive cellulose chemistry. Volume 1: Fundamentals and analytical methods. *Compr. Cellul. Chem. Vol. 1 Fundam. Anal. Methods*.
- Kubicek, C.P., 2013. Fungi and Lignocellulosic Biomass, in: *Fungi and Lignocellulosic Biomass, Biomass and Biofuels Series*. pp. 1–15 & 99–118.
- Kurdin, J., Bohn, W., 1984. Mechanical pulping by extrusion, in: *1984 Pulping Conference*.
- La tige de Maïs, 2013. . *Cours Biol*.
- About, J.J.M., 1985. Conversion of Liquified Starch into Glucose Using a Novel Glucoamylase System. *Starch - Stärke* 37, 157–161.
<https://doi.org/10.1002/star.19850370504>
- Latieule, S., 2015. Lignine, une matière première qui monte. *Formule Verte* 26–31.
- Lawton, B.T., Henderson, G.A., Derlatka, E.J., 1972. The effects of extruder variables on the gelatinisation of corn starch. *Can. J. Chem. Eng.* 50, 168–172.
<https://doi.org/10.1002/cjce.5450500205>

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Biotechnol.* 56, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(97\)00073-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4)
- Li, H., Jiao, A., Xu, X., Wu, C., Wei, B., Hu, X., Jin, Z., Tian, Y., 2013. Simultaneous saccharification and fermentation of broken rice: an enzymatic extrusion liquefaction pretreatment for Chinese rice wine production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36, 1141–1148. <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0868-0>
- Ling, S., Kaplan, D.L., Buehler, M.J., 2018. Nanofibrils in nature and materials engineering. *Nat. Rev. Mater.* 3, 18016. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2018.16>
- Linko, P., Antila, J., Olkku, J., 1978. Retention of amylolytic activity in HTST-extrusion cooking. *Kem.-Kemi* 5, 691.
- Linko, P., Colonna, P., Mercier, C., 1981. High-temperature, short-time extrusion cooking [Cereal products]. *Adv. Cereal Sci. Technol.*
- Linko, P., Hakulin, S., Linko, Y.-Y., 1983a. Extrusion cooking of barley starch for the production of glucose syrup and ethanol. *J. Cereal Sci.* 1, 275–284. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(83\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(83)80015-0)
- Linko, P., Linko, Y.-Y., Olkku, J., 1983b. Extrusion cooking and bioconversions. *J. Food Eng.* 2, 243–257. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(83\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0260-8774(83)90014-6)
- Liu, J., Wang, X., Xu, D., 2010. QM/MM Study on the Catalytic Mechanism of Cellulose Hydrolysis Catalyzed by Cellulase Cel5A from *Acidothermus cellulolyticus*. *J. Phys. Chem. B* 114, 1462–1470. <https://doi.org/10.1021/jp909177e>
- Martínez, Á.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., 2009. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.002>
- Mercier, C., Feillet, P., 1975. Modification of carbohydrate components by extrusion-cooking of cereal products [Wheat, rice, corn]. *Cereal Chem.*
- Merino, S.T., Cherry, J., 2007. Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization, in: Olsson, L. (Ed.), *Biofuels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 95–120.
- Miller, G., 1963. Cellodextrins. *Methods Carbohydr Chem* 3, 134–139.
- Montague, L., Slayton, A., Lukas, J., 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. NREL Technical Report 2002.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I., 2007. “Blue” laccases. *Biochem. Mosc.* 72, 1136–1150. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- N'Diaye, S., Rigal, L., Larocque, P., Vidal, P.F., 1996. Extraction of hemicelluloses from poplar, *Populus tremuloides*, using an extruder-type twin-screw reactor: A feasibility study. *Bioresour. Technol.* 57, 61–67. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00041-7](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00041-7)
- Nishiyama, Y., Johnson, G.P., French, A.D., Forsyth, V.T., Langan, P., 2008. Neutron Crystallography, Molecular Dynamics, and Quantum Mechanics Studies of the Nature of Hydrogen Bonding in Cellulose I β . *Biomacromolecules* 9, 3133–3140. <https://doi.org/10.1021/bm800726v>
- Norman, B.E., 1981. New Developments in Starch Syrup Technology, in: Birch, G.G., Blakebrough, N., Parker, K.J. (Eds.), *Enzymes and Food Processing*. Springer Netherlands, pp. 15–50. https://doi.org/10.1007/978-94-011-6740-6_3
- Ogawa, K., Takenaka, Y., Sada, M., Kobayashi, T., 1994. Production of Concentrated Sugar Solution from Starch. *JPH06261781 (A)*.
- O'sullivan, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4, 173–207. <https://doi.org/10.1023/A:1018431705579>
- Pereira, A.N., Mobedshahi, M., Ladisch, M.R., 1988. Preparation of cellodextrins, in: *Methods in Enzymology, Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose*. Academic Press, pp. 26–38. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60104-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60104-2)
- Reddy, N., Yang, Y., 2005. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends Biotechnol.* 23, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.002>
- Rehm, H., Reed, G., 1998. *Biotechnology*, Vol. 8a: Biotransformations I. Wiley-VCH, Weinheim.
- Reinikainen, P., Suortti, T., Olkku, J., Mälkki, Y., Linko, P., 1986. Extrusion Cooking in Enzymatic Liquefaction of Wheat Starch. *Starch - Stärke* 38, 20–26. <https://doi.org/10.1002/star.19860380106>
- Roland, J.-C., Roland, F., Bouteau, F., El-Maarouf-Bouteau, H., 2008. *Atlas de biologie végétale - 9ème édition Organisation des plantes à fleurs*, Dunod. ed, Sciences Sup.
- Ropars, M., Marchal, R., Pourquoié, J., Vandecasteele, J.P., 1992. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures. *Bioresour. Technol.* 42, 197–204. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90023-Q](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90023-Q)
- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., 1996. Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 402–420. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)80004-F](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80004-F)
- Rubio, M., Tortosa, J.F., Quesada, J., Gómez, D., 1998. Fractionation of lignocellulosics. Solubilization of corn stalk hemicelluloses by autohydrolysis in aqueous medium. *Biomass Bioenergy* 15, 483–491. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(98\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(98)00054-3)

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- Saha, B.C., 2000. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18, 403–423. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00044-6)
- Saloheimo, M., Lehtovaara, P., Penttilä, M., Teeri, T.T., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., Claeysens, M., Tomme, P., Knowles, J.K.C., 1988. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: the characterization of both gene and enzyme. *Gene* 63, 11–21. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90541-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90541-0)
- Samaniuk, J.R., Tim Scott, C., Root, T.W., Klingenberg, D.J., 2011. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresour. Technol.* 102, 4489–4494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.117>
- Sengupta, Saswati, Ghosh, A.K., Sengupta, Subhabrata, 1991. Purification and characterisation of a β -glucosidase (cellobiase) from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1076, 215–220. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(91\)90269-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(91)90269-6)
- Speranza, A., Calzoni, G., Tastemain, C., 2005. *Atlas de la structure des plantes*. Belin Ed. Berl. Ger. 125–203.
- Su, W., Mu, Y., Wang, Y., Yang, F., Xie, C., Qin, L., 2014. Technology for producing starch syrup by employing enzymatic extrusion of broken rice. CN103642877 (A).
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Torget, R., Walter, P., Himmel, M., Grohmann, K., 1991. Dilute-Acid Pretreatment of Corn Residues and Short-Rotation Woody Crops. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28–29, 75. <https://doi.org/10.1007/BF02922590>
- Torget, R.W., Kim, J.S., Lee, Y.Y., 2000. Fundamental Aspects of Dilute Acid Hydrolysis/Fractionation Kinetics of Hardwood Carbohydrates. 1. Cellulose Hydrolysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39, 2817–2825. <https://doi.org/10.1021/ie990915q>
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30, 1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- van Zuilichem, D.J., van Roekel, G.J., Stolp, W., van't Riet, K., 1990. Modelling of the enzymatic conversion of cracked corn by twin-screw extrusion cooking. *J. Food Eng.* 12, 13–28. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(90\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0260-8774(90)90016-2)
- Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez-Melendez, O., Evon, P., Barzana, E., Vilarem, G., Rigal, L., 2016. Suitability assessment of a continuous process combining thermo-

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

- mechano-chemical and bio-catalytic action in a single pilot-scale twin-screw extruder for six different biomass sources. *Bioresour. Technol.* 211, 146–153.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.072>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., 2014. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Ind. Crops Prod.* 55, 258–266.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Rigal, L., 2015. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Ind. Crops Prod.* 67, 239–248.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.041>
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol.* 153, 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Vasanthan, T., Yeung, J., Hoover, R., 2001. Dextrinization of Starch in Barley Flours with Thermostable alpha-Amylase by Extrusion Cooking. *Starch - Stärke* 53, 616–622.
[https://doi.org/10.1002/1521-379X\(200112\)53:12<616::AID-STAR616>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-379X(200112)53:12<616::AID-STAR616>3.0.CO;2-M)
- Vergnes, B., Berzin, F., 2004. Modelling of flow and chemistry in twin screw extruders. *Plast. Rubber Compos.* 33, 409–415. <https://doi.org/10.1179/174328904X24916>
- Vergnes, B., Chapet, M., 2016. Extrusion Procédés d'extrusion bivis. Tech. Ing. Plasturgie Procédés Extrus. base documentaire : TIB150DUO.
- Vilarem, G., Rigal, L., Vandenbossche, V., Brault, J., Hernandez, L.M., Hernandez, M., Vivaldo-Lima, E., Barzana, E., Ballesteros, M., Duque, A., Manzanares, P., Siika-aho, M., Uusitalo, J.M., Mata-Segreda, J., Guillouet, S., Lombart, E., Cameleyre, X., 2014. Procédé de traitement enzymatique d'une matière ligno-cellulosique solide. WO2013182827A8.
- Villaverde, J.J., Li, J., Ek, M., Ligeró, P., de Vega, A., 2009. Native Lignin Structure of *Miscanthus x giganteus* and Its Changes during Acetic and Formic Acid Fractionation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6262–6270. <https://doi.org/10.1021/jf900483t>
- Xu, E., Wu, Z., Jiao, A., Long, J., Li, J., Jin, Z., 2017. Dynamics of rapid starch gelatinization and total phenolic thermomechanical destruction moderated via rice bio-extrusion with alpha-amylase activation. *RSC Adv* 7, 19464–19478.
<https://doi.org/10.1039/C7RA00477J>
- Xu, E., Wu, Z., Wang, F., Li, H., Xu, X., Jin, Z., Jiao, A., 2015. Impact of High-Shear Extrusion Combined With Enzymatic Hydrolysis on Rice Properties and Chinese Rice

Chapitre II : Etude de l'influence de la bioextrusion et des conditions réactionnelles sur l'hydrolyse de la paille de blé.

Wine Fermentation. *Food Bioprocess Technol.* 8, 589–604.

<https://doi.org/10.1007/s11947-014-1429-0>

Zhang, X., Qin, W., Paice, M.G., Saddler, J.N., 2009. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. *Bioresour. Technol.* 100, 5890–5897.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.082>

Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>

Zheng, J., Rehmann, L., 2014. Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 18967–18984. <https://doi.org/10.3390/ijms151018967>

Zhou, Y., Stuart-Williams, H., Farquhar, G.D., Hocart, C.H., 2010. The use of natural abundance stable isotopic ratios to indicate the presence of oxygen-containing chemical linkages between cellulose and lignin in plant cell walls. *Phytochemistry* 71, 982–993. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.001>

Zugenmaier, P., 2001. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Prog. Polym. Sci.* 26, 1341–1417. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00019-3)

3. Chapitre III :

Etude de l'influence de la bioextrusion sur la fraction résiduelle solide

-
- Évaluation du fractionnement de la biomasse par la mesure de l'évolution des différentes classes de tailles de particules.
 - Observations générales et qualitatives de la biomasse et de fraction ligneuse superficielle par microscopie confocale et autofluorescence.
 - Analyse de la composition physico-chimique par infrarouge.
 - Analyse de la décomposition thermique du matériau lignocellulosique et de ses fractions polymériques par thermogravimétrie.
-

3.1. Introduction

La majorité des résultats obtenus pour les plans d'expériences l'ont été à partir de la fraction liquide. Ce sont des méthodes de mesure indirecte de la déconstruction de la biomasse lignocellulosique. De plus, un certain nombre d'informations ne sont pas disponibles dans la fraction liquide. En effet, seuls les produits d'hydrolyse et de déconstruction avec un poids moléculaire assez faible et hydrosolubles sont présents dans cette fraction. L'action décrite des endocellulases et exocellulases au contact de la fraction solide (Béguin and Aubert, 1994; Zhang and Lynd, 2004b) n'est qu'indirectement et partiellement visible dans la fraction liquide.

Il semble donc important de pouvoir analyser les modifications hydrolytiques sur la fraction solide. Cependant l'analyse de cette fraction est particulièrement compliquée, en raison de la complexité et la résistance inhérente à la biomasse lignocellulosique. La composition des fractions majeures (cellulose, hémicelluloses, lignines) est la plupart du temps obtenue à partir de techniques destructives qui dosent indirectement les fractions d'intérêt (Sluiter et al., 2010; Van Soest and Wine, 1968). Un premier problème lié à ces méthodes est la dénaturation des fractions d'intérêt, et notamment la formation de produits de dégradation inexistant à l'origine. Deuxièmement, la déstructuration des matières ne permet pas d'évaluer l'état réel de la matière dans les conditions réactionnelles données. L'utilisation de techniques non destructives pourrait permettre d'avoir des informations sur l'état réel de la structure, de la composition physico-chimique et de la conformation dans les conditions définies de réaction, en limitant la dénaturation des composés présents. Enfin, les informations récoltées sont complémentaires à celles précédemment obtenues par l'analyse des fractions liquides.

3.2. Matériels et méthodes

Deux expériences sont réalisées conjointement, l'une avec mélange préalable par bioextrusion (XE), l'autre non (E). Les conditions de réaction sont les mêmes, un ratio S/L de 28,2% ($\pm 0,8\%$) et une charge enzymatique de 9% ($\pm 0,2\%$) en g de protéines enzymatiques pour 100 g de cellulose. Ces conditions ont été choisies afin de s'approcher des conditions optimales en termes de gain de conversion pour le glucose (cf figure 2-8), tout en limitant l'utilisation d'enzymes coûteuses pour le procédé. Les expériences sont menées en duplicat, en simultané, suivant le même protocole que pour le plan d'expérience présenté précédemment. En parallèle, un témoin de l'influence thermomécanique en bioextrusion est réalisé. La biomasse prétraitée est mélangée avec le tampon, suivant les mêmes conditions d'extrusion que la bioextrusion, mais sans enzymes (X). Des prélèvements sont effectués à t₀ pour les expériences sans bioextrusion, en sortie d'extrusion pour le témoin (X_0,25) et les bioextrudats (XE_0,25), et après 48 h d'hydrolyse pour l'ensemble des expériences (X_48, XE_48, E_48).

3.2.1. Mesures de conversion des sucres

Les valeurs de conversion (P.1.2) à t₀, obtenues sans bioextrusion préalable, sont utilisées comme blancs afin de corriger les sucres présents avant le début de la réaction. Le tableau 3-1 présente les taux de conversion mesurés et corrigés d'après les blancs, suivant différentes conditions de réaction.

Tableau 3-1 : Taux de conversion du glucose et du xylose suivant les différentes conditions réactionnelles.

	Glucose		Xylose	
	Valeur mesurée	Valeur attendue	Valeur mesurée	Valeur attendue
	%	%	%	%
XE_0,25	19,9 ± 2,5	23,2	2,9 ± 2,0	3,7
XE_48	49,0 ± 1,5	51,7	27,6 ± 1,8	28,0
E_48	41,9 ± 3,4	41,4	43,6 ± 2,3	41,6

Les valeurs sont mesurées à la sortie de la bioextrusion (XE_0,25), pour les bioextrudats après 48 h d'hydrolyse enzymatique (XE_48) et après 48 h d'hydrolyse sans bioextrusion préalable (E_48). Les valeurs attendues sont celles calculées d'après les modèles obtenus par les plans d'expérience précédents.

Les taux de conversion obtenus sont assez proches des valeurs attendues par les plans d'expérience réalisés précédemment. Le taux de conversion du glucose est légèrement plus élevé avec bioextrusion. Cependant, celui du xylose est nettement plus faible, confirmant ainsi l'influence négative de la bioextrusion pour la conversion des hémicelluloses, particulièrement pour les hauts ratios S/L.

Cette analyse des taux de conversion, mesurés à partir de la fraction liquide, permet de valider les modèles à 0,25 et 48 h obtenus par les plans d'expérience précédents. De plus, cela confirme que les résidus solides utilisés pour les analyses suivantes sont bien obtenus dans des conditions d'hydrolyse comparables.

3.3. Fractionnement de la biomasse

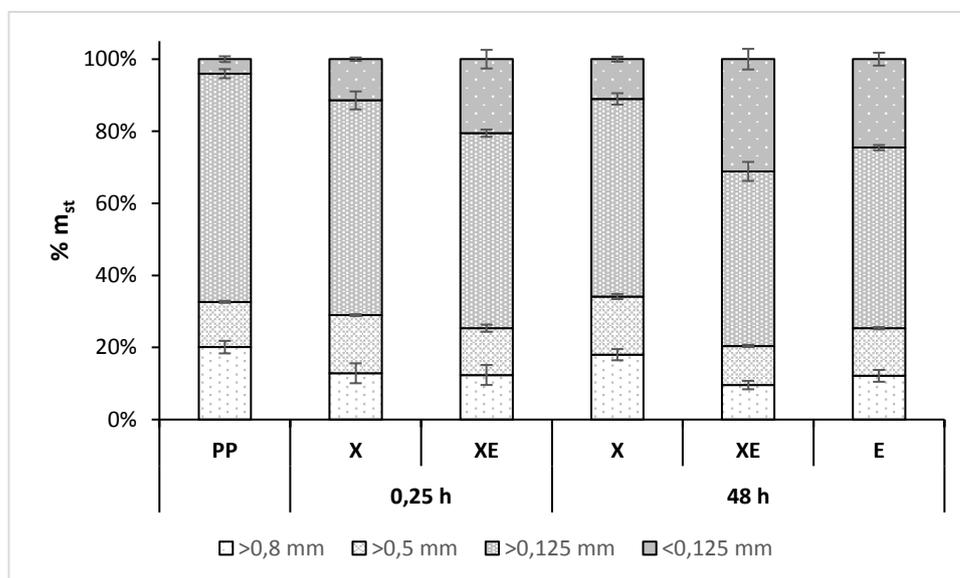
L'étude de la répartition des tailles de particules (P.2.6.2) montre d'importantes disparités suivant les conditions de traitement. Le graphique 3-1 présente cette répartition en fonction des conditions et du temps.

La biomasse initiale PP, utilisée lors des différentes expériences, montre une large fraction des tailles de particules entre 0,5 et 0,125 mm. Seulement 4% en moyenne ont une taille inférieure à 0,125 mm. L'impact thermomécanique de l'étape de bioextrusion (X_0,25) provoque la réduction d'en moyenne -7% de la fraction des plus grosses tailles de particules (>0,8 mm) et la légère augmentation du nombre de plus petites particules. Cela confirme l'existence de contraintes mécaniques non négligeables lors du mélange en extrusion.

L'injection d'enzymes durant le processus d'extrusion a été démontrée précédemment comme permettant une initiation efficace de l'hydrolyse, notamment observée par les taux élevés de conversion des sucres. À cela s'ajoute la comparaison des conditions XE et X à la sortie de l'extrusion. En effet, une nette diminution de la fraction entre 0,5 et 0,125 mm (-9% en moyenne), ainsi qu'une augmentation de la part des plus petites particules (+14%) sont visibles entre XE et X. Cela souligne un fractionnement accéléré de la biomasse grâce à l'introduction d'enzymes lors du procédé. Le fractionnement de la biomasse se poursuit durant le séjour en réacteur fermé. Une différence de -6% pour la fraction entre 0,5 et 0,125 mm et de +10% pour la fraction inférieure à 0,125 mm s'observent entre XE à 0,25 et XE à 48 h.

L'histogramme empilé pour la condition E montre aussi une nette réduction des tailles de particule par rapport à PP. Elle se traduit principalement par une diminution de la fraction supérieure à 0,8 mm (-8% en moyenne), de la fraction entre 0,5 et 0,125 mm (-13% en moyenne) et l'augmentation de la fraction inférieure à 0,125 mm (+20% en moyenne).

En fin de cinétique les histogrammes représentant E et XE sont similaires, ce qui montre que l'influence de la bioextrusion sur le long terme est aussi réduite en termes de déconstruction physique de la biomasse. Cependant de petites différences entre XE et E, en faveur de la bioextrusion sont visibles. La plus petite fraction présente notamment une augmentation de +7% environ pour XE.



Graphique 3-1 : Répartitions des tailles de particules en pourcentage de la matière sèche totale (% mst) suivant les différentes conditions de procédé. PP, paille prétraitée ; X, extrusion sans enzymes suivie d'une hydrolyse en réacteur fermé ; XE, extrusion avec enzymes suivie d'une hydrolyse en réacteur fermé ; E, hydrolyse en réacteur fermé sans bioextrusion préalable. 0,25 h indique la sortie de la bioextrusion.

Le fractionnement de la biomasse se traduit au cours des réactions de déconstruction enzymatique de la biomasse par une réduction de la taille des particules. Deux types de fractionnement sont observés ; un fractionnement physique et un fractionnement biologique. Le fractionnement physique limité conduit principalement à une diminution des plus grosses particules (>0,8 mm). La déconstruction enzymatique est principalement responsable de la production des particules fines (<0,125 mm), probablement issues de la déconstruction de particules plus grosses (>0,125 mm).

3.4. Mesures d'autofluorescence au microscope confocal.

L'autofluorescence des biomasses lignocellulosiques est associée à plusieurs composés de la biomasse (Pandey et al., 1998), mais principalement aux composés poly/monophénoliques et certains extractibles (Albinsson et al., 1999; Lundquist et al., 1978). Les molécules mono/polyphénoliques composant les lignines présentent des spectres d'émission d'autofluorescence proches mais différents. Cependant Lundquist et al., 1978 ont observé que la fraction ligneuse se comporte comme si elle contenait un seul et unique chromophore, qui peut notamment être excité à partir des longueurs d'onde UV. Dans le cas de la paille de blé, des longueurs d'ondes notamment situées dans l'UV (330-380 nm) ont été utilisées afin d'exciter les structures ligneuses (Merali et al., 2013; Parker and Waldron, 1995).

3.4.1. Matériel et méthodes

Un microscope confocal ainsi que deux filtres différents sont utilisés pour les analyses observations et analyses spectroscopiques :

- Un filtre 1 passe longue (excitation = 365 nm, émission = à partir de 397 nm)
- Un filtre 2 passe-bande (excitation = 365 nm, émission = 445/50 nm)

Les détails des protocoles d'observation et de traitement des images sont présentés dans la partie (P.2.7).

Pour cette analyse visuelle, les échantillons ont simplement été séchés à 50°C pendant 48 h et présentent donc un aspect très proche de celui dans le milieu réactionnel. Il faut donc préciser que ces observations microscopiques, ainsi que les émissions d'autofluorescence, sont limitées à la surface des échantillons de biomasse.

3.4.2. Observations microscopiques générales.

Les observations au plus gros grossissement permettent de visualiser la répartition des différentes zones d'autofluorescence dans la biomasse. L'émission autofluorescente captée dans les longueurs d'ondes bleues (445/50 nm) est relativement faible et nécessite un temps d'acquisition élevé (Fig. 3-1b). Cette fluorescence s'observe nettement au niveau des parois cellulaires des cellules parenchymateuses des fragments de paille (Fig. 3-1). Certaines zones ne présentent pas les motifs pariétaux et apparaissent marron avec le filtre 1 (Fig. 3-1a). Des ponctuations s'observent sur ces mêmes zones (Fig. 3-1a et b). Ces ponctuations correspondent aux perforations des vaisseaux xylémiens, très riches en lignines, aussi observables au MEB (Liu et al., 2005). Ces structures sont plus facilement visibles après déstructuration alcaline partielle des hémicelluloses et lignines (Fig. 3-2 a). D'après Parker and Waldron, 1995, la fluorescence bleue turquoise observable avec le filtre 1 est associée à des composés de type féruliques, alors que la fluorescence bleue visible avec le filtre 2 serait associée plus généralement aux lignines.

La comparaison des images obtenues à partir de la paille prétraitée puis bioextrudée (Fig. 3-2, a, c et d) vont dans le sens des résultats observés au niveau des tailles de particules. Une claire réduction des tailles de particule s'observe et un dépôt progressif des plus fines particules s'observe dans le fond de la cellule plastique associé à une fluorescence bleue (Fig. 3-2, c et d). Par ailleurs, les motifs des parois cellulaires bien distincts pour la paille brute (Fig. 3-1) sont moins visibles après prétraitement alcalin (Fig. 3-2 a) et semble déconstruits après 48h d'hydrolyse (Fig. 3-2 d). Ces différents signes vont dans le sens d'une déconstruction progressive de la matière. Celle-ci est entamée dès le prétraitement alcalin et se poursuit visiblement durant la bioextrusion et l'hydrolyse en réacteur fermé.

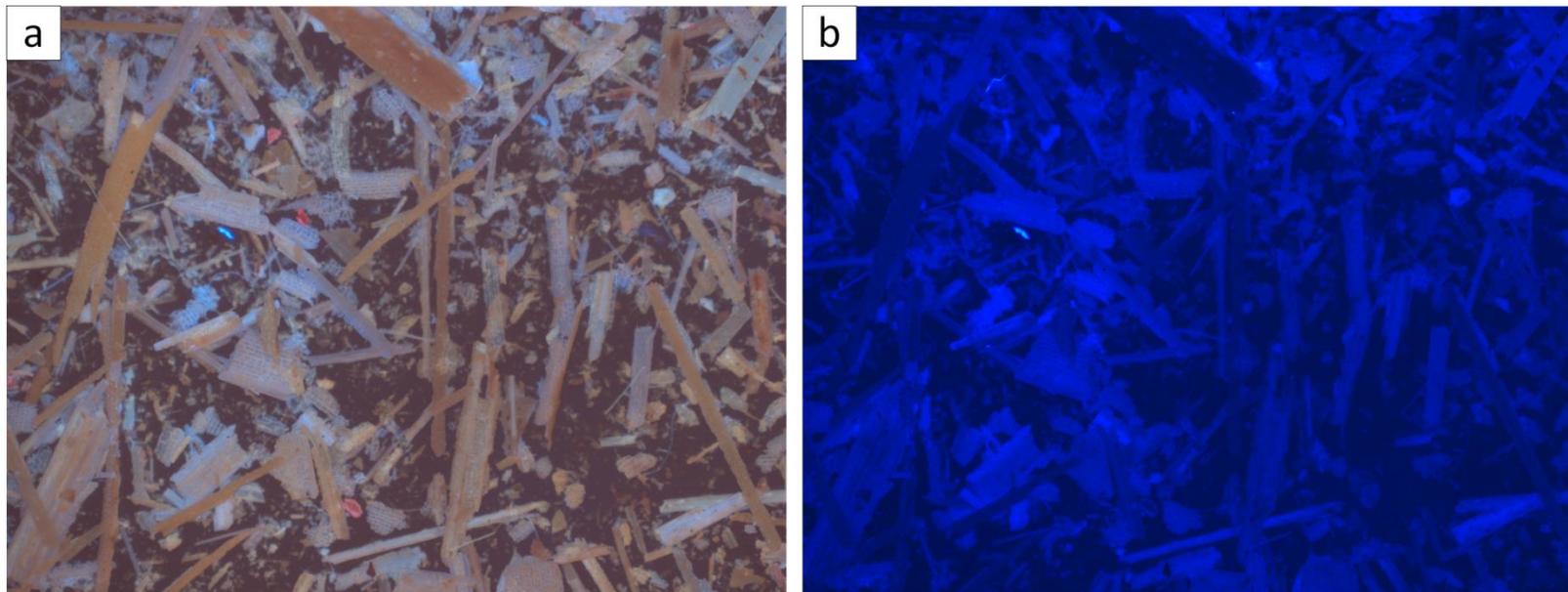


Figure 3-1 : Images par microscopie confocale (x350) de la paille de blé brute suivant le filtre 1 (a) et le filtre 2 (b).

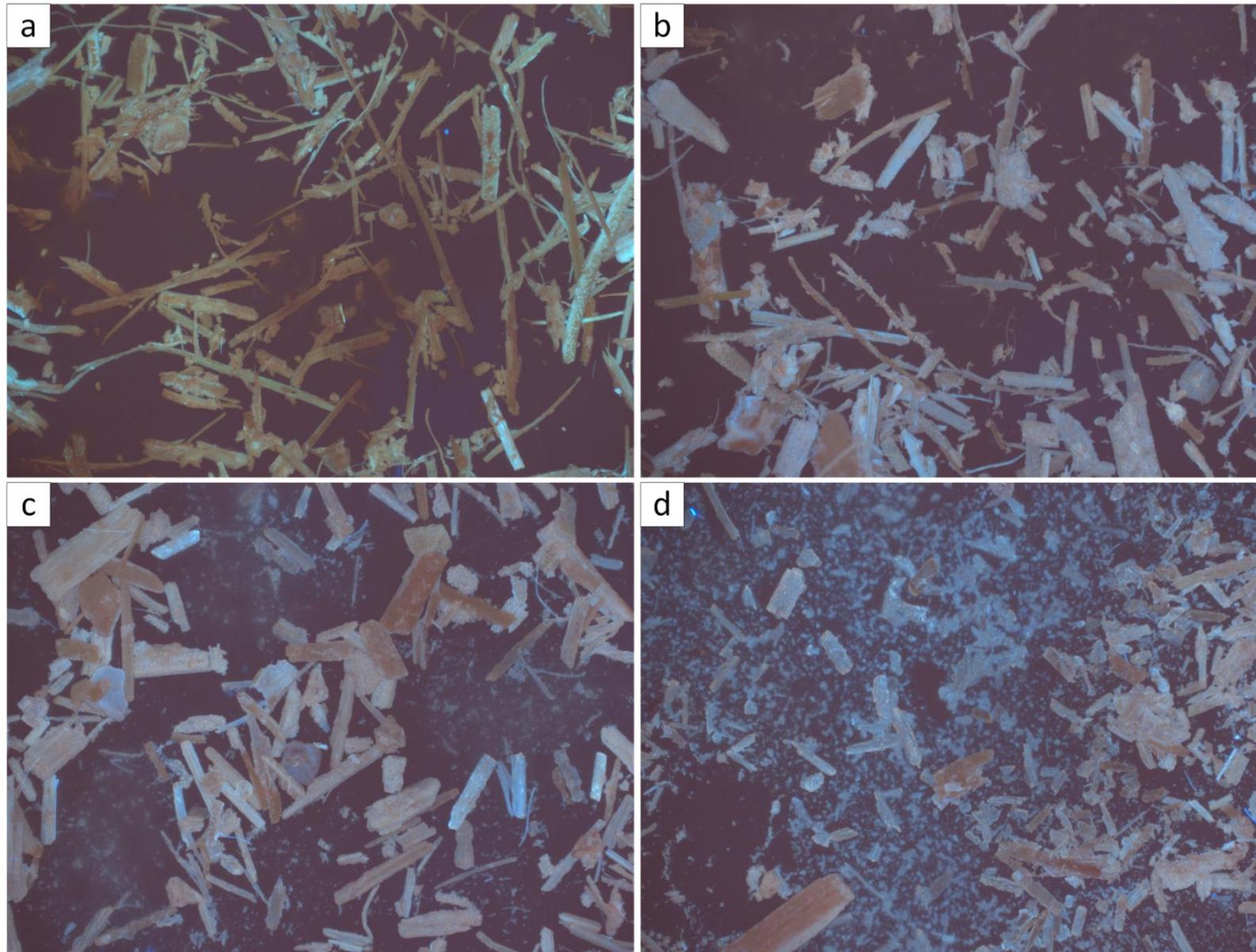
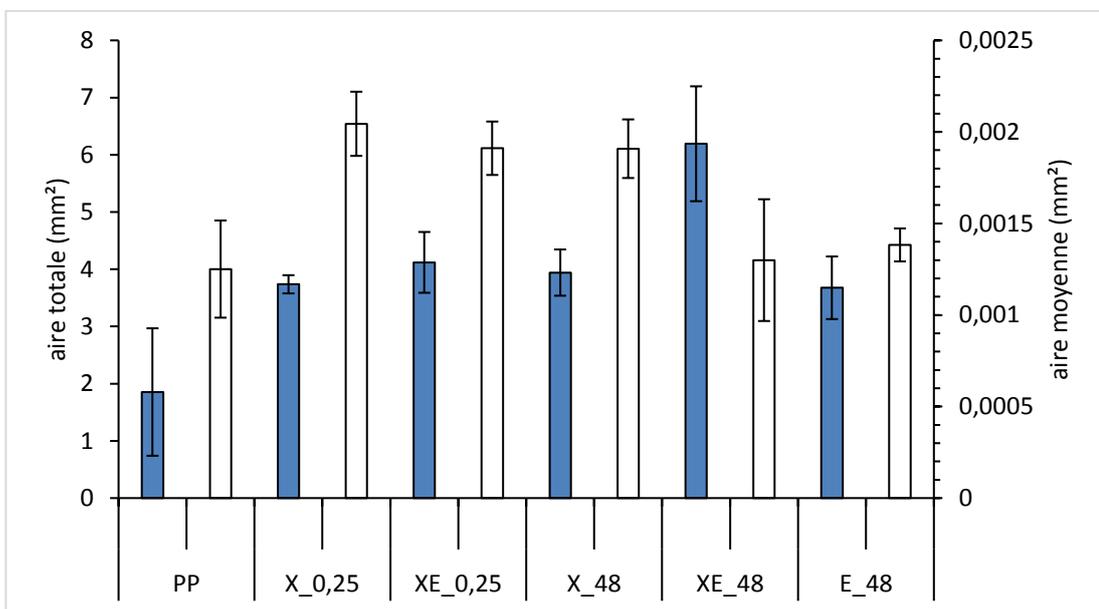


Figure 3-2 : Images par microscopie confocale (x350) suivant le filtre 1 de la paille de blé prétraitée (a), après bioextrusion sans enzymes (b), après bioextrusion avec enzymes (c) et après 48 h et bioextrusion avec enzymes (d).

3.4.3. Mesures qualitatives de l'autofluorescence superficielle.

Un logiciel de traitement d'image permet de sélectionner les zones (pixels) correspondant aux plus hautes intensités (les 25% les plus intenses du signal) en termes d'autofluorescence. Cette technique de mesure se distingue de la simple mesure de l'intensité afin d'essayer de ne sélectionner que les zones correspondant le plus à des structures ligneuses sensibles aux excitations UV. La somme de ces aires sur l'échantillon est calculée pour tous les échantillons afin de déterminer l'aire totale associée à chacun. En parallèle, l'aire moyenne de ces zones fluorescentes est mesurée, afin d'estimer si le fractionnement observé de la biomasse joue sur la répartition des fractions ligneuses ou extractibles excitées. Il est à noter que, pour des raisons pratiques, les images analysées ont été obtenues à un grossissement moins important ($\times 14,6$), impliquant une précision moindre quant à la localisation des zones intenses de fluorescence que celles présentées en Fig. 3-1 et 3-2.



Graphique 3-2 : Valeurs d'aire totale (en bleu) et d'aire moyenne (en blanc) des zones d'autofluorescence bleue les plus intenses émises par les biomasses suivant les différents traitements utilisés. PP, paille prétraitée ; X, extrusion sans enzymes suivie d'une hydrolyse en réacteur fermé ; XE, extrusion avec enzymes suivie d'une hydrolyse en réacteur fermé ; E, hydrolyse en réacteur fermé sans bioextrusion préalable. 0,25 h indique la sortie de la bioextrusion.

Le Graphique 3-2 représente les données mesurées pour l'ensemble des échantillons observés avec le filtre 2. En comparaison avec la matière initiale utilisée pour les expériences (PP), les aires totales d'autofluorescence sont significativement plus élevées après l'étape thermomécanique de bioextrusion (avec ou sans enzymes, XE_0,25 et X_0,25). L'action enzymatique provoque aussi l'augmentation de l'aire fluorescente totale observée sur l'expérience E_48. L'aire totale la plus élevée est cependant atteinte avec bioextrusion après 48 h d'hydrolyse sur les échantillons préalablement bioextrudés (XE_48). La combinaison des facteurs thermomécaniques et biocatalytiques conduit à une exposition plus marquée des structures ligneuses que leur utilisation séparée. Pour l'ensemble des échantillons, les aires moyennes sont relativement faibles ($< 0,0025 \text{ mm}^2$). Une nette augmentation de ces aires s'observe à la sortie de l'étape de bioextrusion, avec ou sans enzymes (X_0,25 et XE_0,25). Celle-ci est probablement à associer avec l'exposition de nouvelles structures ligneuses en

surface, alors que celles visibles pour la paille prétraitée (PP) sont déconstruites et non-fluorescentes. Ces aires diminuent visiblement après 48 h (XE_48 et E_48), alors que le signal fluorescent total augmente. Ce résultat est à associer avec le fractionnement des biomasses et la formation de fines particules (Graphique 3-1). Les Fig. 3-3c et d indiquent visuellement une correspondance entre ces petites particules et le signal autofluorescent bleu.

3.4.4. Conclusion et discussion

Les observations microscopiques par autofluorescence montre une déconstruction visible de la biomasse lignocellulosique variable suivant les différents traitements. Les échantillons extrudés présentent un net dépôt de fines particules, associable au fractionnement et à la fraction ligneuse de par sa fluorescence bleue. La modification des motifs pariétaux et la déconstruction physique de la biomasse sont aussi observées. L'influence enzymatique et thermomécanique positive sur le signal fluorescent a été significativement mesuré.

La technique d'observation des fractions autofluorescentes de la biomasse apporte des résultats visuels intéressants. C'est une technique rapide permettant l'acquisition d'échantillons avec un large champ d'observation ($>1 \text{ cm}^2$) tout en conservant une bonne résolution. Cependant, la complexité de la biomasse et donc des signaux mesurés rend délicate l'interprétation des évolutions visibles. L'excitation de structures riches en lignine, comme les vaisseaux xylémiens, confirme la probable attribution de l'autofluorescence aux structures ligneuses.

Enfin, la part des extractibles est non négligeable dans ce cas d'étude, puisqu'ils représentent plus de 15% de la matière sèche totale de la paille brute et prétraitée (cf 2.1.2.1. Composition chimique des biomasses). Cependant aucun signal autofluorescent n'a été observé sur les liquides issus des expériences d'hydrosolubles. Ce qui amène à penser que leur contribution au signal fluorescent est probablement minime.

3.5. Analyses en infrarouge

Les poudres ($\varnothing < 125 \mu\text{m}$) des différents échantillons sont analysées par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF, P.2.9). C'est une méthode non-destructive qui permet l'étude des propriétés physico-chimiques de la biomasse lignocellulosique ainsi que les propriétés de conformation des polysaccharides (Kačuráková et al., 2000; Sun et al., 2000, 2005).

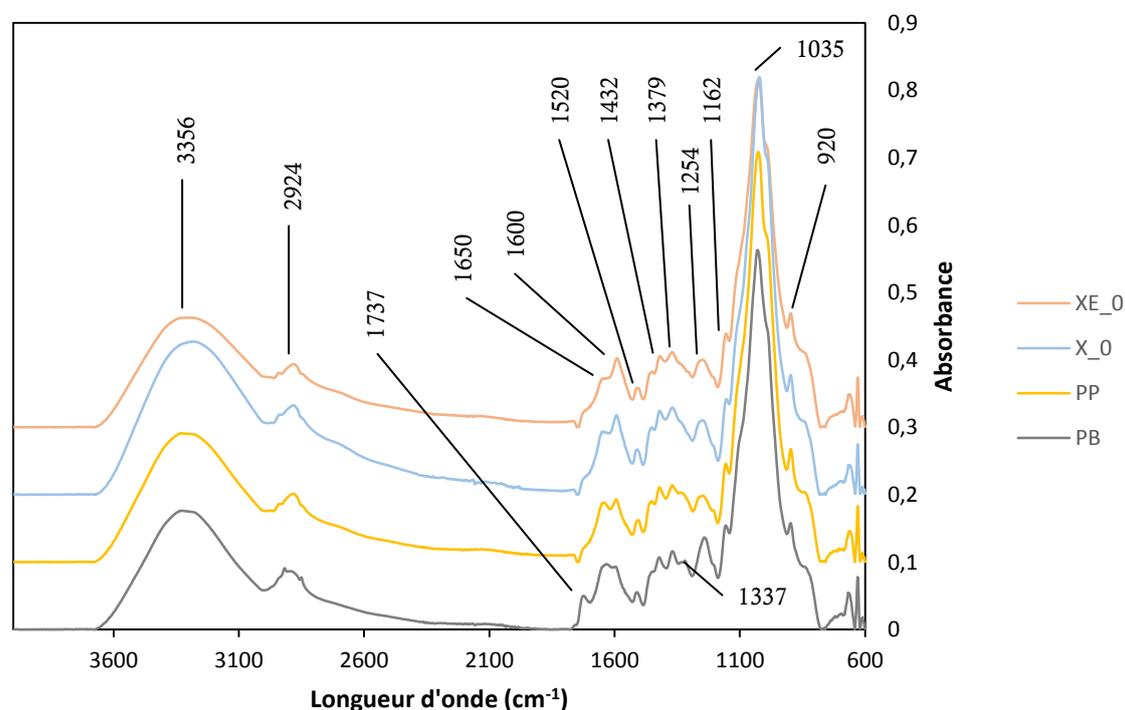
Le signal de la paille brute (PB) présenté sur la Graphique 3-5 contient la majorité des pics d'absorbance observés sur l'ensemble des signaux. Ceux-ci présentent des longueurs d'onde correspondant à des liaisons/groupes fonctionnels, eux-mêmes associés à des fractions constitutives de la biomasse (Tableau 3-2).

Chapitre III : Etude de l'influence de la bioextrusion sur la fraction résiduelle solide

Tableau 3-2 : Bandes d'absorbance FTIR observées lors d'études de biomasses lignocellulosiques, liaisons, groupes fonctionnels et fractions associées.

Longueur d'onde (cm ⁻¹)	Liaison/groupe fonctionnel	Fraction associée	Références
920	liaison glucosidique	Cellulose, Hémicelluloses	1
1035	étirement C-O, C=C, et C-C-O	Holocellulose, Lignines	1, 2
1162	étirement asymétrique C-O-C	Cellulose, Hémicelluloses	1
1254	torsions C-H, O-H ou CH ₂	Cellulose	3, 4, 5
1337	vibration C-H, torsion O-H dans le plan	Holocellulose, Lignines	1
1379	déformations symétrique et asymétriques C-H	Holocellulose, Lignines	1, 5
1432	vibration du cycle aromatique	Lignines	2, 4, 5
1520	vibration du cycle aromatique, lignines associées à l'hémicellulose, proportionnel à la teneur en lignine	Lignines	2, 4, 5
1600	vibration du cycle aromatique	Lignines	2, 4, 5
1650	eau adsorbée sur les fibres celluloses	Cellulose	2, 4
1737	étirement C=O, groupement acétyles/esters unroniques, liaisons esters avec acides féruliques/p-coumariques	Hémicelluloses	3, 5
2924	étirement C-H	Holocellulose, Lignines	3
3356	étirement O-H	Holocellulose, Lignines	3

1, (Xu et al., 2013) ; 2, (Xiao et al., 2001) ; 3, (Alemdar and Sain, 2008) ; 4, (Sun et al., 2000) ; 5, (Sun et al., 2005).

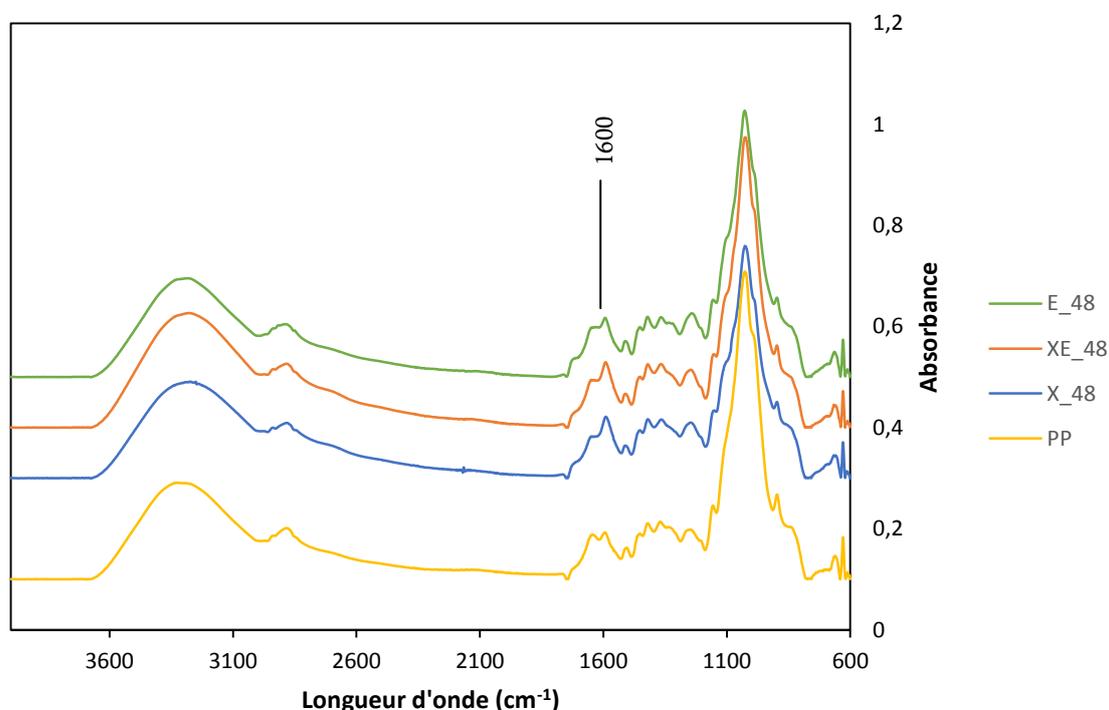


Graphique 3-3 : Signaux d'absorbance en IRTF pour les échantillons de paille brute (PB), paille prétraitée (PP), bioextrudé sans enzymes (X_0,25) et bioextrudé avec enzymes (XE_0,25).

Le graphique 3-3 permet la comparaison entre les signaux avant (PB) et après prétraitement alcalin (PP). Une nette diminution du pic à 1735 cm⁻¹ s'observe à la suite du

prétraitement. Cette information confirme la rupture des liaisons au sein de la fraction hémicellulosique et avec la fraction ligneuse par l'attaque alcaline. L'individualisation du pic à 1605 cm^{-1} pourrait refléter une exposition plus importante des groupements aromatiques des lignines comme une conséquence de la déconstruction de la fraction hémicellulosique. D'autre part une diminution visible du pic à 1250 cm^{-1} pourrait, elle, être liée à la déstructuration de la fraction cellulosique.

Les modifications de la composition physico-chimique après bioextrusion avec (XE_0) ou sans enzymes (X_0) par rapport à la paille prétraitée (PP) sont faibles. Cependant une augmentation du pic à 1605 cm^{-1} ainsi qu'une réduction du signal à 1340 cm^{-1} semblent indiquer une exposition des cycles aromatiques plus importante et la continuité de la déconstruction de la biomasse. Ces évolutions, visibles pour XE_0, sont déjà visibles pour X_0. Il semble donc que la seule action thermomécanique du mélange dans l'extrudeuse soit responsable de ces variations.



Graphique 3-4 : Signaux d'absorbance en IRTF pour les échantillons de paille prétraitée (PP), bioextrudé sans enzymes après 48 h (X_48), bioextrudé avec enzymes après 48 h (XE_48) et non-bioextrudé avec enzymes après 48 h (E_48).

Le Graphique 3-4 indique par ailleurs que les spectres IRTF de la biomasse sont similaires au bout de 48 h d'hydrolyse après mélange en extrusion avec (XE_48) ou sans enzymes (X_48). Tout comme à la sortie de la bioextrusion, les résultats au bout de 48 h pour X_48 et XE_48 sont semblables et que les signaux IRTF semblent plus impactés par l'action thermomécanique que par l'action enzymatique.

Les analyses IRTF montrent des modifications nettes dues au prétraitement alcalin, mais seulement de faibles variations après bioextrusion, même après 48 h d'hydrolyse. Il est à noter que les échantillons X_0, X_48, XE_0, XE_48 et E_48 ont été séchés pendant 48 h à 50°C mais

utilisés tels quels. Tous les composés issus de la dégradation enzymatique sont donc encore présents dans la matière, ce qui peut expliquer une modification limitée de la composition physico-chimique.

3.6. Analyses thermogravimétriques

Les analyses thermogravimétriques sont réalisées sur l'ensemble des échantillons afin de comparer les caractéristiques de dégradation suivant les différents traitements effectués. Le détail du protocole expérimental utilisé pour les analyses thermogravimétriques (ATG) est présenté dans la partie (P.2.10). Les résultats affichés sont les moyennes obtenues à partir des duplicats de chaque échantillon.

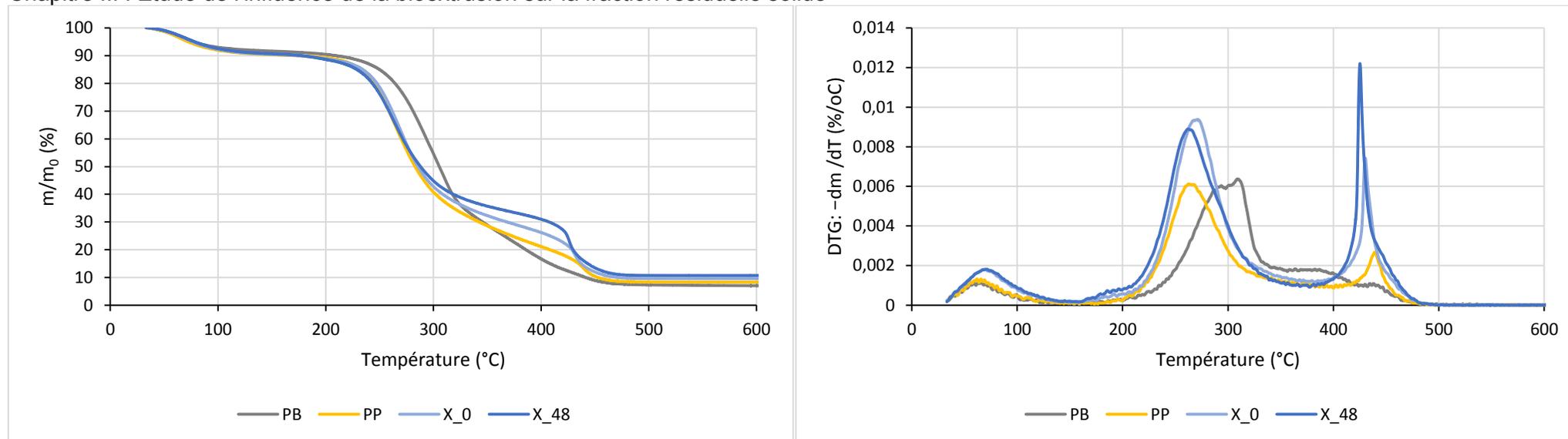
3.1.1. Influence de l'étape de prétraitement

Les Graphiques 3-5 permettent la comparaison des thermogrammes de la matière brute (PB) et prétraitée (PP). Le signal ATG de la paille brute indique un début de dégradation thermique autour de 230°C (Graphique 3-5). La dérivée décrit une dégradation relativement continue de la biomasse, sans réelle individualisation des composants. Un pic principal en DTG, correspondant à un mélange d'hémicelluloses et de cellulose (Chen et al., 2015), se situe autour de 300°C (Graphique 3-5). Celui-ci est suivi de deux épaulements à des températures plus élevées se terminant vers 460°C et couramment associés à des fractions ligneuses (Chen et al., 2015).

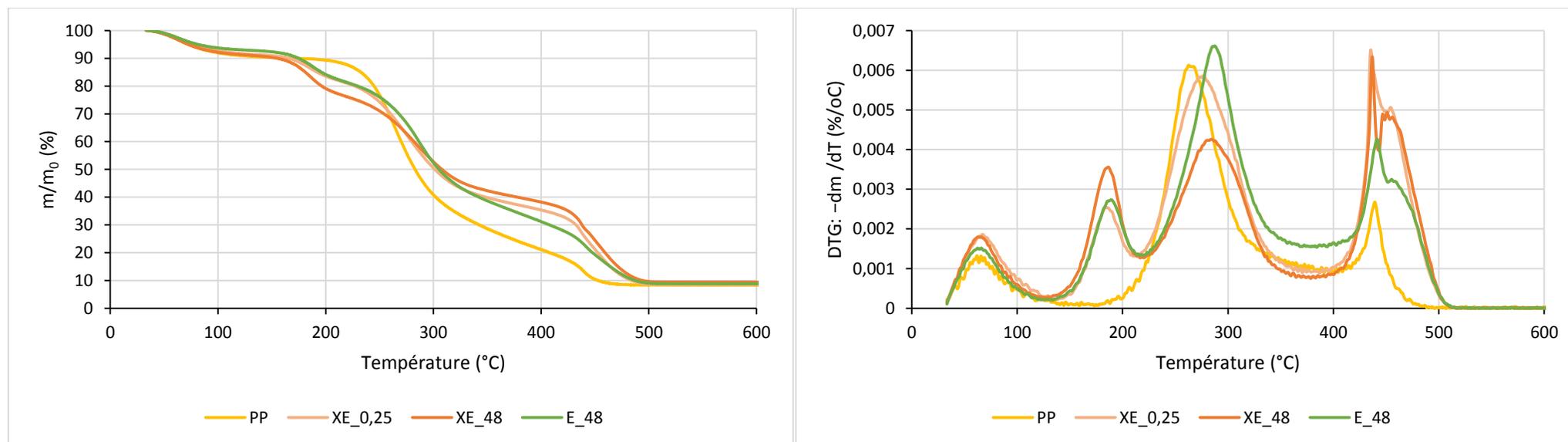
Le signal issu de la paille prétraitée est relativement proche, mais montre cependant deux différences majeures associées à l'étape de prétraitement alcalin. D'une part un début de dégradation et un pic en DTG pour des températures plus faibles après traitement, respectivement autour de 215 et 270°C (Graphiques 3-5). Cela indique une biomasse moins résistante à la dégradation thermique et pourrait notamment s'expliquer par la dégradation de la fraction hémicellulosique, la réduction du degré de polymérisation et de la cristallinité de la cellulose par l'action de la soude (Fan et al., 1987). D'autre part, une nette individualisation du pic autour de 440°C (Graphique 3-5) en DTG montrant une séparation des fractions holocellulosiques et ligneuses. Cette séparation est décrite comme un résultat de l'hydrolyse alcaline des liaisons esters intermoléculaires (Tarkow and Feist, 1969).

La différence entre les pourcentages en masse restant au-delà de 460°C (résidu final) indique une proportion plus élevée de minéraux dans la paille prétraitée que dans la paille brute. Cela est cohérent avec les minéraux ajoutés par le biais de la soude et de l'acide phosphorique.

Chapitre III : Etude de l'influence de la bioextrusion sur la fraction résiduelle solide



Graphique 3-5 : Courbes thermogravimétriques de la paille brute (PB), de la paille prétraitée (PP), à la sortie de la bioextrusion sans enzymes (X_0,25), et après 48 h avec bioextrusion préalable sans enzymes (X_48).

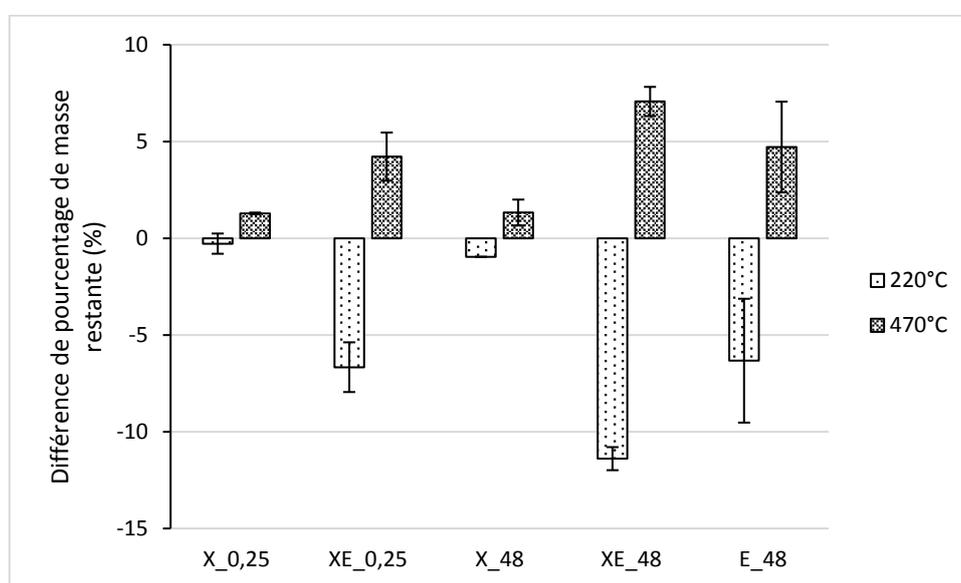


Graphique 3-6 : Courbes thermogravimétriques de la paille prétraitée (PP), à la sortie de la bioextrusion (XE_0,25), et après 48 h avec (XE_48) et sans (E_48) bioextrusion préalable.

3.1.2. Influence de l'étape de bioextrusion

Les Graphiques 3 et 4 permettent de comparer les thermogrammes de la paille prétraitée (PP) avec les bioextrudats à la sortie de l'étape de bioextrusion (XE_0,25) et après 48 h en réacteur fermé (XE_48). Les courbes X_0,25 sont issues des matières témoins traitées dans les mêmes conditions que les bioextrudats mais sans enzymes. Les courbes PP et X_0,25 sont semblables (Graphique 3-6) et soulignent une absence d'effet significatif de la seule action thermomécanique sur la fraction polysaccharidique durant l'étape de bioextrusion. Cependant une légèrement différence de comportement au niveau de la dégradation de la fraction ligneuse est à noter. Sans pouvoir conclure sur sa signification, cela rejoint les précédentes observations de l'influence thermomécanique sur cette fraction au niveau des signaux d'autofluorescence et infrarouges.

Les courbes XE_0,25 indiquent quant-à-elles, des modifications visibles des fractions holocellulosiques et ligneuses. Premièrement, la dégradation thermique du bioextrudat (XE_0,25) commence à partir de 170°C, ce qui est bien plus bas que pour la matière de départ (PP) (Graphique 3-6). Le Graphique 3-7 indique une différence nette et significative du pourcentage en masse entre XE_0,25 et PP d'en moyenne -6.7% à 220°C. Ce comportement en perte de masse est associé à un nouveau pic en DTG autour de 190°C. Cela indique une nouvelle « fraction » probablement composée de poly/oligo et monosaccharides issue de la catalyse enzymatique et se dégradant plus facilement. Un décalage du pic de la fraction holocellulosique vers de plus hautes températures (+10°C) confirmerait que cette nouvelle fraction se fait aux dépens de la fraction holocellulosique initiale. D'après les données en ATG de paille de blé, cette partie la plus thermosensible correspond majoritairement à l'hémicellulose (Chen et al., 2015). La fraction non-hydrolysée restante serait alors majoritairement plus thermorésistante.



Graphique 3-7 : Différences en pourcentage de masse restante avec la paille prétraitée à des températures associées à la fraction saccharidique issue de l'hydrolyse (220°C) et à la fraction polyphénolique recombinée (470°C).

PP, paille prétraitée ; X, extrusion sans enzymes suivie d'une hydrolyse en réacteur fermé ; XE, extrusion avec enzymes suivie d'une hydrolyse en réacteur fermé ; E, hydrolyse en réacteur fermé sans bioextrusion préalable. 0,25 h indique la sortie de la bioextrusion.

Deuxièmement, une évolution au niveau des hautes températures montre aussi un changement de comportement de la fraction ligneuse. La fin de dégradation de XE_0,25 est mesurée pour des températures nettement plus élevées (500°C) (Graphique 3-6). De plus un dédoublement du pic apparaît en DTG pour des températures autour de 460°C, température de fin de dégradation observée pour la PP. Il semble que pour ces hautes températures une nouvelle fraction apparaisse, avec une résistance thermique plus élevée que la fraction ligneuse de la PP. Pintiaux et al., 2015 ont émis l'hypothèse de la polymérisation radicalaire des composés polyphénoliques à hautes températures, notamment pour des cas de thermo-pressage de matières lignocellulosiques. Ces polymérisations peuvent se produire entre polyphénols ou encore entre des polyphénols et des polysaccharides. Ces réactions pourraient notamment être permises par l'oxygène présent dans le flux d'air des mesures ATG. L'estimation en pourcentage de masse est d'en moyenne 4,2% à 470°C (Graphique 3-7). Il est à noter que la formation de ces fractions est probablement favorisée par le fractionnement et la libération de fragments polyphénoliques.

3.1.3. Influence de l'hydrolyse enzymatique

La comparaison des courbes XE_0,25 et XE_48 (Graphique 3-6) confirme que la dégradation enzymatique se poursuit en réacteurs fermés. Le Graphique 3-7 montre une augmentation de la fraction issue de l'hydrolyse (220°C) pour XE_48 ainsi que pour XE_0,25. Cela indique bien une hydrolyse finale plus poussée et donc une continuité de l'activité enzymatique après la bioextrusion, comme indiqué dans les résultats de conversion du chapitre II. De plus, le pic de dégradation associé à la fraction holocellulosique se décale encore vers des températures plus élevées (+15°C). Cela indique la poursuite de la dégradation de la partie holocellulosique la plus thermosensible et, probablement, la plus accessible à l'hydrolyse enzymatique. Une légère augmentation de la nouvelle fraction la plus thermorésistante est observable à 470°C (Graphique 3-7)

Les échantillons E_48 et XE_48 montrent de nettes différences avec la matière première (PP). Celles-ci sont visibles sur les thermogrammes (Graphiques 3-6) et dans les variations en pourcentages de masses associées aux nouvelles fractions (Graphique 3-7). En outre, si les courbes après 48 h d'hydrolyse (E_48 et XE_48) sont similaires (Graphiques 3-6), la part de la fraction holocellulosique hydrolysée semble légèrement plus faible sans bioextrusion préalable (E_48) (Graphique 3-7). Ce résultat confirme l'intérêt d'une combinaison des deux facteurs. Enfin, la similarité des courbes des échantillons bioextrudés sans enzymes (X_0,25 et X_48) et de la paille prétraitée (PP) (Graphique 3-5), souligne l'importance de l'influence enzymatique.

3.1.4. Conclusion

Les mesures en ATG permettent d'évaluer l'évolution du comportement physique des résidus solides suivant les différents traitements. Des observations claires de la dégradation de la fraction holocellulosique se traduisent par l'apparition d'une nouvelle fraction plus thermosensible issue des produits de l'hydrolyse enzymatique. La fraction holocellulosique principale devient plus thermorésistante confirmant que sur 48 h d'hydrolyse seules les parties les plus accessibles par l'hydrolyse enzymatique sont dégradées. L'apparition d'une fraction plus thermorésistante après prétraitement traduit la déstructuration associée à la dégradation enzymatique. La dégradation de la biomasse semble permettre des recombinaisons nouvelles et

thermiquement résistantes lors des mesures en ATG. Celles-ci pourraient être liées à la réorganisation des polyphénols seuls ou avec des polysaccharides.

3.2. Conclusions et discussions.

Les différentes analyses réalisées sur les biomasses montrent des modifications significatives associées aux différentes conditions réactionnelles utilisées. Ces modifications sont principalement d'ordres macroscopique et structurel, avec une réduction des tailles de particules, des changements visuels de la structure de la biomasse et de la fraction ligneuse, ainsi qu'une formation de fractions nouvelles visibles par la dégradation thermique. Les analyses de composition physico-chimique par IRTF soulignent, quant à elles, des modifications limitées.

Ces modifications structurelles semblent à la fois associées à l'influence thermomécanique de l'étape de bioextrusion, ainsi qu'à la catalyse enzymatique. Les contraintes de cisaillement lors de l'extrusion sont associées à une légère diminution de taille des particules et notamment à une modification de la fraction ligneuse. En effet, plusieurs mesures révèlent des changements liés à la fraction polyphénolique de par la simple action thermomécanique. L'augmentation du signal infrarouge sur une longueur d'onde associée à la vibration des cycles aromatiques, la modification du signal autofluorescent associé, ainsi qu'un comportement légèrement différent face à la dégradation thermique à haute température amènent à penser qu'un impact non négligeable de cette étape d'extrusion est associé à la modification structurelle de cette fraction. Il est à noter que celle-ci a été préalablement fragilisée par le prétraitement alcalin.

Cependant, les résultats observés pour les expériences associant contraintes thermomécaniques et action catalytique des enzymes sont différents de ceux constatés avec l'action thermomécanique seule ou avec l'action enzymatique seule. La réduction de taille de particule est plus importante avec la formation de fines particules visiblement associées à la fraction ligneuse. La fraction holocellulosique issue de l'hydrolyse, plus sensible à la dégradation thermique, est significativement plus importante. Il est possible qu'une synergie entre la déconstruction physique et biologique existe. Samaniuk et al., 2011 ont émis l'hypothèse que l'action mécanique conduit à une réduction de taille des particules augmentant ainsi la surface du substrat accessible à l'action enzymatique. Pour Lenting and Warmoeskerken, 2001, il existe un effet synergique entre force de cisaillement et catalyse enzymatique. D'une part, l'action mécanique permettrait le passage de la cellulose d'une structure cristalline à une structure amorphe plus accessible aux enzymes. D'autre part, la dégradation enzymatique s'attaque, elle, principalement à la fraction amorphe, retirant une partie de la fibre et laissant un lien plus rigide (plus concentré en cellulose cristalline) et donc plus sensible à la contrainte mécanique.

Enfin, une déconstruction plus poussée peut être associée à une meilleure conversion du glucose observée pour les résultats avec bioextrusion. Cependant, les contraintes mécaniques observées, ainsi que la production plus prononcée de particules fines ligneuses pourraient aussi être à l'origine d'une désactivation ou adsorption non spécifique expliquant la moins bonne conversion des fractions hémicellulosiques.

3.3. Références

- Albinsson, B., Li, S., Lundquist, K., Stomberg, R., 1999. The origin of lignin fluorescence. *J. Mol. Struct.* 508, 19–27. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(98\)00913-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(98)00913-2)
- Alemdar, A., Sain, M., 2008. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. *Bioresour. Technol.* 99, 1664–1671. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.029>
- Béguin, P., Aubert, J.-P., 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00033.x>
- Chen, Z., Hu, M., Zhu, X., Guo, D., Liu, S., Hu, Z., Xiao, B., Wang, J., Laghari, M., 2015. Characteristics and kinetic study on pyrolysis of five lignocellulosic biomass via thermogravimetric analysis. *Bioresour. Technol.* 192, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.062>
- Fan, L., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987. Enzymatic Hydrolysis, in: *Cellulose Hydrolysis, Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 21–119. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72575-3_3
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., Ebringerová, A., 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 43, 195–203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Lenting, H.B.M., Warmoeskerken, M.M.C.G., 2001. Mechanism of interaction between cellulase action and applied shear force, an hypothesis. *J. Biotechnol., Biotechnology in the Textile Industry - Perspectives for the New Millennium* 89, 217–226. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00300-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00300-5)
- Liu, R., Yu, H., Huang, Y., 2005. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose* 12, 25–34. <https://doi.org/10.1007/s10570-004-0955-8>
- Lundquist, K., Josefsson, B., Nyquist, G., 1978. Analysis of Lignin Products by Fluorescence Spectroscopy. *Holzforsch. - Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 32, 27–32. <https://doi.org/10.1515/hfsg.1978.32.1.27>
- Merali, Z., Ho, J.D., Collins, S.R.A., Gall, G.L., Elliston, A., Käsper, A., Waldron, K.W., 2013. Characterization of cell wall components of wheat straw following hydrothermal pretreatment and fractionation. *Bioresour. Technol.* 131, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.023>
- Pandey, K.K., Upreti, N.K., Srinivasan, V.V., 1998. A fluorescence spectroscopic study on wood. *Wood Sci. Technol.* 32, 309–315. <https://doi.org/10.1007/BF00702898>
- Parker, M.L., Waldron, K.W., 1995. Texture of Chinese water chestnut: Involvement of cell wall phenolics. *J. Sci. Food Agric.* 68, 337–346. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680313>
- Pintiaux, T., Viet, D., Vandenbossche, V., Rigal, L., Rouilly, A., 2015. Binderless Materials Obtained by Thermo-Compressive Processing of Lignocellulosic Fibers: A Comprehensive Review. *BioResources* 10, 1915–1963. <https://doi.org/10.15376/biores.10.1>
- Samaniuk, J.R., Tim Scott, C., Root, T.W., Klingenberg, D.J., 2011. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresour. Technol.* 102, 4489–4494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.117>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., others, 2010. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory; 2008 April. NREL Report No. Contract No -AC36-99-G010337 Spons. US Dep. Energy.
- Sun, R.C., Tomkinson, J., Wang, Y.X., Xiao, B., 2000. Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction. *Polymer* 41, 2647–2656. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00436-X](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00436-X)
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw. *Carbohydr. Res.* 340, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.10.022>

- Tarkow, H., Feist, W., 1969. A mechanism for improving digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid ammonia. *Adv. Chem. Ser.* 197.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51, 780–785.
- Xiao, B., Sun, X.F., Sun, R., 2001. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. *Polym. Degrad. Stab.* 74, 307–319. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00163-X)
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., Wang, D., 2013. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Appl. Energy* 104, 801–809. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>

4. Chapitre IV :

Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

-
- Hydrolyse enzymatique de résidus caulinaires de maïs : influence de la bioextrusion sur la conversion de la biomasse après 48 h d'hydrolyse avec suivi de la fraction cellulosique exposée.
 - Aspect cinétique de l'influence de la bioextrusion sur l'hydrolyse des résidus de maïs caulinaires.
 - Bioextrusion de fragments d'écorce de bouleau blanc. Influence de la bioextrusion sur un substrat très riche en lignines.
-

4.1. Introduction du chapitre

Les résultats obtenus pour la paille de blé démontrent une influence significative de la bioextrusion sur l'hydrolyse enzymatique. Ils confirment l'existence d'une activité enzymatique dans l'extrudeur, ainsi que d'un effet sur la conversion des sucres lors de l'hydrolyse subséquente en réacteur fermé. Les facteurs majeurs que sont la concentration en substrat et en enzymes ont été étudiés. Cependant, d'autres facteurs comme le type de substrat (notamment sa teneur en lignines) ou encore le type et la sévérité du prétraitement chimique précédent, impactent significativement l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique (Gatt et al., 2018; Vandebossche et al., 2016). Dans ce chapitre, d'autres résidus lignocellulosiques (résidus de maïs, fragments d'écorce de bouleau blanc), une autre extrudeuse (Entek Extruder, OR, US) et un autre cocktail cellulolytique (ACCELLERASE® DUET) ont été utilisés. Les résultats obtenus à partir de résidus de maïs bruts sont comparés à ceux obtenus à partir de résidus de maïs prétraités (conditions alcaline sévères), afin d'évaluer l'impact de l'étape de prétraitement chimique sur l'étape de bioextrusion.

L'utilisation d'un prétraitement alcalin sévère vise à déstructurer au maximum la protection ligno-hémicellulosique de la biomasse pour faciliter l'accessibilité enzymatique. C'est aussi un moyen classique de diminuer la cristallinité de la cellulose, l'un des facteurs principaux limitant la conversion du glucose (Alvira et al., 2010; Sun and Cheng, 2002). Dans ce chapitre, une méthode de mesure qualitative originale de la part cristalline et amorphe de la cellulose est réalisée à l'aide de modules de reconnaissance enzymatiques (CBMs) fluorescents (Hébert-Ouellet et al., 2017). Ceux-ci sont spécifiques de la cellulose cristalline et permettent d'évaluer l'évolution de la part cristalline exposée par mesures spectroscopiques. Afin de réaliser ce type d'analyse non destructive et spécifique à la fois du type de substrat ainsi que de son accessibilité, un stage de thèse a été réalisé au sein du Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques (CRML) avec l'équipe de Marc Beauregard qui a développé ces marqueurs fluorescents spécifiques (FTCM). C'est pour cette raison que les substrats, les enzymes, ainsi que l'extrudeuse utilisé est différente du reste du projet de thèse.

Ce chapitre se focalise premièrement sur l'aspect statique des résultats de fin d'hydrolyse (48 h) des résidus de maïs. L'étude de l'influence du ratio S/L, du prétraitement et de la bioextrusion sur la part cristalline de la cellulose sont présentés, ainsi que d'autres résultats relatifs à l'efficacité de l'hydrolyse. Tout comme pour la paille de blé, les expériences avec et sans bioextrusion préalable sont décrites et comparées. Deuxièmement, l'aspect cinétique de l'influence de la bioextrusion des résidus de maïs est commenté avec des mesures à 4, 10 et 24 h. Enfin une brève analyse des résultats obtenus avec les fragments d'écorce présente les limites d'utilisation de la bioextrusion pour des substrats très riches en lignines.

4.2. Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: new insight into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules

Cette partie, écrite sous forme de publication, a pour objectif de présenter les résultats finaux d'hydrolyse (48 h) des résidus de maïs. Ils permettent l'étude de l'influence de l'étape de bioextrusion sur l'hydrolyse subséquente en milieu fermé. Ces hydrolyses sont réalisées avec différentes concentrations en substrat (12 à 29% m/m solide sec). Parmi les résultats obtenus, l'influence de la bioextrusion sur la part exposée de la cellulose cristalline et amorphe est mesurée par marquage fluorescent spécifique. L'impact du prétraitement alcalin est aussi observé par comparaison des résultats de bioextrusion avec des résidus de maïs brut et des résidus de maïs prétraitée à la soude. L'évaluation de la méthode d'extrusion biocatalytique sur la déconstruction de la biomasse lignocellulosique est permise par les mesures de dégradation biochimique (production de sucres réducteurs libres, conversion du glucose) et physique (tailles de particules).

Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: new insights into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules

Etienne Gatt^{a,2}, Vinay Khatri^{b,d}, Julien Bley^{c,e}, Simon Barnabé^c, Virginie Vandenbossche^a, Marc Beauregard^{c,d}

^a Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France.

^b Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2P5, Canada

^c Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques, Université du Québec à Trois-Rivières.

^d PROTEO, Université Laval, Québec G1V 4G2, Canada

^e Innofibre, 3351 Boulevard des Forges, Québec G9A 5E6, Canada

Abstract

Lignocellulosic biomass is a sustainable source of renewable substrate to produce low carbon footprint energy and materials. Biomass conversion is usually performed in two steps: a biomass pretreatment for improving cellulose accessibility followed by enzymatic hydrolysis of cellulose. In this study we investigated the efficiency of a bioextrusion pretreatment (extrusion in the presence of cellulase enzyme) for production of reducing sugars from corn crop agricultural residues. Our results demonstrate that bioextrusion increased the reducing sugar conversion yield by at least 94% at high solid/liquid ratio (14% to 40%). Monitoring biomass surface with carbohydrate-binding modules (FTCM-depletion assay) revealed that well known negative impact of high solid/liquid ratio on conversion yield is not due to lack of exposed cellulose, which was abundant under such conditions. Bioextrusion was found to be less efficient on alkaline pretreated biomass but being a mild and solvent limiting pretreatment technique, it might help to decrease pretreatment costs.

Keywords

Lignocellulosic biomass, bioextrusion, carbohydrate-binding modules, enzymatic hydrolysis, FTCM, FTCM-depletion assay

Introduction
Lignocellulosic biomass (LCB) is a sustainable, renewable, abundant and inexpensive substrate. Its valorization can lead to the production of energy and materials with a low carbon footprint. LCB has been identified as a possible solution to the current energy crisis, characterized by depletion of fossil resources and a pressing need for reduced CO₂ emissions (Lynd, 2017). However, the use of LCB as a substrate for 2nd generation bioethanol production is hampered by its complex structure and recalcitrance to enzyme actions (Himmel et al., 2007a). To overcome this limitation, biomass conversion is usually performed in two steps: the

²Corresponding author at: Université de Toulouse, INP, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, ENSIACET, 4 Allée Emile Monso, BP 44362, 31030 Toulouse Cedex 4, France. Tel.: +33 5 34 32 35 14; fax: +33 5 34 32 35 99.

E-mail address: etienne.gatt@ensiacet.fr (E. Gatt); virginie.vandenbossche@ensiacet.fr (V. Vandenbossche)

first step involves a biomass pretreatment for improving cellulose accessibility, which is followed by enzymatic hydrolysis of cellulose (Himmel et al., 2007; Sun and Cheng, 2002; Khatri et al., 2018a).

Twin screw extrusion has been frequently used as the first step for the pretreatment of LCB (Karunanithy and Muthukumarappan, 2013). Extrusion pretreatment has many advantages including high shear, rapid heat transfer, and effective and rapid mixing afforded by good modulation of treatment steps (Vandenbossche et al., 2014). In an attempt to improve the biocatalysts impregnation to biomass and optimize the batch saccharification step, the enzymes were injected during the extrusion process (Vandenbossche et al., 2015b, 2014a). This short bioreactive process, named bioextrusion (a mechano-enzymatic pretreatment), has been proven to enhance the enzymatic hydrolysis of the LCB in many studies, as summarized by Gatt et al., 2018.

One of the key advantages of the bioextrusion process is its ability to work with high substrate loading. This is a critical parameter in order to decrease water consumption and the costs associated with its removal (Lin and Tanaka, 2006). However, high solid loading often decreases hydrolytic efficiency (Ramachandriya et al., 2013). In-depth studies about high solid loadings suggest that low agitation efficiencies, reduction of the contact area between enzymes and substrates, loss of enzymatic activities and non-specific adsorption are some of the factors associated with decrease in hydrolytic efficiency (Ramachandriya et al., 2013). Other conditions can also decrease biomass hydrolysis, such as inhibition of enzymes by reaction products and mass transfer limitations (Hodge et al., 2008; Kim et al., 2008). Therefore, it is important to study the bioextrusion process parameters in great detail in order to cost-effectively maximize the saccharification of the cellulose and hemicellulose components to fermentable sugars.

The main objective of any pretreatment, including bioextrusion, is to improve the subsequent enzymatic hydrolysis of the holocellulose fraction by increasing the access of enzymes to cellulose (also known as cellulose accessibility to enzymes) (Lynd et al., 1999; Wyman, 2013, Khatri et al., 2018a). However, pretreatments vary greatly in the way they help to expose cellulose and other components. Contrary to other pretreatment methods which uses intensive physical and/or chemical conditions, bioextrusion is a mild mechano-enzymatic pretreatment technique because it requires less energy and water consumption (Vandenbossche et al., 2014). The combination of mechanical and biochemical constraints is believed to overcome limitations associated with high solid and enzymes loadings (Gatt et al., 2018). Currently, our incomplete understanding about the impact of pretreatment (on microstructure) on a particular biomass is believed to be a key issue for reducing costs associated with bioenergy production (Rollin et al., 2011; Zhang and Lynd, 2006; Khatri et al., 2018a). Therefore, is it important to study the effectiveness and impact of pretreatments on a biomass substrate that may play a significant role in a commercial viability of bioenergy production. One of the major difficulties in studying pretreatment and process parameters is the lack of rapid, high throughput and reliable tools for monitoring and/or tracking lignocellulosic polymers at the biomass surface (DeMartini et al., 2013; Khatri et al., 2016). Recently, a rapid and low-cost method has been developed to directly and precisely monitor the surface of wood fibers and agricultural LCB using selected carbohydrate-binding modules (CBMs). Named “fluorescent protein-tagged carbohydrate-binding modules method” (FTCM) this method, and its adaptation FTCM-

depletion assay (Khatri et al., 2018a), relies on the use of four specific ready-to-use probes made of recombinant CBMs genetically linked to a designated fluorescent protein of the green fluorescent protein (GFP) family (Hébert-Ouellet et al., 2017; Khatri et al., 2018a, 2018b, and 2016). The FTCM and FTCM-depletion assay have been extensively studied and shown as robust, rapid, easy to use, unambiguous and cost-effective surface characterization methods (Khatri et al., 2018a, 2018b, and 2016; Hébert-Ouellet et al., 2017; Bombeck et al., 2017). Therefore, the use of this surface characterization method for studying the impact of various pretreatments (bioextrusion and alkaline pretreatment) on fiber microstructure provokes substantial interest.

The aim of this work is to study the influence of bioextrusion on a subsequent batch hydrolysis of LCB at high solid to liquid (S/L) ratios. In this study, raw (RC) and alkaline pretreated corn crop residues (PC) were hydrolyzed in batch conditions for 48 h using a cellulolytic cocktail and different substrate concentrations (S/L ratios from 14 to 40%), with or without a previous bioextrusion step. A number of analyses were performed in order to further our understanding of the impact of bioextrusion and various experimental parameters on corn crop residues and its subsequent enzymatic hydrolysis.

4.2.2. Materials and methods

4.2.2.1. *Biomass: preparation and pretreatments*

Raw corn (RC) crop residues (*Zea mays* L.) provided by Ferme Olivier and Sebastien Lépine of Agrosphere Co. (Québec, Canada) were used in this study. Corn crop residue was a mixture of lightly ground cobs, stover and leaves. The entire mixture was milled together to produce a working sample with particle sizes lower than 5 mm.

Raw corn (RC) stover residues were also pretreated by cooking in NaOH solution under pressure in a laboratory digester provided by M/K Systems Inc. (Danver, MA, USA). The digestion conditions were as follows: a liquor ratio of 5 (12% NaOH/g of residue); 175 °C; 60 min digestion period as described by Adjalle et al., 2017. The alkaline pretreated corn (PC) was later washed with a pH 4.5 citrate buffer (50 mM) and dried at 50°C for 48 h. This pretreatment removes a significant portion of the hemicelluloses and lignins, producing a less complex starting material that exhibits an increased enzymatic accessibility (Khatri et al., 2018a).

4.2.2.2. *Enzyme cocktail*

Enzymatic saccharification was carried out using the ACCELLERASE® DUET cocktail from DuPont Industrial Biosciences in a citrate buffer (50 mM, pH 4.5). The enzymatic cocktail had a protein content of 87.8 mg/ml and a cellulases activity of 115.6 FPU/mL. According to the supplier's specification the ACCELLERASE enzyme cocktail is expected to have significant accessory enzymes (xylanase) activity. The protein content was measured with the total protein micro Lowry kit (with Peterson's modification) from Sigma-Aldrich. The cellulase activity was measured according to Ghose, 1987. The enzymatic cocktail had an optimum temperature of 50°C and an optimum pH of 4.5.

4.2.2.3. *Bioextrusion*

Bioextrusion was carried out using a 27 mm twin-screw extruder (Entek, OR, US). Raw or alkaline pretreated corn residues were introduced to the enzymatic cocktail and citrate buffer (to control the S/L ratio) as indicated in Figure 4-1. Extrusions were performed at 50°C, 125 rpm and the residence time was 5 minutes. The screw configuration was chosen according to

Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

the typical bioextrusion screw configuration as described elsewhere (Gatt et al., 2018). Alternating between transport areas (T) (conveying elements) and intensive mixing areas with kneading blocks (M) promoted both good mixing conditions and isolated areas for reactions to occur (Figure 4-1). The original objective of the bioextrusion was to start the enzymatic hydrolysis in the extrusion pretreatment step, taking advantage of the good impregnation capacities that extrusion has to offer.

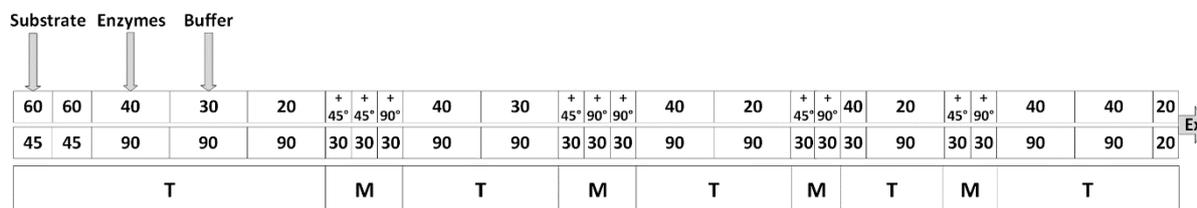


Figure 4-1: Bioextrusion screw configuration. T corresponds to transport areas with conveying elements and M are mixing zones with kneading blocks. Ex corresponds to the bioextruded biomass. Numbers in first row indicate the pitch of the screws or the angle between the kneading blocks. Numbers in the second row indicate the length of the screw in mm.

4.2.2.4. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis were performed in 50 mL tubes with 50 mM citrate buffer (pH 4.5), 0.1% sodium azide, and 0.5 mL enzymatic cocktail per g of cellulose (Danisco US Inc., 2007). Tubes were placed in an Ecotron® incubation shaker at 50°C and 200 rpm. Treatments with raw corn and without previous bioextrusion are noted as RC-E; treatments with raw corn and with previous bioextrusion are named as RC-XE; treatments with alkaline pretreated corn and without previous bioextrusion are titled as PC-E; and treatments with alkaline pretreated corn and with previous bioextrusion are abbreviated as PC-XE. These experimental conditions are schematically represented in Figure 4-2.

Moisture content is one of the most influencing factors for optimal biomass saccharification as described in most of the previous bioextrusion studies (Chouvel et al., 1983; Gatt et al., 2018; Govindasamy et al., 1997a). Therefore, its impact was tested by varying the substrate loading. This parameter is expressed as the ratio of grams of solid per 100 g of liquid (S/L ratio). Non-bioextrudated and bioextrudated raw corn (RC-E and RC-XE) were prepared with four different S/L ratios, 14% ($\pm 0.04\%$), 23% ($\pm 1.00\%$), 31% ($\pm 0.72\%$), and 40% ($\pm 0.35\%$). Non-bioextrudated and bioextrudated alkaline pretreated corn (PC-E and PC-XE) were prepared with two different S/L ratios, 14% ($\pm 0.50\%$) and 31% ($\pm 1.91\%$). For PC-E and PC-XE, the S/L ratio of 14% was selected because it corresponds to the enzymes supplier's recommendations and 31% because it allows to evaluation of the influence of a higher substrate loading, without clear process limitations observed with 40% in RC-E and RC-XE. Reactions were stopped by immersing the tubes in boiling water for 5 min and then cooled in an ice bath for 5 minutes. Each experimental condition was carried out in triplicate in separate tubes.

Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

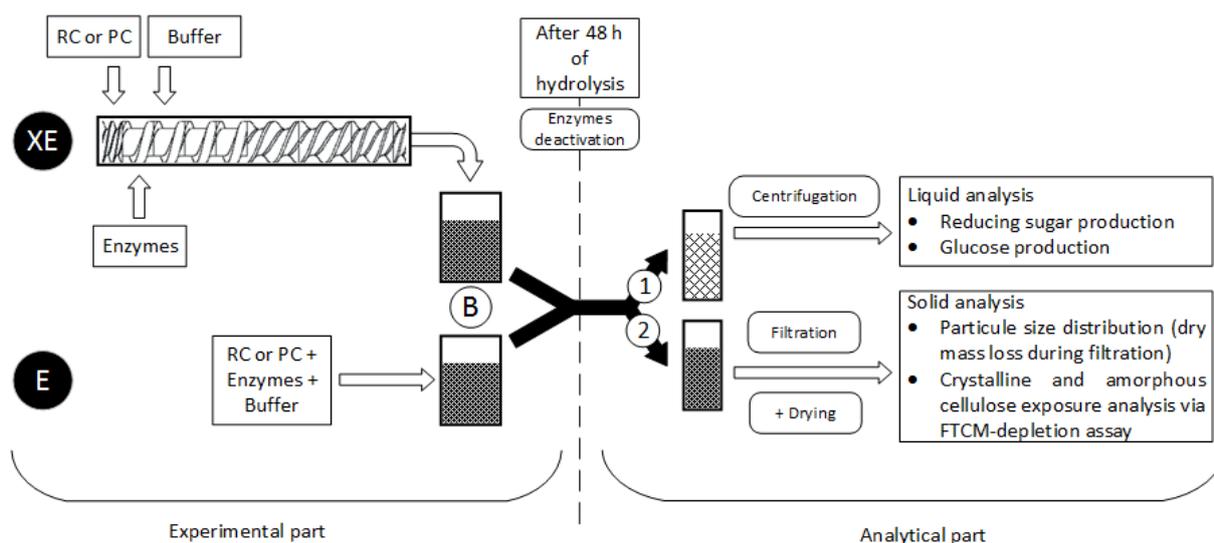


Figure 4-2: Schematic representation of the experimental and analytical parts. RC, raw corn; PC, alkaline pretreated corn. XE, batch hydrolysis with previous bioextrusion step; E, batch hydrolysis without previous bioextrusion step; B, batch hydrolysis process. Path 1: samples diluted to 5% of dry content. Path 2: Non-diluted samples.

4.2.2.5. Analytical methods

4.2.2.5.1. Dry matter and parietal compounds

Moisture content was determined according to the French standard procedure NF V 03-903. A relative proportion of each of the three parietal constituents (cellulose, hemicelluloses, and lignins) contained in the solids was measured using the ADF-NDF method (Van Soest and Wine, 1968). All determinations were carried out in triplicate.

4.2.2.5.2. Sugars analysis

Tube content (Figure 4-2, path 1) was diluted with distilled water in order to reach 5% of dry matter and was centrifuged at 5,000 g for 10 min at 20°C. The reducing sugars in the supernatant were determined using the DNS method (Miller, 1959). The quantity of reducing sugars was used to calculate the rate of holocellulose deconstruction (r_{HD}). It is expressed as the ratio of reducing sugars in the sample, measured in terms of glucose equivalents, over the initial mass of holocellulose. Results were corrected with blank values obtained at $t = 0$ h without bioextrusion. However, as this method titrates all the reducing functions of the different sugars in solution (e.g. oligosaccharides, pentose, hexoses etc.), specific glucose concentration was also measured using high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC analysis were carried out with a Rezex RHM-Monosaccharide with deionized water as the eluent in isocratic mode, with a flow rate fixed at 0.6 mL/min. Column was kept at 85°C and RI detector at 50°C (Sluiter et al., 2010).

4.2.2.5.3. Particle size distribution

After 48h of enzymatic hydrolysis, the samples were washed with distilled water and filtered through glass fiber Whatman 934 AH filters. These filters have a porosity of 1.5 μm . Retained solids were then dried at 103°C during 12 h prior to mass measurements. Dry matter left after filtration was compared to the initial dry matter in order to calculate the proportion of dry solid with particle size smaller than 1.5 μm ($p_{\phi \leq 1.5 \mu\text{m}}$).

Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

$$p_{\phi \leq 1.5 \mu m} = \frac{m_{dt} - m_{df}}{m_{dt}}$$

m_{dt} : dry mass before filtration

m_{df} : residual dry mass after filtration

4.2.2.5.4. Cellulose accessibility (surface cellulose exposure) using FTCM-depletion assay

After 48 h of enzymatic hydrolysis, the unhydrolyzed residues were filtered, dried and grounded. FTCM-depletion assay was used on these unhydrolyzed solid residues in order to detect the total cellulose accessibility or surface cellulose (both crystalline and amorphous cellulose) exposure after the various chemical, mechanical and enzymatic treatments described above. The tracking assay was performed as described by Khatri et al., 2018a with two different FTCM probes: eGFP-CBM3a (GC3a) specific to crystalline cellulose and eCFP-CBM17 (CC17) specific to amorphous (non-crystalline) cellulose. Probe production and characterization (spectroscopic maxima, affinity to related substrate, and discrimination among substrates) were described in earlier reports (Hébert-Ouellet et al., 2017; Khatri et al., 2018a, 2018b, and 2016; Bombeck et al., 2017). Fluorescence measurements were recorded at room temperature using a Synergy Mx microplate reader (BioTek). Fluorescence values were further converted into μmol of fluorescent probes per g of dry biomass, using the appropriate fluorescence standard curves for each probe. FTCM-depletion assay allows to specifically measure the crystalline and amorphous cellulose exposure at the surface of the biomass (Khatri et al., 2018a).

4.2.3. Results and discussion

4.2.3.1. Biomass characterization

Figure 4-3 represents biomass composition characterization of raw (RC) and alkaline pretreated corn (PC).

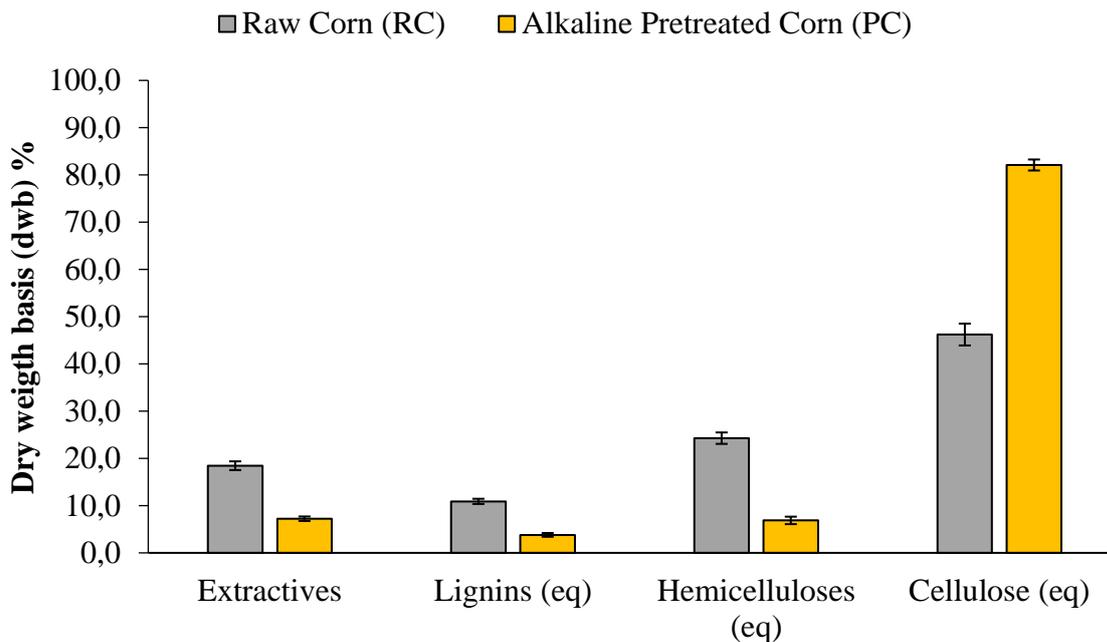


Figure 4-3: Biomass composition before and after alkaline pretreatment step indicated on dry weight basis (dwb). Error bars represent the standard deviation.

The alkaline pretreatment led to the removal of a significant part of the extractives such as proteins, starches, pectins, tannins present in the raw biomass (Sluiter et al., 2010). In addition, the alkaline action also induces the solubilization of most of the lignins and hemicelluloses fractions which are in line with previous observations (Adjalle et al., 2017, Khatri et al., 2018a). Furthermore, the total cellulose content (detected by ADF-NDF protocol) was significantly increased (~ 78%) by alkaline pretreatment (Figure 4-3) which is in accordance with the known impact of this widely used pretreatment technique (Kim et al., 2016). The alkaline pretreated biomass was a mixture of relatively less colored, swollen and broken fibers, which is compatible with a decreased content of colored lignin.

The main objective of pretreatment for subsequent biochemical conversion is to increase access to cellulose (also known as cellulose accessibility) by removing most of the lignin and hemicelluloses. From total composition analysis (ADF-NDF analysis; Figure 4-3), one can reasonably infer that more cellulose will become available at the fiber surface when lignin and/or hemicelluloses are partially removed from biomass. However, such an interpretation of pretreatment impact is indirect as total composition analysis represents a bulk analysis and does not interrogate fiber surface properties (such as cellulose accessibility) (Khatri et al., 2018a).

The surface exposure or surface accessibility of lignocellulosic polymers is an important substrate characteristic that influences the enzymatic hydrolysis rates (Arantes and Saddler, 2010; Hong et al., 2007; Mansfield et al., 1999; Zhang and Lynd, 2004a). A recent study using FTCM-depletion assay probes reported that enzyme access to cellulose (total cellulose surface accessibility) was a determinant for saccharification yield (Khatri et al. 2018a). Therefore, FTCM-depletion assay was used in this study to specifically detect the proportion of the surface exposed crystalline and amorphous cellulose at the fiber surface of raw and pretreated biomasses.

Figure 4-4 represents the surface exposure or surface accessibility of cellulose in raw (RC) and pretreated (PC) corn crop residues (before enzymatic hydrolysis). Results show that the amount of bound FTCM probes (μmol) per gram of biomass (which depends on their cognate lignocellulosic component(s) surface exposure or surface accessibility) has increased after the alkaline pretreatment step. When comparing to RC crop residues, the total cellulose exposure (GC3a + CC17 probes binding) or total cellulose surface accessibility of PC crop residues increased 2-fold (Figure 4-4A). The increase in total cellulose exposure (GC3a + CC17 probes binding) on the fiber surface is accompanied by the 2.01 ± 0.09 -fold increase in crystalline cellulose (GC3a probe binding) and 2.30 ± 0.07 -fold increase in amorphous cellulose (CC17 probe binding) (Figures 4B and C). This indicates that the surface accessibility of cellulose has increased after the alkaline pretreatment. Furthermore, the increase of the amorphous cellulose exposure was slightly higher than the increase of the crystalline cellulose exposure (Figures 4B and C). One explanation of this difference involves the well-known negative impact of the alkaline pretreatment on cellulose crystallinity (Fan et al., 1987; Sun and Cheng, 2002). These results are also compatible with the expected impact of similar alkaline pretreatment on corn crop residues (Khatri et al. et al., 2018a).

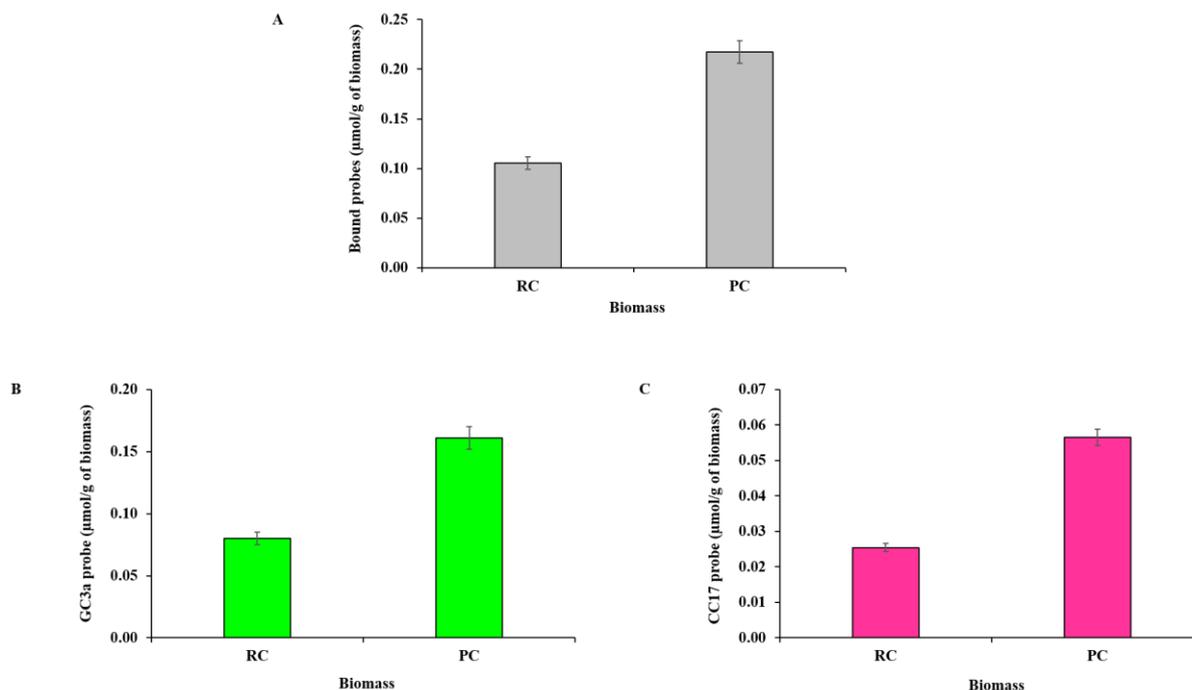


Figure 4-4 : Surface exposure of A) total cellulose, B) crystalline cellulose and C) amorphous cellulose before and after alkaline pretreatment as monitored by FTCM-depletion assay. Error bars represent the standard deviation.

4.2.3.2. Biomass deconstruction

4.2.3.3. Sugar conversion rates and biomass fractionation

As mentioned previously, the increase in total cellulose accessibility is expected to enhance the subsequent hydrolysis efficiency. The impact of different treatments on production of reducing sugars (Figure 4-5A), glucose production yield (Figure 4-5B) and biomass fractionation (Figure 4-5C) are presented in Figure 4-5.

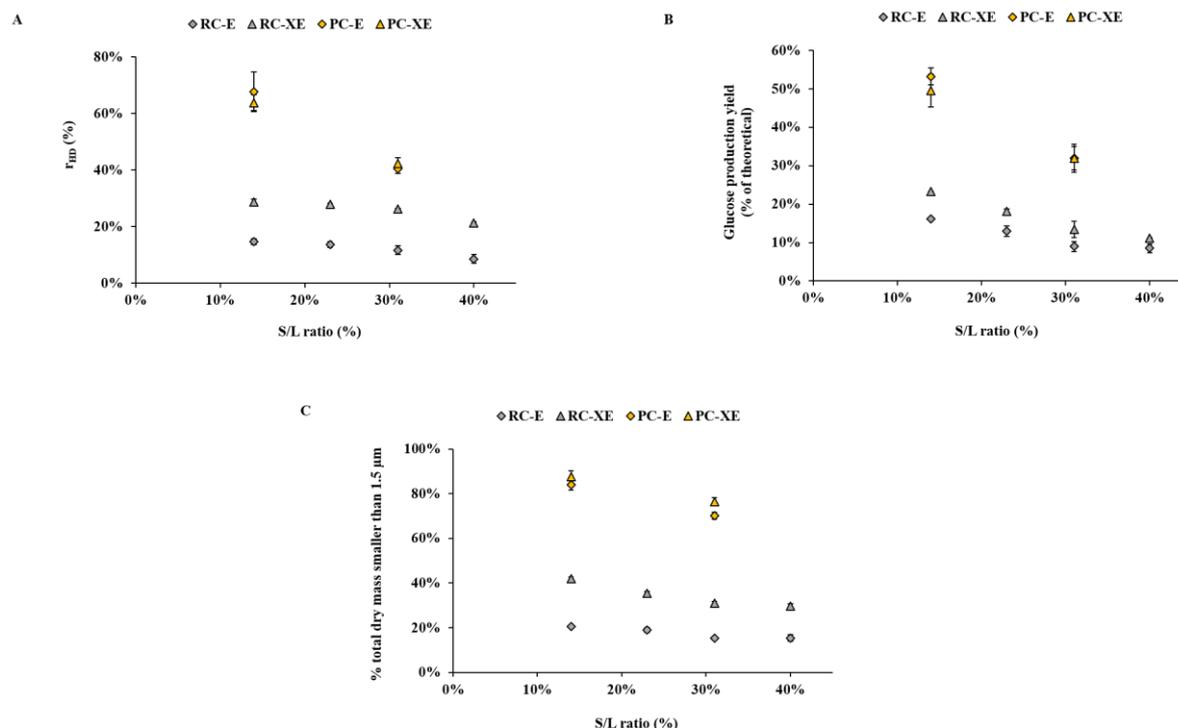


Figure 4-5: A) impact of S/L ratio on reducing sugar conversion rates after 48 h of enzymatic hydrolysis. r_{HD} is the rate of holocellulose deconstruction (or reducing sugars conversion), expressed as grams of glucose equivalents per 100 grams of holocellulose into the initial biomass. B) glucose production yield (% of theoretical), after 48 h enzymatic hydrolysis. C) fraction of total dry biomass smaller than 1.5 µm after 48 h of enzymatic hydrolysis. RC-E, raw corn without a previous bioextrusion step; RC-XE, raw corn with a previous bioextrusion step; PC-E, alkaline pretreated corn without bioextrusion; PC-XE alkaline pretreated corn with previous bioextrusion. Error bars represent the standard deviation.

4.2.3.3.1. Influence of solid loadings.

In all cases, increasing solid concentration led to a gradual decline in the holocellulose hydrolysis. In particular, increasing the S/L ratio from 14% to 40% led to a 42% and 25% decrease in the reducing sugars production for non-bioextrudated (RC-E) and bioextrudated (RC-XE) raw corn, respectively (Figure 4-5A). In addition, the S/L ratio increment led to a 47% and a 52% decrease in the final glucose production yield for RC-E and RC-XE, respectively (Figure 4-5B). In the case of PC, no significant differences between non-bioextrudated (PC-E) and bioextrudated (PC-XE) biomasses were observed. Reducing sugar production and glucose production yield dropped by at least 36% and 35%, respectively, when increasing the S/L ratio from 14% to 31%. These results clearly demonstrate the negative influence of solid loadings on reducing sugar production and glucose production yield, regardless of using alkaline pretreatment or bioextrusion. The negative influence of the solid loading factor on the hydrolysis has been observed with other biomasses and batch conditions (Du et al., 2017; Geng et al., 2015).

4.2.3.3.2. Influence of the alkaline pretreatment step

Alkaline pretreatment of the biomass led to a significant increase of the final sugar conversion rates. The highest total reducing sugars production (~ 68%) and glucose production yield (~ 53%) were obtained with the alkaline pretreated biomass (Figures 5A and B). These results are also fully compatible with the higher surface cellulose exposure (both crystalline and amorphous) detected for PC biomass by FTCM-depletion assay (Figure 4-4). Alkaline

pretreatment has been shown to improve the enzymatic hydrolysis of biomass (Sun and Cheng, 2002). Furthermore, there was no significant difference in the reducing sugar production and glucose production yield between the non-bioextruded (PC-E) and bioextruded (PC-XE) alkaline pretreated corn (Figures 5A and B). The efficiency of the pretreatment used in this study could explain the absence of impact from the additional bioextrusion step. The efficient alkaline pretreatment highly improves the enzymatic accessibility thus strongly reducing the need for an additional biocatalyst impregnation step (bioextrusion).

4.2.3.3.3. Influence of the bioextrusion step.

In RC biomass, bioextrusion increased the total reducing sugar conversion by at least 94% (in the case of 14% S/L ratio) for all S/L ratio conditions (Figure 4-5A). The highest increase of 149% was seen in the case of 40% S/L ratio. In the case of glucose production yield, bioextrusion increased the glucose production yield rates by at least 31% (in the case of 40% S/L ratio) and the highest increase of 49% was observed for S/L ratio of 31% (Figure 4-5B). The bioextrusion's positive influence on glucose production yield was less pronounced than on total reducing sugar conversion (Figures 5A and B). However, one must be aware that reducing sugar measurements are non-specific. DNS analysis also titrates poly/oligosaccharides and monosaccharides reducing ends obtained from hemicellulose hydrolysis. This may explain the observed differences between glucose conversion yield and total reducing sugars conversions. It should be noted that the maximal glucose conversion yield achieved with bioextrusion (RC-XE) was 23% (in the case of 14% S/L ratio) compared to the mere 16% (in the case of 14% S/L ratio) conversion yield measured for non bioextrusion (RC-E) residues (Figure 4-5B), indicating that it did improve hydrolysis, although much less efficiently than alkaline pretreatment (~ 50% glucose conversion yield). The positive influence of bioextrusion on glucose production yield is clearly negatively influenced by the solid loading but to a lesser extent than on reducing sugar conversion (Figures 5A and B).

Mixing the enzymes with biomass during mechanical treatment using the bioextrusion technique appears to significantly improve the enzymatic hydrolysis of RC. These enhanced hydrolysis results can be associated with good bioextrusion dispersive and distributive mixing conditions, especially by means of the kneading blocks. These characteristics can improve mass transfer, agitation efficiency and allow higher contact between enzymes and substrate. These significant improvements are obtained without high temperatures or strong chemicals and with relatively very high solid loadings (up to 40 % of S/L ratio). Bioextrusion positive influence can be used as a way to increase the sugar production for a given substrate loading, or as a way to retain good hydrolysis outcomes with higher substrate loadings and reduced water consumption.

In the case of PC, comparable conversion rates were obtained with or without the bioextrusion step (Figures 5A and B). This information highlights that the good mixing conditions of the bioextrusion step did not afford any additional advantage when the intensive alkaline pretreatment was used.

4.2.3.4. Impact on biomass fractionation

The proportion of dry mass loss after 48 h of enzymatic hydrolysis was measured and analyzed for biomass fractionation using particle size distribution for all reaction conditions (Figure 4-5C). The changes in proportion of particles under 1.5 μm should corroborate the sugar conversion rates discussed above (Figures 5A and B).

It was apparent that increasing the S/L ratio led to a diminished production of small particles (dry biomass smaller than 1.5 μm) (Figure 4-5C). This suggests that the deconstruction of biomass by enzymes is relatively hindered at higher substrate loadings, which also explains the negative influence of solid loadings on sugar conversion rates (Figures 5A and B). Sugar production is a result of holocellulose deconstruction by enzymatic hydrolysis that is dependent on biomass fractionation (Samaniuk et al., 2011b). However, the correlation between size and hydrolysis varies depending on the initial biomass and the process conditions. In raw biomass, bioextrusion (RC-XE) promoted particles size reduction when compared to RC-E. Indirectly, this explains the impact of bioextrusion on increased enzymatic hydrolysis which is in agreement with reducing sugar conversion rates and glucose production yield (Figures 5A and B).

Furthermore, alkaline pretreated biomass exhibited maximum biomass fractionation when compared to raw biomass. Figure 4-5C shows that for PC-E and PC-XE the difference in terms of particle size distribution between 14 and 31% of S/L ratios is relatively less pronounced than the difference in terms of conversion rates (Figures 5A and B). Moreover, a slight increase ($\sim 9\%$) of the proportion of particles under 1.5 μm is observable for 31% of S/L ratio for the PC-XE (Figure 4-5C). This may indicate a small improvement of the fractionation using the bioextrusion step even when an intense alkaline pretreatment step was used.

4.2.3.5. Surface exposed cellulose after enzymatic hydrolysis.

The maximum observed glucose production yield of $\sim 50\%$ suggests that there must be a significant amount of unhydrolyzed biomass retained. Therefore, after hydrolysis (48 h) of various pretreated corn crop-residues, the unhydrolyzed components were tracked by FTCM-depletion assay. Figures 6 A-D represent crystalline and amorphous cellulose accessibility profiles before and after hydrolysis, for both RC and PC biomass, as detected by FTCM-depletion assay. Equivalent quantities (i.e. 25 mg) of biomass residues were used for all the FTCM tests presented in Figure 6.

Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

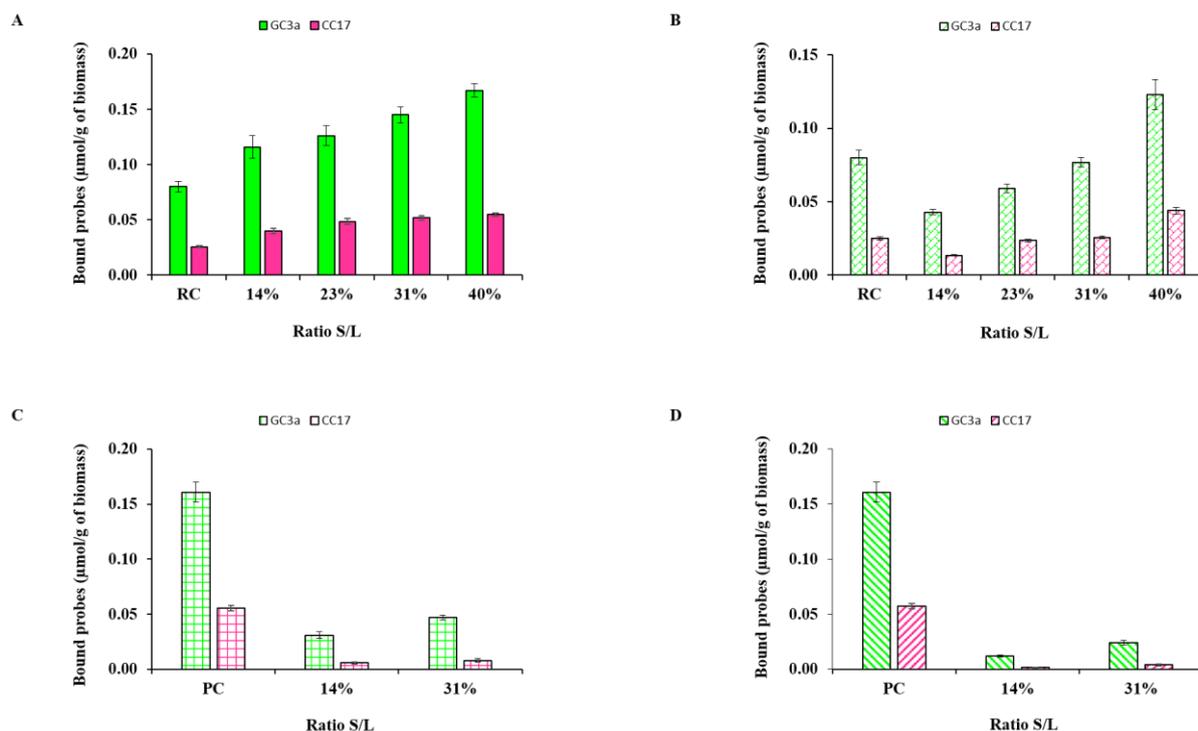


Figure 4-6 : Surface accessibility profile of lignocellulosic components in corn crop residues after enzymatic hydrolysis at various S/L ratios. A) FTCM probes signals for RC-E, compared to raw biomass (RC) B) RC-XE samples compared to RC C) PC-E samples compared to pretreated corn (PC) D) PC-XE samples compared to PC. RC-E, raw corn without a previous bioextrusion step; RC-XE, raw corn with a previous bioextrusion step; PC-E, alkaline pretreated corn without bioextrusion; PC-XE, alkaline pretreated corn with previous bioextrusion. Green and cherry color represents GC3a and CC17 FTCM probe, respectively. RC represents the surface accessibility profile unhydrolyzed raw corn crop residues (from Figure 4-5). PC represents the surface accessibility profile of unhydrolyzed alkaline pretreated corn crop residues (from Figure 4-5). The RC and PC surface accessibility profiles are used here for comparison purposes. Error bars represent the standard deviation.

The fiber surface exposure of raw biomass after batch hydrolysis was dominated by crystalline cellulose (2.5-3 fold higher than amorphous cellulose) under all S/L ratio (Figure 6A). This indicates that in all cases, the exposed outer surface is mostly composed of crystalline cellulose and that S/L ratio did not lead to preferential hydrolysis of either cellulose form. The dominance of crystalline cellulose in RC biomass is fully compatible with previously measured crystallinity indexes for raw corn crop residues (Kumar et al., 2009).

Cellulose accessibility profile of RC-E exhibited a gradual increment in both crystalline and amorphous cellulose with respect to the S/L ratio (Figure 6A). This comparatively higher cellulose surface exposure is due to the inherent nature of enzymatic hydrolysis. Enzymatic hydrolysis is a layer by layer process i.e. after the complete hydrolysis of an exposed polysaccharide layer, a new, previously buried or hidden, layer with different surface characteristics will expose. In this case, after 48 h of enzymatic hydrolysis, it seems that in all the S/L ratios a new polysaccharide layer with higher amount of both crystalline and amorphous cellulose is exposed. Furthermore, this increase in the surface cellulose exposure could also be related to the increase in the substrate loading. Higher substrate loading with limited enzyme supplementation or non-optimum reaction conditions is expected to leave behind a significant amount of unhydrolyzed substrate, thus increasing the detection of both crystalline and amorphous cellulose.

This suggests that enzymatic hydrolysis of RC biomass became more and more inefficient at higher S/L ratio. The higher content in exposed cellulose left after hydrolysis is fully compatible with the decreased sugar conversion yield observed for higher S/L ratio (Figures 5A and B). The detection of larger content of exposed cellulose in higher S/L ratio appears to be a direct consequence of inability of enzyme to achieve efficient cellulose degradation in low water biomass. It also suggests that inefficient conversion at high S/L ratio is not a result of lack of exposed cellulose, which was abundant under such conditions.

Similar trends were observed regarding the cellulose accessibility profiles of RC-XE biomass (Figure 6B). The amount of available cellulose at surface grew as the S/L ratio increased, corroborating sugar conversion yield indicating the negative impact of S/L ratio on enzymatic efficiency (figures 5A and B). Further, comparing results from panel A to panel B allows to emphasize the positive impact of bioextrusion on following batch hydrolysis. Comparing to RC-E cellulose accessibility profile, both crystalline and amorphous cellulose accessibility in RC-XE biomass was at least 1.25-fold lower at any given S/L ratio. This is due to an additional bioextrusion pretreatment step which led to enhanced enzymatic hydrolysis of the corn crop residues biomass as discussed earlier (Figures 5A and B). Again, in the RC-XE biomass, the fiber surface exposure was dominated by crystalline cellulose. The amorphous cellulose exposure was 2.5-3-fold lower than crystalline cellulose, suggesting that S/L ratio did not change cellulose populations (crystalline versus non-crystalline).

Figure 6C represents the cellulose accessibility profile of PC-E biomass. The result exhibits an important decrement in both crystalline and amorphous cellulose with respect to the S/L ratio. The improved enzymatic hydrolysis is likely to have hydrolyzed most of the biomass, thus leaving behind significantly lower amount of unhydrolyzed cellulose. These observations are fully compatible with the results presented in Figures 5A and B showing that alkaline pretreatment lead to the highest sugar conversion yield. The fiber surface exposure in PC-E biomass was dominated by crystalline cellulose. On the other hand, very small amount of amorphous cellulose was detected by FTCM probes for PC-E which is due to the preferential vulnerability of disordered cellulose. In the case of PC-XE biomass (Figure 6D), FTCM probes indicate a further degradation of cellulose afforded by the addition of bioextrusion to alkaline pretreatment. This additional degradation corroborates results on particle size reduction where a slight increase (~ 9%) in percentage of small particles was observed for PC-E vs PC-XE (Figure 4-5C). However, the additional degradation suggested here remains small, and did not lead to significant increase in sugar production yield. In summary, the FTCM-depletion assay strongly suggests that after 48 h of enzymatic hydrolysis of RC biomass, there was still a substantial amount of unhydrolyzed cellulose left which could be hydrolyzed by improving the enzyme concentration and/or hydrolysis time. This also suggests that the FTCM-depletion assay could be used to characterize the unhydrolyzed biomass for optimum enzymatic hydrolysis. Bioextrusion significantly reduced the unhydrolyzed total cellulose amount which may be linked with good dispersive and distributive mixing conditions, overcoming some limitations associated with high solid loadings (Ramos et al., 2015) and biomass microstructure. Alkaline pretreatment led to a strong reduction of unhydrolyzed total cellulose on the surface, which is compatible with extended biomass deconstruction (Figure 4-5C) and hydrolysis (Figures 5A and B). The strong alkaline pretreatment conditions led to a very limited influence

of the previous bioextrusion step. However, this finite influence was only detectable via FTFCM-depletion assay.

4.2.4. Industrial perspectives

Bioextrusion demonstrated a significant improvement for the raw LCB valorization. In raw LCB, this mild condition pretreatment proved to be efficient with very high substrate loadings (up to 40% of solid to liquid ratio) and allowed good hydrolysis conditions while increasing the substrate concentration. In addition, extrusion is a continuous process that is easily adaptable to industrial scale. Therefore, bioextrusion would be a viable option for industries to obtain concentrated sugars, especially for second generation bioethanol production, while keeping mild pretreatment conditions with a very limited impact of water consumption and removal.

However, the best hydrolysis outcomes were obtained with severe alkaline pretreatment, which seems to strongly reduce the positive influence of the bioextrusion step. This result supports the idea that the removal of the ligno-hemicellulosic barrier allows good enzymatic impregnation of the biomass even without bioextrusion. Nevertheless, LCB pretreatment is one of the costliest step in the biological production of cellulosic ethanol (about 20% of the total cost) (Yang and Wyman, 2008). Such a severe alkaline pretreatment, close to the conditions used in the paper industry, is not economically viable. This suggests that there is a challenge to find a milder alkaline pretreatment conditions which could go along with bioextrusion to improve the LCB hydrolysis with high solid loadings. Existing mild reactive extrusion pretreatments (Duque et al., 2017; Vandebossche et al., 2016) could be a solution to limit the inhibiting side-effects of strong physico-chemical pretreatments, while allowing process continuity with bioextrusion.

Furthermore, FTFCM-depletion assay allowed inspection of the cellulose accessibility profile for both raw and alkaline pretreated corn crop residues. Total cellulose accessibility was found to be higher for alkaline pretreated biomass. To our knowledge, this is the first time the FTFCM methodology has helped to characterize the unhydrolyzed materials (after 48h of enzymatic hydrolysis). Compare to alkaline pretreated biomass, the raw biomass exhibited significantly higher total cellulose accessibility in the unhydrolyzed biomass after 48 h of enzymatic hydrolysis. Moreover, it demonstrated that surface exposed cellulose was mainly in its crystalline (most resistant) form. The FTFCM-depletion assay findings supported the information obtained with classical analytical techniques. FTFCM-depletion assay may offer considerable potential to optimize and increase the overall performance of the biomass pretreatment strategies for biofuel production technologies.

4.2.5. Conclusions

The bioextrusion pretreatment enhanced the subsequent batch hydrolysis of raw corn crop residues at high solid loadings (solid/liquid ratio up to 40%). The positive influence of bioextrusion was negatively influenced by the solid loading(s) The surface cellulose accessibility analysis via FTFCM-depletion assay supported classical analyses and exhibited that the negative impact of high solid/liquid ratio on conversion yield were not associated with a lack of exposed cellulose. Bioextrusion was found to be less efficient on severe alkaline pretreated biomass but being a mild and solvent limiting pretreatment technique, it might help to decrease pretreatment costs.

Les résultats obtenus après 48 h d'hydrolyse attestent d'une amélioration significative de l'hydrolyse de l'holocellulose avec bioextrusion, visibles même à un ratio S/L de 40% pour le maïs brut. La bioextrusion augmente la production de sucres réducteurs, la conversion du glucose et réduit les tailles de particules. L'évolution de la cellulose cristalline et amorphe exposée à la surface de la biomasse est intimement liée aux performances hydrolytiques observées. Toutefois, les résultats d'hydrolyse sur maïs prétraité sont meilleurs et la déconstruction poussée de la barrière ligno-hémicellulosique réduit nettement l'intérêt de l'étape de bioextrusion. Dans tous les cas, l'augmentation de la concentration en substrat provoque une diminution de l'efficacité hydrolytique. Ces résultats finaux ne permettent néanmoins qu'une vision statique de l'influence de la bioextrusion. La deuxième partie présente donc les résultats obtenus lors de la cinétique d'hydrolyse avec 48 h. L'objectif est d'observer d'une part si les conclusions au bout de 48 h sont valides sur le reste de la cinétique et, d'autre part, si la bioextrusion influence aussi la vitesse d'hydrolyse.

4.1. Résultats cinétiques de l'hydrolyse enzymatique

Suivant les mêmes protocoles que pour les expériences menées à 48 h, d'autres points cinétiques sont réalisés en simultané sur l'ensemble des expériences. Avec ou sans bioextrusion, des tubes correspondants aux points à 4 h, 10 h et 24 h sont mis en place. Les premières mesures sur les matières sont faites à $t = 0$ h sans bioextrusion et $t = 0,25$ h (après extrusion) avec bioextrusion. Ces différents points permettent d'observer l'évolution de la production en sucres réducteurs au cours du temps. Les graphiques 4-2, 4-3, 4-4 et 4-5 indiquent les l'évolution de la production en sucres réducteurs en fonction du temps. Ces résultats sont exprimés en taux de déconstruction de l'holocellulose (r_{HD}), défini précédemment en g d'équivalents glucose par 100 g d'holocellulose initiale dans la biomasse.

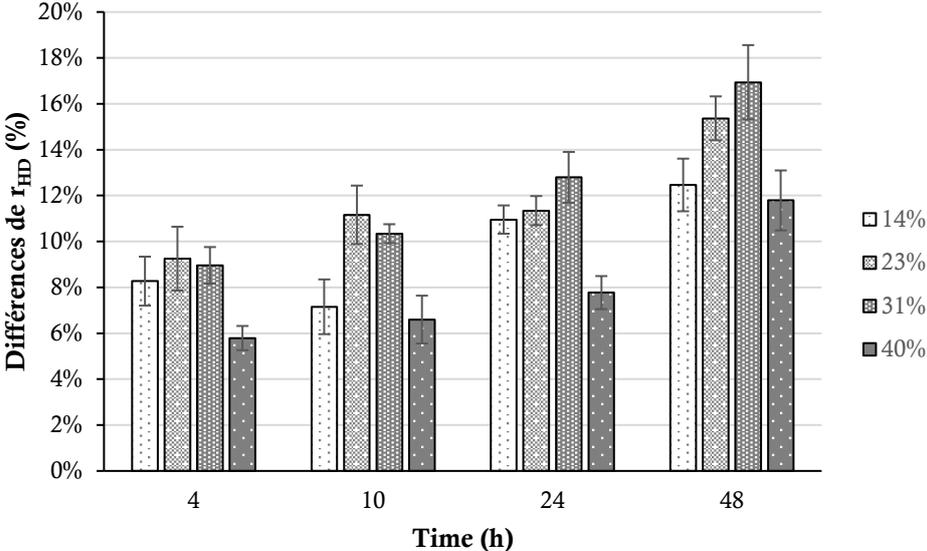
4.1.1. Maïs brut

Les graphiques 4-2 et 4-3 présentent les résultats de la déconstruction enzymatique de l'holocellulose au sein du maïs brut. Les résultats du graphique 4-2 ont été obtenus sans bioextrusions préalable contrairement à ceux du graphique 4-3. Deux informations principales, déjà observée à 48 h, sont visibles sur l'ensemble de la cinétique. D'une part le ratio S/L a une influence négative sur la déconstruction de la biomasse; de l'autre, l'étape de bioextrusion améliore la dégradation enzymatique du maïs brut.

Les points à 0 h (sans bioextrusion) et 0,25 h (avec bioextrusion) ne peuvent pas être directement comparés. Cependant, les points à 0 h peuvent servir de blancs quant à la quantité de sucres réducteurs présents initialement, avant le début de l'hydrolyse. Ce signal est majoritairement lié au cocktail enzymatique (sucres et protéines), ainsi qu'aux extractibles hydrosolubles réducteurs (sucres, protéines, tannins). En corrigeant les valeurs à 0,25 h par celles mesurées à 0 h, des valeurs de r_{HD} proches de 7 % en moyenne sont observées. Il est clair qu'une hydrolyse significative se déroule au cours de l'extrusion et des quelques minutes nécessaires aux prélèvements. En outre, les différences en termes de production de sucres réducteurs, s'accroissent au cours du temps comme visible sur le graphique 4-1. Les

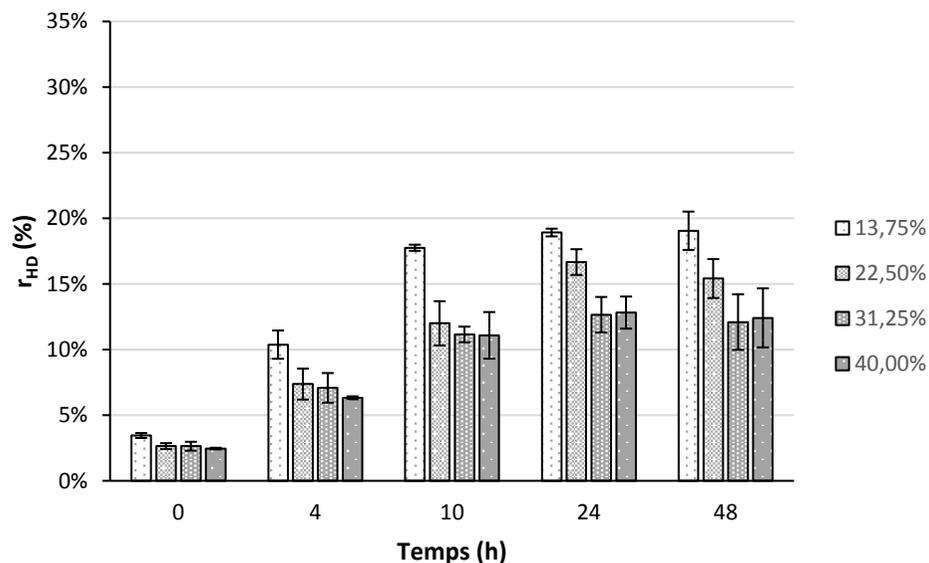
Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

améliorations permises par la bioextrusion sont maximales en termes de déconstruction pour

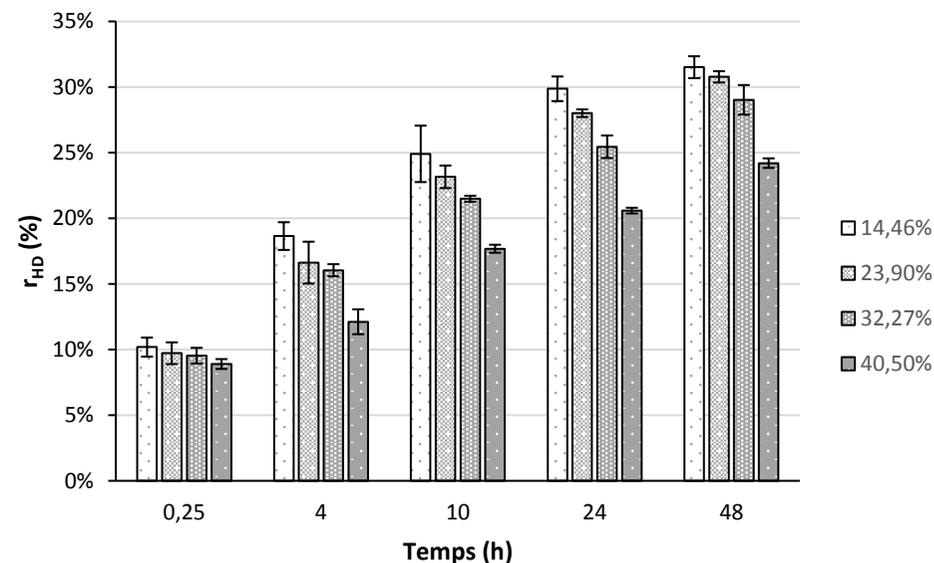


Graphique 4-1 : Ecarts en termes de déconstruction de l'holocellulose (r_{HD}) entre les expériences avec et sans bioextrusion au cours du temps.

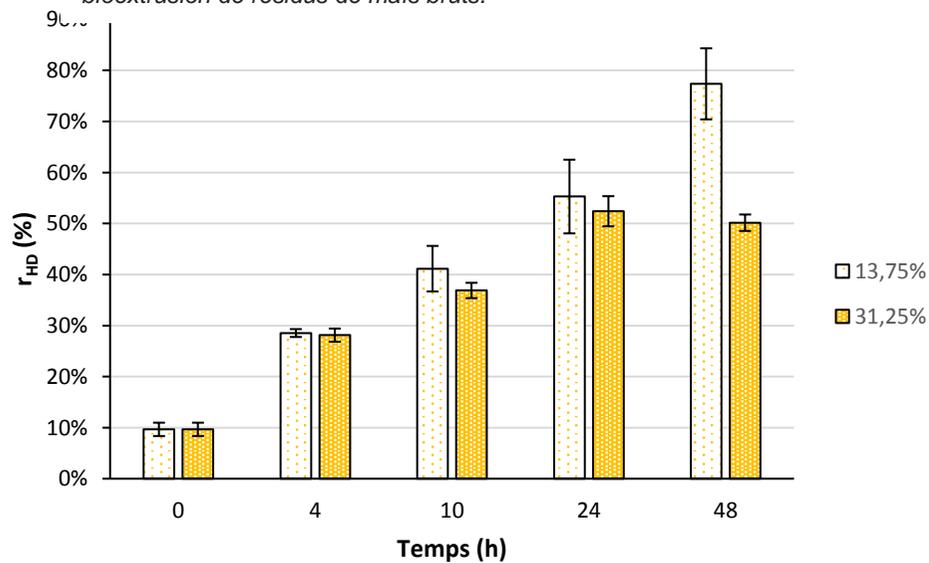
Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.



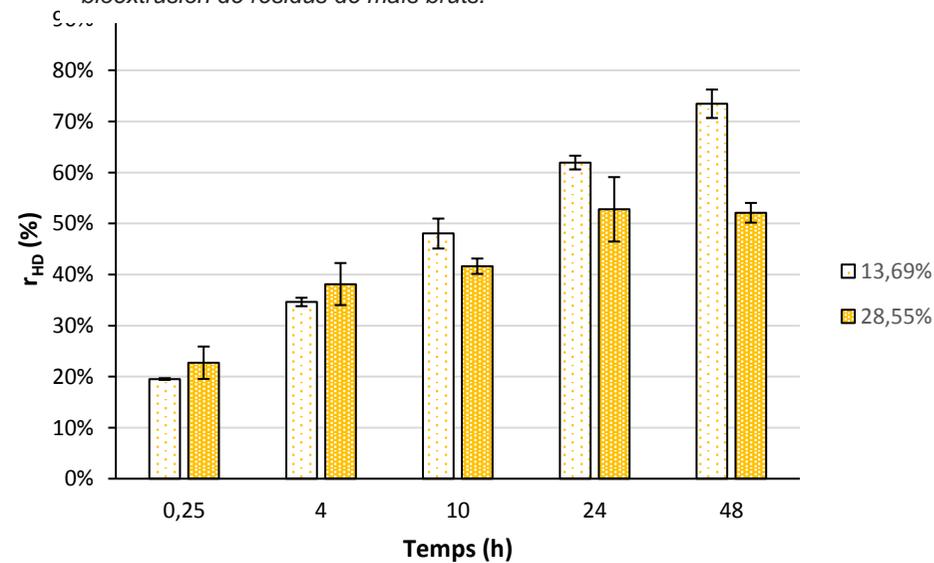
Graphique 4-2 : Cinétique de dégradation enzymatique sans bioextrusion de résidus de maïs bruts.



Graphique 4-3 : Cinétique de dégradation enzymatique avec bioextrusion de résidus de maïs bruts.



Graphique 4-4 : Cinétique de dégradation enzymatique sans bioextrusion de résidus de maïs prétraités.



Graphique 4-5 : Cinétique de dégradation enzymatique avec bioextrusion de résidus de maïs prétraités.

Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.

Les tendances observées à 48 h au niveau des écarts de sucres réducteurs suivant la dilution du milieu sont déjà visibles à 4 h. Sans bioextrusion (Graphique 4-2), l'hydrolyse dans les conditions diluées (14%) se détache nettement des autres conditions à la production de sucres réducteurs relativement similaire. Des écarts moyens proches de 5 % de taux de déconstruction de l'holocellulose sont mesurés. Avec bioextrusion les écarts entre les ratios S/L sont moins nets. Les conditions à 23 et 31 % se détachent visiblement de celle à 40%. Des résultats similaires sont par contre visibles entre 14% et 23%, et entre 23% et 31%. Les écarts moyens autour de 15% sont mesurés entre la condition la plus diluée et celle la plus concentrée.

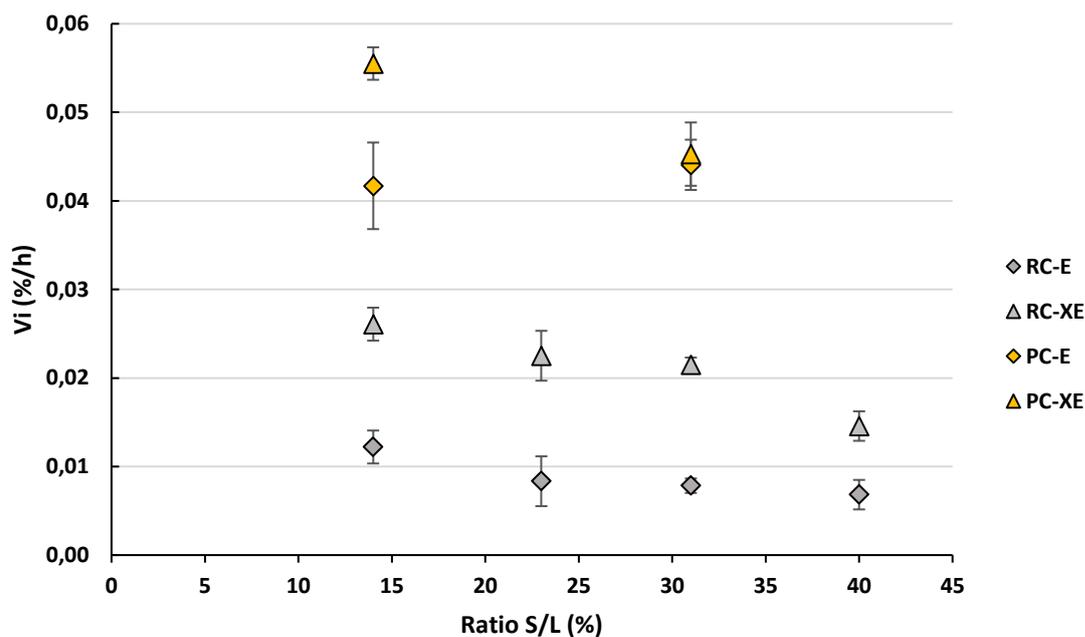
Une partie des résultats observés à 48 h se retrouvent sur l'ensemble de la cinétique. L'influence du ratio S/L semble, en particulier, rester stable entre 4 et 48 h. Les points cinétiques mesurés au cours de l'hydrolyse confirment l'influence positive de la bioextrusion, tout en apportant de nouvelles informations. Premièrement, les résultats de début de cinétique attestent de l'existence d'une activité hydrolytique durant l'étape de bioextrusion. Deuxièmement, l'influence positive de la bioextrusion observé à 48 h, est visible sur l'ensemble de la cinétique. Cependant, celle-ci augmente au cours du temps et est maximale à la fin de la réaction. Cela indique que l'influence de la bioextrusion n'est pas seulement visible pendant l'étape en extrudeuse, mais aussi tout au long de la cinétique.

4.1.2. Maïs prétraité

Dans le cas du maïs prétraité, la majorité des points cinétiques confirment l'absence d'influence de la bioextrusion observée à 48 h, par les résultats similaires observés. Seuls les résultats à 4 h indiquent une différence significative en faveur de l'étape de bioextrusion (Graphiques 4-5 et 4-6). De plus, comme pour le maïs brut, la comparaison des valeurs à 0,25 h avec bioextrusion et à 0 h sans bioextrusion montrent l'existence d'une activité enzymatique du cocktail cellulolytique au cours du mélange en extrusion. Les conditions sévères de prétraitement alcalin réduisent donc l'influence positive de la bioextrusion au début de la réaction d'hydrolyse.

4.1.3. Vitesses initiales de réaction

Le calcul des vitesses initiales de déconstruction de l'holocellulose correspond au coefficient directeur de la droite entre les points à 0 et 4 h des cinétiques d'hydrolyse.



Graphique 4-6 : Comparaison des vitesses initiales de taux de déconstruction de l'holocellulose.

Le graphique 4-5 permet la comparaison des vitesses initiales de la déconstruction des biomasses. Cet aspect cinétique confirme l'aspect statique observé. En effet, les vitesses initiales les plus élevées correspondent aussi aux conditions présentant les meilleurs taux de déconstruction de l'holocellulose. Ainsi ces facteurs n'influent pas seulement sur la concentration des sucres réducteurs produits, mais sur la vitesse initiale de production. Dans le cas du maïs brut, les vitesses initiales sont supérieures avec bioextrusion pour toutes les conditions de ratio S/L testées. Pour le maïs prétraité, seules les conditions les plus diluées montrent une amélioration. Bien que les résultats finaux d'hydrolyse du maïs prétraité soient similaires avec et sans bioextrusion, ce dernier résultat confirme la plus-value de cette étape au tout début de la réaction.

4.1.4. Conclusion

L'influence positive de la bioextrusion, du prétraitement alcalin et l'influence négative du ratio S/L observés après 48 h d'hydrolyse se retrouvent tout au long de la cinétique. Les mesures de vitesses initiales confirment ces mêmes influences au niveau cinétique. Les milieux présentant de bons résultats d'hydrolyses sont aussi associés à une initiation plus rapide des réactions enzymatiques. L'influence positive de la bioextrusion sur le maïs brut augmente au cours de la réaction. À la confirmation d'une hydrolyse enzymatique durant la bioextrusion, s'ajoute un effet sur le long terme visible sur l'étape suivante d'hydrolyse en conditions fermées. L'influence limitée de la bioextrusion sur le maïs prétraité est par ailleurs nuancée par une hydrolyse plus rapide observée jusqu'à 4 h de réaction.

4.2. Bioextrusion d'écorces de bouleau.

Des expériences de bioextrusion, suivant les mêmes protocoles mis en place pour le maïs précédemment, ont été réalisées avec des fragments d'écorce de bouleau blanc (*Betula pendula*) (M.1.3.). Leur teneur en matière sèche est de 94% et leur composition chimique est résumée dans le Tableau 4-1.

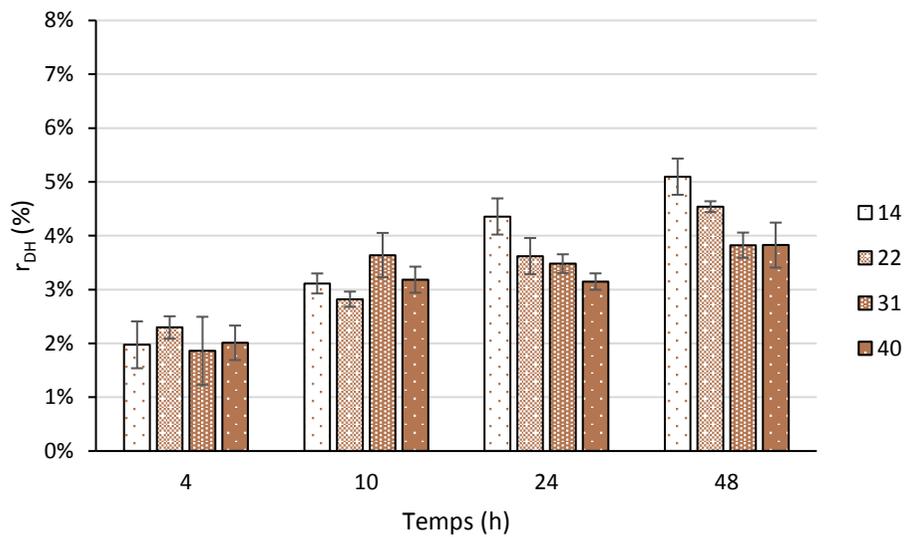
Tableau 4-1 : Composition chimique des fragments d'écorce de bouleau blanc.

	Proportions (%)		
Cellulose (eq)	22,6	±	0,4
Hémicelluloses (eq)	19,3	±	0,2
Lignine (eq)	42,0	±	0,2
Matière minérale	2,1	±	0,1

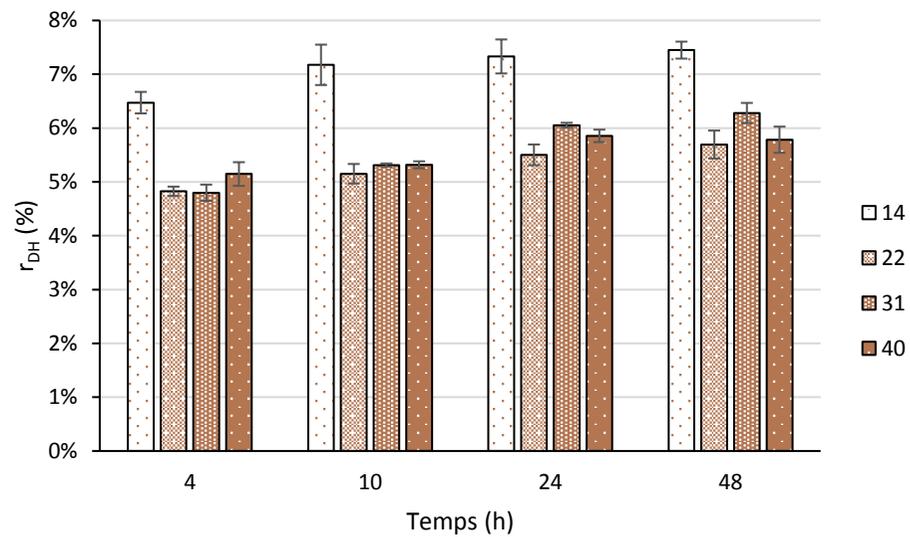
Les proportions sont indiquées en % de matière sèche totale. Les fraction cellulosique, hémicellulosiques et ligneuses sont estimées à partir de la méthode de Van Soest et al., 1991 (P.2.4).

Les graphiques 4-7 et 4-8 présentent les résultats cinétiques obtenus sans et avec bioextrusion. Les valeurs présentées sont corrigées des valeurs obtenues à $t = 0$ h sans bioextrusion, afin de retirer les sucres présents avant le début de la réaction enzymatique. Si l'augmentation significative des sucres réducteurs au cours du temps atteste d'une hydrolyse enzymatique, celle-ci est très réduite. Que ce soit avec ou sans bioextrusion, les résultats sont inférieurs à 8% en termes de déconstruction de l'holocellulose. Les résultats avec bioextrusion montrent une légère amélioration de l'hydrolyse, surtout au début de la cinétique. Il est clair que la contrainte mécanique influence les résultats. En effet, sans extrusion, les fragments d'écorce présente une fraction sous forme de fines particules formant un dépôt et une autre flottant à la surface du milieu réactionnel. L'étape d'extrusion réduit l'ensemble des fragments en poudre donnant à la sortie une pâte homogène.

Chapitre IV : Nouvelles approches de la Bioextrusion : Analyses surfaciques et nature du substrat.



Graphique 4-7: Cinétique de dégradation enzymatique sans bioextrusion de fragments d'écorces de bouleau blanc. Les valeurs affichées sont les valeurs nettes de rDH



Graphique 4-8: Cinétique de dégradation enzymatique avec bioextrusion de fragments d'écorce de bouleau blanc.

Par comparaison, après 0,25 h (temps de séjour et de prélèvement cumulés) des taux de déconstruction de l'holocellulose maximaux moyens nets de 4,1 %, 7,4% et 13,1 % sont mesurés pour les écorces de bouleau, les résidus de maïs bruts et les résidus de maïs prétraités respectivement. Après 48 h d'hydrolyse, les valeurs maximales moyennes nettes obtenues pour ces mêmes bioextrudats sont de 7,4%, 28,7% et 63,8%. Il existe une nette influence de la nature du substrat sur les résultats de bioextrusion, que ce soit sur le court ou le long terme. Du fait de la grande complexité des substrats, il est impossible de clairement conclure quant à l'origine de cette influence. Cependant, l'une des causes majeures probables limitant l'hydrolyse est le taux de lignine dans la biomasse (Tableau 4-1, Fig. 4-4-3). La fraction polyphénolique est connue limiter l'activité enzymatique, de par son aspect hydrophobe et la barrière protectrice qu'elle forme, mais aussi par des phénomènes d'adsorption non-spécifique, piégeant certaines enzymes (Alvira et al., 2010; Van Dyk and Pletschke, 2012b). L'étape de bioextrusion pour ce type de substrat permet une amélioration significative pour toutes les conditions de ratios S/L, mais de façon limitée. La formation d'un milieu réactionnel homogène, à partir d'une biomasse particulièrement hydrophobe et récalcitrante, est probablement un facteur à l'origine de cette influence positive.

4.3. Conclusion et discussions du chapitre.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ces expériences de bioextrusion avec d'autres biomasses lignocellulosiques confirment l'adaptabilité de la méthode. Dans le cas du maïs, des améliorations significatives sont observées au bout de 48 h d'hydrolyse, mais aussi tout au long de la cinétique. L'ensemble des analyses attestent d'une dégradation biochimique (hydrolyse des polysaccharides, modification de la part exposée des celluloses cristalline et amorphe) ainsi que physique (réduction de tailles des particules). Un point important est la démonstration à la fois d'une activité enzymatique lors de la bioextrusion, mais aussi d'une influence sur le long terme. Cela pourrait être associé à une bonne répartition enzymatique, notamment l'amélioration des conditions d'adsorption lors de l'hydrolyse primaire, grâce aux bonnes conditions de mélange dispersif et distributif de l'extrusion. Le mélange dispersif limite la compétition entre enzymes pour un même substrat ainsi que la gêne stérique (« enzyme jamming ») à hautes concentrations enzymatiques (Várnai et al., 2013; Xiao et al., 2004b). Le mélange distributif permet lui de répartir de façon optimale les catalyseurs avec les sites accessibles des substrats celluloses.

Les mesures de marquages fluorescents (FTCM) de la cellulose cristalline et amorphe apportent de précieuses informations sur la part accessible et exposée à la surface des résidus de maïs. Elles indiquent d'une part que la fraction cristalline, la plus résistante, est toujours plus importante que celle amorphe sur la partie exposée. D'autre part, l'hydrolyse « couche par couche » des cellulases met à jour des niveaux plus ou moins riches en cellulose. Ces résultats correspondent aux autres observations hydrolytiques faites notamment sur la fraction liquide (production de sucres libres et conversion du glucose).

Les meilleurs résultats d'hydrolyse sont obtenus avec les résidus de maïs prétraités à la soude. Les conditions sévères de prétraitement réduisent considérablement l'influence de l'étape de bioextrusion. Cependant, ces conditions de traitement de la biomasses sont

habituellement associés à la formation de produits de dégradation inhibiteurs de l'étape de fermentation des sucres (Alvira et al., 2010; Sun and Cheng, 2002). Un compromis entre l'amélioration de l'hydrolysabilité par traitement physico-chimique et par bioextrusion doit être trouvé.

Enfin, les faibles résultats obtenus pour l'hydrolyse avec ou sans bioextrusion des fragments d'écorce montrent les limites de la valorisation des biomasses lignocellulosiques. En effet, la forte teneur en lignines dans ces matières est probablement à l'origine d'une activité enzymatique très réduite. L'influence observée de la bioextrusion reste positive, sans pour autant permettre un taux de déconstruction de l'holocellulose supérieur à 8%.

4.4. Références

- Adjalle, K., Larose, L.-V., Bley, J., Barnabé, S., 2017. The effect of organic nitrogenous compound content and different pretreatments on agricultural lignocellulosic biomass characterization methods. *Cellulose* 24, 1395–1406. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1199-8>
- Arantes, V., Saddler, J.N., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnol. Biofuels* 3, 4. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>
- Bombeck, P.-L., Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Montplaisir, D., Richel, A., Beauregard, M., 2017. Predicting the most appropriate wood biomass for selected industrial applications: comparison of wood, pulping, and enzymatic treatments using fluorescent-tagged carbohydrate-binding modules. *Biotechnol. Biofuels* 10. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0980-0>
- Chouvel, H., Chay, P., Cheftel, J., 1983. Enzymatic hydrolysis of starch and cereal flours at intermediate moisture contents in a continuous extrusion-reactor. *Lebensm.-Wiss. Technol. Food Sci. Technol.*
- Danisco US Inc., 2007. Accelerase 1000 – Cellulase enzyme complex for lignocellulosic biomass hydrolysis – Technical bulletin no.1 : saccharification.
- DeMartini, J.D., Pattathil, S., Miller, J.S., Li, H., Hahn, M.G., Wyman, C.E., 2013. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. *Energy Environ. Sci.* 6, 898–909. <https://doi.org/10.1039/C3EE23801F>
- Du, J., Cao, Y., Liu, G., Zhao, J., Li, X., Qu, Y., 2017. Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations. *Bioresour. Technol.* 229, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.011>
- Fan, L., Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., 1987. Enzymatic Hydrolysis, in: *Cellulose Hydrolysis, Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 21–119. https://doi.org/10.1007/978-3-642-72575-3_3
- Gatt, E., Rigal, L., Vandenbossche, V., 2018. Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: A review. *Ind. Crops Prod.* 122, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.069>
- Geng, W., Jin, Y., Jameel, H., Park, S., 2015. Strategies to achieve high-solids enzymatic hydrolysis of dilute-acid pretreated corn stover. *Bioresour. Technol.* 187, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.067>
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Govindasamy, S., Campanella, O.H., Oates, C.G., 1997. Enzymatic hydrolysis of sago starch in a twin-screw extruder. *J. Food Eng.* 32, 403–426. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(97\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00017-4)
- Hébert-Ouellet, Y., Meddeb-Mouelhi, F., Khatri, V., Cui, L., Janse, B., MacDonald, K., Beauregard, M., 2017. Tracking and predicting wood fibers processing with fluorescent carbohydrate binding modules. *Green Chem.* 19, 2603–2611. <https://doi.org/10.1039/C6GC03581G>
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science* 315, 804–807. <https://doi.org/10.1126/science.1137016>
- Hodge, D.B., Karim, M.N., Schell, D.J., McMillan, J.D., 2008. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresour. Technol.* 99, 8940–8948. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.015>
- Hong, J., Ye, X., Zhang, Y.-H.P., 2007. Quantitative Determination of Cellulose Accessibility to Cellulase Based on Adsorption of a Nonhydrolytic Fusion Protein Containing CBM and GFP with Its Applications. *Langmuir* 23, 12535–12540. <https://doi.org/10.1021/la7025686>

- Karunanithy, C., Muthukumarappan, K., 2013. Thermo-Mechanical Pretreatment of Feedstocks, in: Gu, T. (Ed.), *Green Biomass Pretreatment for Biofuels Production*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 31–65.
- Khatri, V., Hébert-Ouellet, Y., Meddeb-Mouelhi, F., Beaugard, M., 2016. Specific tracking of xylan using fluorescent-tagged carbohydrate-binding module 15 as molecular probe. *Biotechnol. Biofuels* 9, 74. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0486-1>
- Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Adjallé, K., Barnabé, S., Beaugard, M., 2018a. Determination of optimal biomass pretreatment strategies for biofuel production: investigation of relationships between surface-exposed polysaccharides and their enzymatic conversion using carbohydrate-binding modules. *Biotechnol. Biofuels* 11, 144. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1145-5>
- Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F., Beaugard, M., 2018b. New insights into the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polymers by using fluorescent tagged carbohydrate-binding modules. *Sustain. Energy Fuels* 2, 479–491. <https://doi.org/10.1039/C7SE00427C>
- Kim, J.S., Lee, Y.Y., Kim, T.H., 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.*, Pretreatment of Biomass 199, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.085>
- Kim, Y., Hendrickson, R., Mosier, N.S., Ladisch, M.R., Bals, B., Balan, V., Dale, B.E., 2008. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings. *Bioresour. Technol.*, Cellulose Conversion in Dry Grind Plants 99, 5206–5215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.031>
- Kumar, R., Mago, G., Balan, V., Wyman, C.E., 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100, 3948–3962. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.075>
- Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-x>
- Lynd, L.R., 2017. The grand challenge of cellulosic biofuels. *Nat. Biotechnol.* 35, 912.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U., 1999. Biocommodity Engineering. *Biotechnol. Prog.* 15, 777–793. <https://doi.org/10.1021/bp990109e>
- Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N., 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15, 804–816. <https://doi.org/10.1021/bp9900864>
- Ramachandriya, K.D., Wilkins, M., Atiyeh, H.K., Dunford, N.T., Hiziroglu, S., 2013. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfite pretreated Eastern redcedar. *Bioresour. Technol.* 147, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.048>
- Ramos, L.P., da Silva, L., Ballem, A.C., Pitarello, A.P., Chiarello, L.M., Silveira, M.H.L., 2015. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. *Bioresour. Technol.* 175, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.087>
- Rollin, J.A., Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Zhang, Y.-H.P., 2011. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotechnol. Bioeng.* 108, 22–30. <https://doi.org/10.1002/bit.22919>
- Samaniuk, J.R., Tim Scott, C., Root, T.W., Klingenberg, D.J., 2011. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. *Bioresour. Technol.* 102, 4489–4494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.117>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., others, 2010. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: laboratory analytical

- procedure (LAP). Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory; 2008 April. NREL Report No. Contract No -AC36-99-G010337 Spons. US Dep. Energy.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51, 780–785.
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Hernández-Meléndez, O., Vivaldo-Lima, E., Hernández-Luna, M., Barzana, E., Duque, A., Manzanares, P., Ballesteros, M., Mata, J., Castellón, E., Rigal, L., 2014. A new lignocellulosic biomass deconstruction process combining thermo-mechano chemical action and bio-catalytic enzymatic hydrolysis in a twin-screw extruder. *Ind. Crops Prod.* 55, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.022>
- Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G., Rigal, L., 2015. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Ind. Crops Prod.* 67, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.041>
- Wyman, C.E., 2013. *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*. John Wiley & Sons.
- Yang, B., Wyman, C.E., 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 2, 26–40. <https://doi.org/10.1002/bbb.49>
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2006. A functionally based model for hydrolysis of cellulose by fungal cellulase. *Biotechnol. Bioeng.* 94, 888–898. <https://doi.org/10.1002/bit.20906>
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>

M. Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

M.1. Matériel

M.1.1. Paille de blé

La matière première utilisée pour cette étude est une paille de blé tendre (*Triticum sativum L.*) fournit par la SARL Etb TAPAREL frères (Ramonville-St-Agne, France). Celle-ci a été produite à St Papoul, France à partir d'une variété de blé Anvergure. Le mélange de tiges et de feuilles est broyé à 3 mm.

M.1.2. Résidus de maïs

Les résidus de maïs (*Zea mays L.*) utilisés sont des fragments caulinaires fournis par la ferme Olivier et Sebastier Lépine d'Agrosphère Co. (Québec, Canada). C'est un mélange de tiges, feuilles et rafles broyées à 5 mm.

M.1.3. Ecorces de bouleau blanc

Les écorces utilisées pour les expériences de bioextrusion sont des fragments d'écorces de bouleau blanc (*Betula pendula*) broyés à 3 mm de. Ils sont issus des scieries industrielles du Nord du Québec (Industries T.L.T.).

M.1.4. Cocktails enzymatiques

Le cocktail enzymatique Cellic CTec2 est utilisé pour les expériences de bioextrusion de la paille de blé prétraitée. Ce cocktail commercial est fourni par Novozymes Inc.

Le cocktail ACCELLERASE® DUET fourni par Genencor® est utilisé pour les expériences de bioextrusion des résidus de maïs bruts, prétraités et des fragments d'écorces de bouleau blanc.

M.1.5. Extrudeuses

L'extrudeuse utilisée pour le prétraitement alcalin de la paille de blé est une Clextral BC 45 (Firminy, France). Celle utilisée pour les expériences de bioextrusion est une Clextral EV 25 (Firminy France). L'extrudeuse utilisée pour la bioextrusion des résidus de maïs et des écorces de bouleau blanc est une Entek (OR, US).

M.2. Méthodes

Pour toute méthode d'analyse utilisée, les résultats ont au moins été dupliqués et pour la plupart tripliqués.

M.2.1. Analyse de la fraction liquide

M.2.1.1. Préparation des liquides

Les liquides analysés sont les surnageants des différents échantillons obtenus par centrifugation (Centrifugeuse Sigma 6-16K) à 10 000g pendant 10 min à 4°C. Tous les liquides (sauf pour les mesures de sucres réducteurs) sont filtrés à l'aide de filtres en acétate de cellulose d'une porosité de 0,22 µm.

M.2.1.2. Concentrations et conversion en glucose, xylose et arabinose.

Les concentrations du glucose, xylose et arabinose sont déterminés par analyse HPLC à l'aide d'un système Dionex (pompe P580, injecteur ASI-100) équipé d'un détecteur réfractomètre Varian 350 à 50°C. La colonne est une Rezex™ RHM-Monosaccharide H⁺ (8%) (30x7,8 mm) équipée d'une pré-colonne avec une cartouche de sécurité de la même phase. La colonne est maintenue à 80°C à l'aide d'un four. Le débit d'éluant (eau milli Q) est fixé à 0,6 mL.min⁻¹. La durée de l'analyse est de 35 min.

La conversion des sucres (C_S) est exprimée en %

$$C_S = \frac{[Sucre] \times V_{ech}}{m_{ech} \times t_{sech} \times t_S} \times 100$$

Matériel et méthodes

[*Sucre*] la concentration massique en sucre (glucose, xylose, arabinose) déterminée par HPLC en mg/mL

V_{ech} : le volume de l'échantillon en mL

m_{ech} : la masse de l'échantillon en mg

t_{sech} : la teneur en matière sèche de l'échantillon

t_s : la teneur en sucre (glucose, xylose, arabinose) de la biomasse utilisée, déterminée par la méthode NREL (Sluiter et al., 2010).

M.2.1.3. Mesure des concentrations en acide phénoliques

L'analyse par HPLC des acides phénoliques est adaptée de la méthode développée par Canas et al., 2011. Elle est réalisée via un système Dionex Ultimate 3000 (pompe, injecteur automatique, four, détecteur) avec une colonne Lichrospher RP 18 (5 μm) (40x4 mm) équipée d'une précolonne. La séparation est réalisée à 40°C avec un gradient composé de deux solutions ; solution A : eau/acide formique (98 : 2 vol) et solution B : méthanol/eau/acide formique (70 :28 :2 vol). Le gradient retenu est : B = 0% isocratique pendant 3 min, B = 0 à 40% en 22 min, B = 40% à 60% en 18 min, B = 60% en isocratique pendant 12 min, B = 60 à 80% en 5 min, B = 80% isocratique pendant 5 min. La détection est réalisée en utilisant un détecteur UV à barrette de diode. Pour l'analyse quantitative des standards et des échantillons, une longueur d'onde de 280 nm a été utilisée.

M.2.1.4. Mesure des masses moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique (CES).

Les analyses CES sont réalisées à partir d'un système Dionex (pompe P580, injecteur ASI-100) équipé d'un détecteur UV à barrette de diode suivi d'un réfractomètre Varian 350 à 30°C. Les colonnes utilisées sont une PL aquagel-OH 40 (8 μm) (7,5x300 mm) suivie d'une PL aquagel-OH 30 (8 μm) (7,5x300 mm), le tout précédé d'une pré-colonne PL aquagel-OH Guard (8 μm) (7,5x300 mm). Les colonnes sont maintenues à 30°C à l'aide d'un four. Le débit d'éluant (eau milli Q avec 0,1% de NaN_3) est fixé à 0,8 $mL \cdot min^{-1}$. La durée de l'analyse est de 30 min. Des standards de pullulans entre 180 et 1 220 000 kDa sont utilisés par défaut. Ils permettent de calculer une approximation de la masse molaire moléculaire en poids (\bar{M}_m) des fractions présentes dans les échantillons.

M.2.1.5. Mesure de sucres réducteurs libres.

Pour 1 L de solution DNS (d'après Coughlan and Moloney, 1988) :

- 10 g d'acide 3,5 Dinitrosalicylique
- 200 mL NaOH (2N)
- 300 g de sels de Rochelle (tartarate de Na-K)
- 500 mL d'eau distillée

Une fois la dissolution complète des réactifs, le volume est ajusté à 1000 mL avec de l'eau distillée. La solution est conservée à l'abri de la lumière à température ambiante pendant une durée maximale de un mois.

L'absorbance des échantillons est exprimée sous forme d'équivalents glucose à partir d'une courbe d'étalonnage établie pour une gamme donnée de concentrations en glucose (g/L). Dans la cadre des expériences réalisées, la gamme d'étalonnage a été définie de 0,5 à 5 g/L. L'équation issue de cette courbe permet faire correspondre l'absorbance des échantillons à une concentration en équivalents glucose ($[Glucose]_{eq}$). Standards et échantillons à doser sont dosés en même temps.

Dans des micro-tubes de 1,5 mL, 50 μL d'échantillon ou standard ou eau distillée (blanc) et 150 μL de solution DNS sont introduits. Les tubes sont fermés et agités avant d'être plongés dans une eau à

Matériel et méthodes

95°C pendant 5 min, puis plongés dans la glace pendant 5 min. Après réaction, 1 mL d'eau distillée est ajouté à chacun des tubes. Les tubes sont agités à nouveau et l'absorbance est mesurée à 540 nm.

Les rendements en sucres réducteurs libres par rapport à la quantité théorique d'holocellulose (R_{libres}) sont obtenus par la formule suivante.

$$R_{libres} = \frac{[Glucose]_{eq} \times V_{ech}}{m_{ech} \times t_{sech} \times (t_c + t_{Hc})} \times 100$$

$[Glucose]_{eq}$: la concentration massique en équivalents glucose déterminée par spectroscopie en mg/mL

V_{ech} : le volume de l'échantillon en mL

m_{ech} : la masse de l'échantillon en mg

t_{sech} : la teneur en matière sèche de l'échantillon

$(t_c + t_{Hc})$: la teneur en holocellulose de la biomasse utilisée, déterminée par la méthode (Van Soest and Wine, 1968).

M.2.2. Analyse des fractions solides

M.2.2.1. Teneur en humidité

La teneur en humidité des échantillons est mesurée selon la norme française NF V 03-903. Elle correspond à la perte en masse de l'échantillon jusqu'à sa stabilisation après chauffage à $103 \pm 2^\circ C$ dans une étuve. La teneur humidité (t_H) est calculée selon l'équation :

$$t_H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0}$$

m_0 : la tare du creuset (g)

m_1 : la masse totale de l'échantillon et creuset avant étuve (g)

m_2 : la masse totale de l'échantillon et creuset après étuve (g)

La teneur en matière sèche (MS) de chaque matière est ensuite calculée à partir de la teneur en humidité (t_H)

$$t_S = 1 - t_H$$

M.2.2.2. Teneur en matières minérales et organiques

Le taux de matière minérale des échantillons est mesuré en accord avec la norme française NF V 03-322. Les échantillons sont calcinés dans un four à $550^\circ C$ pendant 5h. Les résidus calcinés doivent se présenter comme une poudre de couleur gris clair. La teneur en matières minérales (t_M) est exprimée en pourcentage de la matière sèche :

$$t_M = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : la tare du creuset (g)

m_1 : la masse totale de l'échantillon et creuset avant calcination (g)

m_2 : la masse totale de l'échantillon et creuset après calcination (g)

Le taux de matières organiques s'exprime lui d'après la formule suivante :

$$t_O = 1 - t_M$$

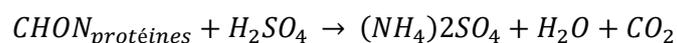
Matériel et méthodes

M.2.2.3. Répartition protéique dans les bioextrudats

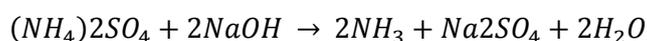
Les différents bioextrudats testés sont centrifugés à 10 000 g, pendant 10 min à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse Sigma 6-16K. La teneur en protéines du surnageant ainsi que du culot est testée par la méthode au Kjeldhal en accord avec la norme française NF V 18-100. Elle consiste en la minéralisation de l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral (ammoniaque). Cette ammoniaque est ensuite titrée par réaction acido-basique.

La minéralisation de l'échantillon (0,5 à 1,5 g de protéines estimées dans l'échantillon) est effectuée à l'aide d'acide sulfurique concentré (12,5mL à 95%) en présence de deux pastilles de catalyseur (CuSO₄). L'ensemble est chauffé à 400°C à l'aide d'un dispositif de type Tecator Digestor 2020 durant 2h. Le produit obtenu est ensuite neutralisé avec de la soude à 40%.

Minéralisation à l'acide sulfurique



Neutralisation à la soude



Après refroidissement l'ammoniaque produite est récupérée en distillation automatique avec vapeur dans un appareil de type Tecator Kjeltex 2200. Pour déterminer de l'azote total contenu dans la matière organique, l'ammoniaque est titrée avec de l'acide chloridrique à 0,1 N en présence d'indicateurs colorés (le vert de bromocresol et le rouge de méthyl en solution d'acide borique à 4%).

La teneur en protéines de l'échantillon (t_p) est obtenue en multipliant l'azote total par un coefficient de conversion empirique. Ce coefficient prend en compte la masse molaire moyenne des acides aminés composant les protéines (6,25).

$$t_p = 6,25 \times \frac{M_N \times c \times (V_1 - V_0)}{m_{ech} \times t_{sech}}$$

Avec M_N : 14.007 g.mol⁻¹

c : la concentration de la solution d'acide chloridrique en mol.L⁻¹

V_0 : le volume de solution d'acide chloridrique utilisé pour le blanc en mL

V_1 : le volume de solution d'acide chloridrique utilisé en mL

m_{ech} : la masse de l'échantillon en mg

t_{sech} : la teneur en matière sèche de l'échantillon

Le calcul de la proportion en protéines présentes dans le surnageant par rapport à l'ensemble du bioextrudat (r_p) se fait suivant la formule suivante :

$$r_p = \frac{m_{pS}}{m_{pS} + m_{pC}} = \frac{t_{pS} \times p_S}{t_{pS} + (1 - p_S)(t_{pC} - t_{pS})}$$

Avec m_{pS} : la masse de protéines dans le surnageant en g

m_{pC} : la masse de protéines dans le culot en g

t_{pS} : la teneur en protéines du surnageant

t_{pC} : la teneur en protéines du culot

p_S : la proportion de surnageant dans le bioextrudat en masse

Matériel et méthodes

M.2.2.4. Composition en cellulose, hémicelluloses et lignines

La méthode utilisée est celle décrite par (Van Soest and Wine, 1968), adaptée à l'aide d'un système d'appareillage Fibertec system M - Hot extractor. Toutes les analyses sont au moins réalisées en dupliquas.

- ADF ou NDF (1^{er} traitement) :

Les matières sont préalablement séchées à 50°C pendant 24 h (teneur en matière sèche $t_s \geq 0,85$) puis broyées à 2 mm à l'aide d'un broyeur de laboratoire Pulverisette (Fritsch). Entre 0,8 et 1g de matière sont pesées dans un fritté puis 100 mL de réactifs (ADF ou NDF) sont ajoutés et portés à ébullition. Le système de refroidissement est alors mis en marche et l'ensemble est maintenu à ébullition pendant 1 h. Après cette étape, le milieu réactionnel est filtré à travers les frittés et le rétentat lavé à l'eau distillée jusqu'à disparition de la mousse. Le tout est ensuite séché suivant la norme NF V 03-903, pesé, puis minéralisé suivant la norme NF V 03-322 et pesé à nouveau.

- ADL (2^{ème} traitement: attaque des lignines) :

Les frittés comportant le rétentat séché issus des traitements ADF sont mélangés à 25 mL de solution ADL. L'ensemble est laissé à température ambiante pendant 1h30 et mélangé de temps en temps. Après ce temps, les milieux sont filtrés et les rétentats sont lavés à la solution déminéralisante jusqu'à blanchissement, puis lavés à l'éthanol à 80%. Le tout est ensuite séché suivant la norme NF V 03-903, pesé, puis minéralisé suivant la norme NF V 03-322 et pesé à nouveau.

Composition des différentes solutions utilisées :

Pour 1L de solution ADF :

- 1 L d'eau distillée
- 20 g Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB).
- 26.8 ml H₂SO₄ concentrée

Pour 1 L de solution NDF :

- 1 L d'eau distillée
- 30g Sodium Lauryl Sulfate
- 18.61g Sodium tetra acetate ethylene diamine
- 4.56 g Disodium phosphate
- 6.81g Sodium borate, 10H₂O
- 10ml Ethylene glycol monoethyl ether

Pour 1,5L de solution ADL :

- 50 g de KMnO₄ dans 1L d'eau distillée
- 3 g de Fe(NO₃)₃·9H₂O et 0,075g de AgNO₃ dans 50ml d'eau distillée
- 5 g d'acétate de potassium dans 250 mL d'acide acétique pur
- 200ml de ter-butanol.

Pour 1L de solution déminéralisante:

- 50g d'acide oxalique déshydraté dans 700ml d'éthanol 95%
- 50ml de HCl (35% ou 12N)
- 250ml d'eau distillée

Les taux de cellulose (t_C), hémicelluloses (t_{HC}) et lignines (t_L) dans la biomasse sont calculés par les formules suivantes :

$$t_C = \frac{m_{ADL1} - m_{ADL2}}{m_{ADL0}}$$

$$t_{Hc} = \frac{m_{ADF1} - m_{ADF2}}{m_{ADF0}} - \frac{m_{NDF1} - m_{NDF2}}{m_{NDF0}}$$

$$t_L = t_C - \frac{m_{ADF1} - m_{ADF2}}{m_{ADF0}}$$

Avec m_{ADL0} : la masse sèche pesée avant traitement ADL

m_{ADL1} : la masse sèche pesée après traitement ADL

m_{ADL2} : la masse minérale pesée après traitement ADL

m_{ADF1} : la masse sèche pesée après traitement ADF

m_{ADF0} : la masse sèche pesée avant traitement ADF

m_{ADF2} : la masse minérale pesée après traitement ADF

m_{NDF0} : la masse sèche pesée avant traitement NDF

m_{NDF1} : la masse sèche pesée après traitement NDF

m_{NDF2} : la masse minérale pesée après traitement NDF

M.2.2.5. Composition des biomasses en sucres simples

La méthode présentée ici est une adaptation du protocole élaboré par Sluiter et al., 2010.

300,0 ± 10,0 mg de biomasse sont pesés dans un tube à hydrolyse résistant à la pression et préalablement taré. 3,00 ± 0,01 mL (ou 4,92 ± 0,01 g) d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés. Une barre en téflon est utilisée afin d'homogénéiser le mélange. Le tube est placé dans un bain marie à 30 ± 3 °C et laissé à incuber pendant 60 ± 5 min. Utiliser la barre en téflon pour homogénéiser le milieu réactionnel toutes les 5 à 10 min. Les tubes sont retirés du bain marie et le mélange est dilué à une concentration en acide de 4% en ajoutant 84,00 ± 0,04 mL d'eau distillée (pour un volume total de 86,73 mL). Le bouchon en téflon est vissé et l'ensemble est agité pour homogénéiser. Les échantillons sont placés dans un autoclave pendant 1h à 121°C. Après refroidissement, l'échantillon est neutralisé jusqu'à pH 6-7 avec du CaCO₃ sous agitation vigoureuse afin d'évacuer rapidement le CO₂ formé. La mesure des concentrations en sucres du surnageant est faite par HPLC et la teneur en sucres simples de la biomasse est calculée de la façon suivante :

$$t_S = \frac{[Sucre] \times V_{ech}}{m_{ech} \times t_{sech}} \times 100$$

Avec [Sucre] : la concentration massique en sucre (glucose, xylose, arabinose) déterminée par HPLC en mg/mL

V_{ech} : le volume de l'échantillon en mL

m_{ech} : la masse de l'échantillon en mg

t_{sech} : la teneur en matière sèche de l'échantillon

M.2.2.6. Taille de particules

La mesure de taille de particules a été effectuée de deux façons distinctes. Soit par filtration en milieu liquide, soit par tamisage du solide.

Matériel et méthodes

M.2.2.6.1. Filtration en milieu liquide

Environ 2 g de chaque échantillon sont filtrés sur des filtres en nylon de porosité 45 µm. Le rétentat est ensuite récupéré et séché suivant la norme NF V 03-903. La proportion en masse sèche de l'échantillon inférieure à 45 µm est ensuite calculée par la formule suivante.

$$p_{\leq 0,45} = \frac{m_T - m_P}{m_T} \times 100$$

Avec $p_{\leq 0,45}$: la proportion de l'échantillon inférieure à 45 µm en %

m_P : la masse sèche du perméat en g

m_T : la masse totale de l'échantillon en g

M.2.2.6.2. Tamisage du solide

Le tamisage est effectué sur des résidus solides séchés pendant 48 h à 50 h. Les résidus secs sont ensuite passés dans un tamis mécanique Retsch AS 200 basic équipé de trois tamis métalliques de porosités respectives 0,8, 0,5 et 0,125 mm. Les échantillons sont tamisés pendant 10 min à une amplitude de 55 mm. Les quatre fractions obtenues sont récupérées et pesées afin de calculer leur proportion par rapport à la masse totale de l'échantillon.

$$p_i = \frac{m_i}{m_T} \times 100$$

Avec p_i : la proportion de la fraction i dans l'échantillon en %

m_i : la masse de la fraction i en g

m_T : la masse totale de l'échantillon en g

M.2.2.7. Analyses au microscope confocal.

25 mg ($\pm 0,6$ mg) de chaque échantillon sont déposés dans une cellule rectangulaire en plastique de 23,8x36,9 mm. Un volume de 1mL d'eau distillée est ensuite ajouté et l'ensemble mélangé afin d'homogénéiser la répartition de la biomasse dans le contenant. Les échantillons sont ensuite séchés dans une étuve à 50°C pendant 48 h. Les observations microscopiques des matières sont faites avec un microscope AxioZoom V16 (AxioCam HRc, ZEISS). Les observations sont faites sur fond noir, car l'excitation lumineuse est faite par le dessus de l'échantillon. Un grossissement x10 est fixé au niveau de l'oculaire. Deux filtres sont utilisés pour les analyses spectroscopiques au microscope.

- Un filtre 1 passe-bande (excitation = 365 nm, émission = 445/50 nm)
- Un filtre 2 passe longue (excitation = 365 nm, émission = à partir de 397 nm)

Deux types d'observations (1 et 2) sont réalisés

	Observations 1	Observations 2
Grossissement objectif	x14,6	X35
Durée d'exposition (ms)	Filtre 1 1400	450
	Filtre 2 500	350

Les observations 1 à plus faible grossissement sont utilisées pour les calculs d'autofluorescence sur l'ensemble des prélèvements. Les observations 2 sont utilisées de manière qualitative, afin de comparer l'aspect visuel en fonction des différents traitements.

Les traitements des observations 1 sont réalisés à partir du logiciel Image-Pro® plus de Media cybernetics. L'utilisation des images obtenues avec les filtres 1 et 3 permet la mesure des aires d'objets correspondants aux zones d'émission de fluorescence les 25% plus intenses en mm². La somme des aires d'un échantillon permet d'obtenir la surface totale correspondant à une haute intensité.

Matériel et méthodes

M.2.2.8. Broyage des résidus solides

Le broyage des résidus solides est effectué à partir un broyeur à bille planétaire FRITSH pulverisette 6. Le volume du bol est de 80 mL et les échantillons sont broyés à l'aide de 25 billes en acier inoxydable de diamètre 10 mm. La vitesse de rotation est fixée à 500 rpm pendant 5 min. Les poudres obtenues sont tamisées pendant 5 min à une amplitude de 55 mm et une porosité de 125 µm.

M.2.2.9. Analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les poudres issues du broyage et du tamisage des résidus solides des expériences d'hydrolyse sont utilisées pour les mesures par IRTF. Toutes les mesures d'absorbance par spectroscopie IRTF ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer Spectrum 65. Entre 2 et 3 mg d'échantillon sont placés sur la tête du cristal ATR d'un diamètre de 2 mm et pressés à l'aide d'une tour à pression pour appliquer à chaque fois la même pression. Les analyses sont faites sur une gamme de 4000 à 600 cm⁻¹ avec une résolution de 4 cm⁻¹. Chaque spectre est obtenu à partir d'une accumulation de 16 balayages répétés sur le même échantillon. Les spectres affichés sont les résultats des moyennes réalisées à partir des répliques (entre 2 et 4).

M.2.2.10. Analyses thermogravimétriques (ATG)

Les poudres issues du broyage et du tamisage des résidus solides des expériences d'hydrolyse sont utilisées pour les mesures par IRTF. Les analyses thermogravimétriques sont réalisées à l'aide d'un appareil Shimadzu TGA-50 series®. Des échantillons entre 8 et 10 mg sont pesés en creusets céramiques (alumine) pour éviter les problèmes liés aux limites des transferts massiques et thermiques. Le gradient de température utilisé est de 5°C.min⁻¹ sous flux d'air jusqu'à la température de 700°C maintenue pendant 30 min. Les pertes massiques sont mesurées en continu tout au long de l'expérience. Les résultats affichés sont les moyennes obtenues à partir des répliques (entre 2 et 4) de chaque échantillon.

M.2.3. Analyses enzymatiques

M.2.3.1. Mesures d'activité enzymatique

Les méthodes présentées sont adaptées de Ghose, 1987; Ghose and Bisaria, 1987.

Les conditions de pH et de température des mesures d'activité doivent être adaptées aux conditions d'utilisation des enzymes. La solution tampon utilisée est une solution citrate 0,5 mM, 1% de NaN₃, pH d'utilisation des enzymes. Pour toute mesure d'activité enzymatique, un blanc substrat et un blanc enzyme sont réalisés. Dans ces échantillons, un volume de solution tampon remplace respectivement le volume de solution enzymatique et le volume de solution de substrat. Ceux-ci subissent les mêmes conditions expérimentales que le reste des échantillons. Tous les échantillons sont réalisés en triplicata.

0,5 mL (1 mL pour les FPU) de solution de substrat sont introduits dans un micro-tube de 1,5 mL. La solution est chauffée à température d'utilisation des enzymes avant d'introduire 0,5 mL de solution enzymatique diluée. Le tout est incubé pendant 30 min (1 h pour les FPU) à température d'utilisation des enzymes sous agitation. Les échantillons sont ensuite désactivés pendant 5 min dans l'eau bouillante et centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4°C. La quantité de sucres réducteurs dans le surnageant est mesurée en équivalents glucose ou xylose par la méthode des sucres réducteurs (DNS).

▪ Endoglucanases

- Définition : Une unité CMC (CMCU) = 1 µmol.min⁻¹ (en équivalent glucose par la méthode des sucres réducteurs) dans les conditions de pH et température définies.
- Solution substrat : Solution à 2% de carboxyméthylcellulose (degré de substitution 0,7) dans le tampon.

Matériel et méthodes

- Cellobiases
 - Définition : Une unité cellobiase (CBU) = 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (en équivalent glucose par la méthode des sucres réducteurs) dans les conditions de pH et température définies.
 - Solution substrat : Solution à 15 mM de cellobiose dans le tampon.
- FPU
 - Définition : Une unité filtre papier (FPU) = 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (en équivalent glucose par la méthode des sucres réducteurs) dans les conditions de pH et température définies.
 - Substrat : Une bande de papier filtre (Whatman No1) de dimension 1x6 cm.
- Exo-glucanases
 - Définition : Une unité Avicel (AVC) = 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (en équivalent glucose par la méthode des sucres réducteurs) dans les conditions de pH et température définies.
 - Solution substrat : Solution à 2% Avicel (suspension) dans le tampon.
- Exo-xylanases
 - Définition : Une unité exo-xylanase (EXU) = 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ (en équivalent xylose par la méthode des sucres réducteurs) dans les conditions de pH et température définies.
 - Solution substrat : Solution à 1% de xylanes issus du bouleau dans le tampon.

Le calcul des activités enzymatiques se fait à partir d'au moins deux dilutions différentes de la solution enzymatique permettant la libération d'une quantité de sucres réducteur équivalent glucose ou xylose un peu plus élevée et un peu plus faibles (mg/réaction) que celle définie par le point critique.

Type d'enzyme	Quantité (<i>mg</i>) critique en sucres par réaction (S_c)	Unité
Cellulases	2,0	FPU
Endo-glucanases	0,5	CMCU
Cellobiases	0,5	CBU
Exo-glucanases	0,5	AVCU
Exo-xylanases	0,2	EXU

L'activité enzymatique (A_e), en *unité/mL* est alors calculée à partir de la formule suivante.

$$A_e = \frac{S_c \times d_c \times 1000}{M_S \times t \times V_e}$$

Avec S_c : la quantité critique en sucres réducteurs équivalents glucose ou xylose en *mg*

d_c : la dilution critique permettant la production de S_c

M_S : la masse molaire moléculaire du sucre standard (180 pour le glucose et 150 pour le xylose) (*g/mol*)

t : le temps de réaction en *min*

Le calcul de d_c se fait à partir d'au moins deux dilutions de la solution enzymatique différentes correspondant à la libération d'une quantité de sucres réducteurs en équivalents glucose ou xylose un peu plus élevée (S_1, d_1) et un peu plus faible (S_2, d_2) que la quantité critique (S_c).

$$d_c = \frac{(d_1 - d_2)}{(S_1 - S_2)} \times S_c + \frac{(d_2 \times S_1 - d_1 \times S_2)}{(S_1 - S_2)}$$

Matériel et méthodes

M.2.3.2. Mesures d'hydrolysabilité

Les réactions d'hydrolysabilité sont réalisées dans des micro-tubes de 2 mL avec une charge en solide sec de 5% et une charge enzymatique de 15 FPU/g de matière sèche en cocktail ctec2 comportant 10% de cocktail hémicellulolytique NS2022, le tout dans une solution tampon citrate à 50 mM, 1% de NaN₃, pH 5,0. Les micro-tubes sont placés en incubateur à une température de 50°C et une agitation de 120 (x1000) rpm. Chaque point cinétique est réalisé en triplicata dans des micro-tubes séparés, inactivé pendant 5 min dans l'eau bouillante puis plongé dans un bain de glace pendant 5 min. Les micro-tubes sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants sont récupérés, filtrés à 0,22 µm à l'aide de filtres en acétate de cellulose et les concentrations en sucres sont mesurées par HPLC.

M.3. Méthodes de calcul

M.3.1. Vitesses de conversion des sucres

Les valeurs V correspondent aux dérivées du taux de conversion par rapport au temps au cours de la cinétique enzymatique.

$$V = \frac{dC}{dt}$$

Avec V = Vitesse de conversion en %/h

C = taux de conversion des sucres en %

t = temps en h

V_{Ei} est la vitesse de conversion en bioextrusion calculée entre 0 et 0,25 h. V_{Ri} est la vitesse initiale de conversion une fois l'extruda introduit en réacteur fermé, elle est calculée entre 0,25 et 4 h. V_f est la vitesse finale de conversion calculée entre 24 et 48 h. La Figure 2-7 est la représentation schématique de ces valeurs sur la cinétique de conversion.

M.3.2. Energie mécanique spécifique (EMS)

L'Energie Mécanique Spécifique (W.h.kg-1) (EMS) se calcule d'après la formule suivante :

$$EMS = \frac{\text{Couple} \times \text{Vitesse}}{\text{Débit}} = \frac{P}{Q_s} = \frac{U \times I \times \cos \varphi \times \frac{N}{N_{max}}}{Q_s}$$

Avec I : intensité mesurée (A)

U : tension de la bi-vis (BC45 : 460 V et EV25 : 400 V)

N : vitesse de vis (rpm)

N_{max} : vitesse de vis maximale (BC45 : 600 rpm et EV25 : 1200 rpm)

Q_s : débit d'entrée du solide (kg.h⁻¹)

$\cos \varphi$: le rendement théorique du moteur de l'extrudeuse (BC45 : 0,95 et EV25 : 0,9)

M.3.3. Plans pour surfaces de réponse (Doehlert)

Tous les calculs des modèles de plans d'expériences ainsi que de leur validité ont été réalisés sous le logiciel Excel 2013 à partir de Goupy, 2000. Tous les graphiques de surfaces de réponse ont été obtenus à partir d'un programme et du module graphique de Scilab 6.0.1.

M.4. Références

- Canas, S., Belchior, A.P., Spranger, M.I., Bruno-de-Sousa, R., 2011. HPLC method for the quantification of phenolic acids, phenolic aldehydes, coumarins and furanic derivatives in different kinds of toasted wood used for the ageing of brandies. *Anal. Methods* 3, 186–191. <https://doi.org/10.1039/C0AY00269K>
- Ghose, T., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59, 257–268.
- Ghose, T.K., Bisaria, V.S., 1987. Measurement of hemicellulase activities: Part I Xylanases. *Pure Appl. Chem.* 59, 1739–1751. <https://doi.org/10.1351/pac198759121739>
- Goupy, J., 2000. Modélisation par les plans d'expériences. *Tech. Ing. Mes. Contrô* R275–1.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., others, 2010. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: laboratory analytical procedure (LAP). Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory; 2008 April. NREL Report No. Contract No -AC36-99-G010337 Spons. US Dep. Energy.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51, 780–785.

Conclusion générale

Valorisation de la biomasse lignocellulosique.

Une des clefs des bioraffineries de 2nd génération est la valorisation la plus complète possible des biomasses utilisées. La biomasse lignocellulosique présente une structure complexe et hétérogène. Les trois principales fractions, cellulose, hémicelluloses et lignines sont interconnectées dans une structure hautement récalcitrante qui nécessite communément une étape préalable de prétraitement physico-chimique pour améliorer l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique subséquente. Une large diversité d'enzymes de spécificités différentes est nécessaire pour la déconstruction de ces polymères. Par ailleurs, l'effet synergique de l'ensemble enzymatique permet la formation de capacités nouvelles, inexistantes chez les enzymes prises isolément.

Un procédé original, intermédiaire entre prétraitement physico-chimique et hydrolyse enzymatique.

L'extrusion biocatalytique, ou bioextrusion, est une technique récente visant à utiliser des enzymes comme catalyseurs durant le procédé d'extrusion réactive. Les seuls exemples de bioextrusion concernent des biomasses (amidonnées et lignocellulosiques). Les études plus poussées réalisées sur le cas des biomasses amidonnées soulignent l'intérêt de la bioextrusion pour l'amélioration de l'hydrolyse enzymatique en milieux concentrés en substrat. Les facteurs de concentration en substrat et en enzymes apparaissent cruciaux dans l'étude de la bioextrusion. Les quelques résultats obtenus pour la lignocellulose montrent des données prometteuses. L'utilisation de l'extrusion permet un procédé continu, facilement modulable et adaptable à de nombreuses biomasses, conditions de hautes consistances et facilement transférable à l'échelle industrielle.

Une méthode de déconstruction efficace sur le court et long terme.

Déconstruction de biomasse lignocellulosique en extrusion (court terme)

Les différents résultats obtenus à partir de la bioextrusion des biomasses lignocellulosiques valident l'activité enzymatique en extrudeuse. Malgré la contrainte thermomécanique du procédé bi-vis et le temps de séjour limité (environ 5 min), plusieurs mesures confirment une hydrolyse significative lors de cette étape. Après 0,25 h (temps de séjour et de prélèvement cumulés) des taux de déconstruction de l'holocellulose maximaux moyens nets de 4,1 %, 7,4% et 13,1 % sont respectivement mesurés pour les écorces de bouleau, les résidus de maïs bruts et les résidus de maïs prétraités. Dans le cas de la paille de blé prétraitée, une conversion du glucose de 26,6% et une conversion du xylose de 4,3% sont obtenues. En outre, les plans d'expérience réalisés sur la paille de blé indiquent une influence positive du ratio S/L au cours de cette étape pour la conversion du glucose. L'hydrolyse de la fraction cellulosique est favorisée pour des milieux concentrés en substrat et en enzymes lors de l'extrusion.

Conclusion générale

Des modifications significatives des caractéristiques physiques sont aussi observées sur la fraction solide. La bioextrusion montre une association des effets biochimiques et mécaniques à l'origine d'un effet synergique permettant une déconstruction plus prononcée que lorsqu'ils sont utilisés séparément. Cela se traduit par une réduction significative des tailles de particules, une dégradation visuelle des structures de la biomasse et la formation de nouvelles fractions plus sensibles à la décomposition thermique.

Déconstruction de biomasse lignocellulosique en réacteur fermé (long terme)

L'influence de la bioextrusion se retrouve sur le long terme avec des améliorations significatives des taux finaux de conversions du glucose. Après 48 h d'hydrolyse des valeurs maximales moyennes de 7,4%, 28,7%, 63,8% et 57,8% sont respectivement mesurées pour les écorces de bouleau, les résidus de maïs bruts, les résidus de maïs prétraités et la paille de blé prétraitée. Les gains de production de sucres permis par la bioextrusion sont maximaux à 48 h pour les écorces de bouleau et les résidus de maïs. Dans le cas de la paille de blé, ils sont relativement constants tout au long de la cinétique (de 4 à 48 h). L'étude de l'influence des facteurs montre que cette amélioration de rendement d'hydrolyse, associée à la bioextrusion, est optimale pour les milieux concentrés en substrat et en enzymes. Elle est à associer à des gains cinétiques entre 0 et 4 h par rapport aux essais menés directement en réacteur fermé. La comparaison des plans d'expérience réalisés post-bioextrusion en réacteur fermé sur de la paille de blé montrent que les optima des taux et des vitesses de conversion du glucose et du xylose en réacteur fermé sont situées dans des zones plus diluées que lors de l'extrusion. Les modifications relatives à la déstructuration de la fraction solide, déjà observées après la bioextrusion, sont plus prononcées après un prolongement de l'hydrolyse jusqu'à 48 h en réacteur fermé.

Hypothèses relatives aux résultats de déconstruction de la biomasse.

La bioextrusion permet des gains en termes de taux de conversion du glucose aux niveaux des hautes charges enzymatiques. Cela peut être associé aux bons mélanges distributifs et dispersifs caractéristiques des modules de type bilobes. L'ensemble enzymatique est réparti de façon plus homogène dans le milieu réactionnel (mélange distributif), permettant de cibler plus de substrat disponible. Les enzymes de même type ont moins de chance de se gêner par leur proximité (mélange dispersif). Ces propriétés limiteraient les effets négatifs observés pour des fortes concentrations enzymatiques. De plus, les bons résultats de conversion et de concentration en sucres pour des concentrations en substrat élevées sont probablement aussi associés à la qualité du mélange qui limite les contraintes associées à la concentration. Le procédé d'extrusion permet en effet une agitation efficace, probablement un meilleur contact entre enzymes et substrat, ainsi qu'un bon transfert de masse.

Les bons résultats de déstructuration après bioextrusion sont associables à une action synergique des contraintes mécaniques et biochimiques. Les dégradations physiques observées sont probablement à associer avec les bons résultats de conversion de la fraction cellulosique.

Evolution de la fraction ligneuse lors de la déconstruction de la lignocellulose

Plusieurs résultats obtenus montrent l'évolution de la fraction ligneuse dans le processus de déconstruction. D'une part, l'observation de l'autofluorescence par microscopie montre une réduction de taille des particules et la production progressive de particules très fines associées à la fraction ligneuse. L'exposition plus importante de ces polymères s'observe aussi par augmentation du signal infrarouge lié aux cycles aromatiques. Ces expressions physiques de la dégradation de la lignine rejoignent les observations, dans la fraction liquide, de complexes lignine-carbohydrates. Ceux-ci montrent clairement une limitation de la dégradation enzymatique de l'holocellulose, avec notamment la production de petits hétérooligomères non hydrolysables par voie biochimique. La teneur en hétéropolymères, ainsi qu'en acides et aldéhydes phénoliques est principalement liée à la dilution du milieu et donc probablement à un phénomène d'extraction. Si la déstructuration des lignines est probablement majoritairement due au prétraitement alcalin, le procédé de bioextrusion provoque une diminution de la teneur en hétéropolymères de plus grande taille.

Limites et perspectives du procédé de bioextrusion

Le procédé de bioextrusion est facilement transférable à l'échelle industrielle, et montre une grande adaptabilité à différents substrats. Cependant, la nature du substrat montre une nette influence sur la performance de cette étape et la teneur en lignine est un frein majeur à la valorisation de l'holocellulose. La dégradation et le fractionnement de la lignine est par ailleurs associée à une inhibition des étapes de production de bioéthanol et de méthanisation. Il serait intéressant d'isoler les fractions mises à jour par chromatographie d'exclusion stérique (CES), afin d'identifier la nature et le type de liaisons existant au sein de ces complexes lignine-carbohydrate. Cela pourrait notamment préciser les liaisons lignines-carbohydrates avec l'hémicellulose ou la cellulose, afin de comprendre le niveau d'interaction et estimer la part hétérogène non hydrolysable par voie enzymatique.

Durant ce projet, l'introduction de laccases au cours **du procédé de bioextrusion de paille de blé prétraitée** a permis de montrer une amélioration de la conversion du xylose (+10%) et du glucose (+20%) après 48 h d'hydrolyse pour une charge en laccase (Metgen® L111) de 0,55 U/g de substrat sec, de Cellic Ctec2 de 25 % et un ratio S/L de 25%. Ces résultats n'ont cependant pas été répliqués et seuls les résultats de conversion ont été mesurés. Il serait intéressant de réaliser d'autres expériences notamment sans bioextrusion en parallèle pour distinguer l'influence de cette étape. L'impact majeur de la lignine sur la conversion de l'holocellulose est probablement modulable par l'action de ces oxydases. Le suivi au cours du temps des mesures par CES des fractions hétéropolymériques et par autofluorescence de l'aspect macroscopique des structures ligneuses permettrait d'identifier certains mécanismes de l'action des oxydases.

La baisse significative de la production de xylose et d'arabinose à partir de la paille de blé sur le long terme, souligne une influence négative du procédé de bioextrusion. Il peut s'agir d'adsorption non-spécifique ou encore de désactivation provoquée par l'intensité des contraintes thermomécaniques. Cependant, sans analyse poussée de la fraction poly-

Conclusion générale

oligomérique ainsi que de l'activité des hémicellulases, il est impossible de conclure quant à l'effet sur la déconstruction des hémicelluloses en général. Il serait intéressant d'estimer cette perte de disponibilité et/ou d'activité enzymatique lors de l'extrusion et au cours de l'hydrolyse en réacteur fermé. Des premiers résultats de filtration de cocktails enzymatiques montrent la possibilité d'isoler la fraction protéique et conserver en moyenne 70% de son activité FPU. L'utilisation de la technique FTSM de marquage fluorescent spécifique en bioextrusion permettrait aussi d'estimer le taux d'adsorption associé à cette étape. D'un point de vue procédé, il semble plus intéressant d'insérer les hémicellulases après l'étape de bioextrusion.

Productions scientifiques

- **Biomass pretreatment with reactive extrusion using enzymes: A review (Accepté)**

Etienne Gatt, Luc Rigal, Virginie Vandenbossche

Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France

Received 11 January 2018, Revised 24 May 2018, Accepted 27 May 2018, Available online 8 June 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.069>

- **Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: new insights into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules (Soumis le 31/12/2018)**

Etienne Gatt^{a,*}, Vinay Khatri^{b,d*}, Julien Bley^{c,e}, Simon Barnabé^c, Virginie Vandenbossche^a, Marc Beauregard^{c,d}

^a Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France.

^b Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2P5, Canada

^c Centre de recherche sur les matériaux lignocellulosiques, Université du Québec à Trois-Rivières.

^d PROTEO, Université Laval, Québec G1V 4G2, Canada

^e Innofibre, 3351 Boulevard des Forges, Québec G9A 5E6, Canada

- **Lignocellulosic residues pretreatment with reactive extrusion using enzymes: influence of process conditions on subsequent enzymatic hydrolysis (Présenté au 3rd International EPNOE Junior Scientists Meeting, 14-15/05/2018 Maribor, Slovénie)**

Etienne Gatt¹ and Virginie Vandenbossche¹

¹ *Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France.*

A. Annexes

Annexes

A.1. Données de l'étape de bioextrusion.

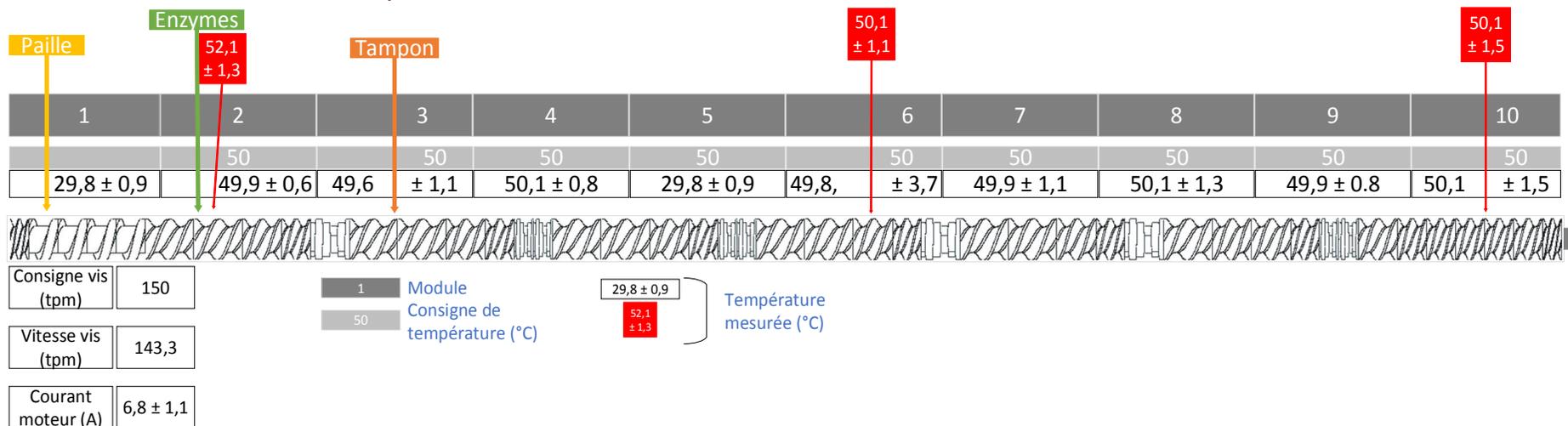


Figure A-1 : Consignes et conditions expérimentales en bioextrusion.

Annexes

A.2. Données plans d'expérience avec bioextrusion (paille de blé prétraitée)

Tableau A-1 : Données des plans d'expériences pour les taux de conversion des sucres au cours de la cinétique et le fractionnement à 48 h.

n°	Glucose conversion (0,25 h)	Glucose conversion (4 h)	Glucose conversion (10 h)	Glucose conversion (24 h)	Glucose conversion (48 h)	Xylose conversion (0,25 h)	Xylose conversion (4 h)	Xylose conversion (10 h)	Xylose conversion (24 h)	Xylose conversion (48 h)	Arabinose conversion (0,25 h)	Arabinose conversion (4 h)	Arabinose conversion (10 h)	Arabinose conversion (24 h)	Arabinose conversion (48 h)	Fractionnement (48 h)
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	Y_10	Y_11	Y_12	Y_13	Y_14	Y_15	Y_16
1	20,3	40,3	47,2	53,0	55,2	4,2	20,8	30,1	37,3	41,4	1,3	6,7	8,4	9,5	10,1	60,0
2	2,3	37,3	44,7	50,1	58,1	2,1	33,3	40,0	51,4	59,7	0,3	5,3	6,2	8,3	8,4	88,2
3	23,5	46,4	52,9	59,1	62,7	3,3	22,1	31,9	40,6	46,5	1,8	7,6	9,7	11,2	11,9	64,6
4	28,6	47,1	54,5	61,7	56,5	5,6	16,3	25,1	34,6	38,1	1,2	7,2	9,5	10,4	10,9	38,3
5	24,2	45,1	52,5	57,7	63,3	4,1	22,5	33,8	41,0	44,1	1,4	7,7	9,8	10,9	11,6	58,8
6	7,0	12,5	20,8	35,3	42,1	2,6	3,9	7,7	12,0	18,0	0,0	0,9	2,1	2,7	4,9	49,6
7	-0,5	8,1	20,3	34,6	36,0	0,4	3,6	6,4	11,7	16,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	54,2
8	27,7	42,3	47,6	55,0	56,8	5,0	23,1	28,9	36,1	38,4	1,7	8,0	8,7	9,2	10,4	56,1
9	18,8	36,1	44,0	48,3	53,0	5,6	26,2	33,9	38,9	43,2	1,2	7,3	8,5	9,4	9,5	77,0
10	26,4	42,8	48,6	55,7	57,5	4,4	21,4	29,6	37,6	40,7	2,0	7,5	8,7	9,7	10,2	61,1
11	25,1	36,7	44,6	46,5	52,4	0,8	14,5	20,9	29,1	38,0	0,8	5,2	7,9	8,7	10,4	54,3
12	19,4	26,2	32,9	44,0	51,1	1,7	6,4	11,6	20,2	27,2	0,0	2,0	4,1	7,9	8,5	40,8
13	10,3	11,3	15,1	20,9	38,1	1,2	3,1	5,2	8,6	19,5	0,0	0,6	0,9	2,6	7,3	36,0
14	20,3	25,4	38,7	44,0	48,9	0,9	5,7	11,3	20,8	28,6	0,0	2,3	4,7	8,4	9,1	44,7

	Glucose conversion (0,25 h)	Glucose conversion (4 h)	Glucose conversion (10 h)	Glucose conversion (24 h)	Glucose conversion (48 h)	Xylose conversion (0,25 h)	Xylose conversion (4 h)	Xylose conversion (10 h)	Xylose conversion (24 h)	Xylose conversion (48 h)	Arabinose conversion (0,25 h)	Arabinose conversion (4 h)	Arabinose conversion (10 h)	Arabinose conversion (24 h)	Arabinose conversion (48 h)	Fractionnement (48 h)
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
b0	27,88	45,31	52,13	59,36	59,52	4,65	17,64	27,27	35,50	38,89	1,50	7,31	9,48	10,75	11,51	48,18
b1	11,31	0,05	-0,72	-1,30	-1,20	-0,24	-10,57	-10,86	-11,16	-10,56	0,01	-0,65	0,18	0,90	1,98	-24,57
b2	10,09	16,41	15,52	11,53	9,30	1,35	10,95	13,15	14,83	13,71	0,78	3,70	4,21	4,24	3,47	10,53
b11	-19,41	-16,36	-13,11	-13,81	-6,75	-3,72	1,33	-2,24	-0,32	4,54	-1,54	-4,20	-4,68	-2,96	-3,86	20,84
b22	-11,87	-23,11	-23,61	-22,38	-15,64	-1,58	-7,18	-12,60	-16,88	-14,53	-0,63	-3,58	-5,12	-6,31	-4,70	2,73
b12	-0,14	2,08	6,21	8,68	0,93	-2,26	-5,01	-4,05	-1,48	-2,31	-0,13	-0,80	0,32	-0,43	-2,05	-3,37
R ²	0,980	0,966	0,978	0,982	0,913	0,889	0,938	0,946	0,947	0,872	0,917	0,980	0,964	0,966	0,867	0,905
DOFA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DOFE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DOFR	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
σ_{adi}^2	643	899	846	526	279	113	406	329	310	381	532	42	61	65	53	1024
σ_{gaxpl}^2	1065	1519	1472	909	524	195	585	437	401	527	890	71	106	114	99	1960
σ_{res}^2	399	569	552	341	196	73	219	164	150	198	334	27	40	43	37	735
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F _{Fisher} (5%)	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Validity	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

Annexes

Tableau A-2 : Données des plans d'expériences pour les concentrations en sucres au cours de la cinétique.

n°	Glucose concentration (0,25 h)	Glucose concentration (4 h)	Glucose concentration (10 h)	Glucose concentration (24 h)	Glucose concentration (48 h)	Xylose concentration (0,25 h)	Xylose concentration (4 h)	Xylose concentration (10 h)	Xylose concentration (24 h)	Xylose concentration (48 h)	Arabinose concentration (0,25 h)	Arabinose concentration (4 h)	Arabinose concentration (10 h)	Arabinose concentration (24 h)	Arabinose concentration (48 h)
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8	Y_9	Y_10	Y_11	Y_12	Y_13	Y_14	Y_15
1	11,86	19,14	22,26	24,92	25,93	1,18	5,55	8,12	10,12	11,24	0,22	1,04	1,30	1,46	1,56
2	4,22	6,70	8,63	10,28	11,68	0,64	4,16	5,29	6,80	8,01	0,00	0,30	0,43	0,50	0,58
3	11,14	21,00	23,77	26,41	27,95	0,77	5,68	8,22	10,50	12,03	0,26	1,10	1,41	1,62	1,72
4	19,36	31,89	36,79	41,63	38,18	2,45	6,81	10,41	14,27	15,72	0,26	1,63	2,15	2,37	2,48
5	11,62	19,84	22,87	25,01	27,32	0,99	5,54	8,35	10,15	10,94	0,19	1,07	1,37	1,52	1,61
6	2,55	5,96	11,02	19,86	23,98	-1,24	-0,74	0,68	2,26	4,49	0,00	0,18	0,44	0,57	1,02
7	-2,35	-0,12	3,33	7,32	7,72	-2,12	-1,58	-1,11	-0,20	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	12,86	21,07	24,06	28,20	29,19	2,63	8,81	10,77	13,24	14,02	0,32	1,52	1,65	1,75	1,98
9	3,66	8,54	10,84	12,09	13,44	1,28	4,90	6,26	7,15	7,91	0,12	0,72	0,84	0,92	0,94
10	11,35	19,90	23,08	26,94	27,88	2,36	7,94	10,67	13,31	14,34	0,38	1,39	1,60	1,79	1,88
11	20,27	33,28	41,66	43,62	49,91	-0,29	8,64	12,76	18,07	23,82	0,29	1,86	2,85	3,15	3,74
12	22,38	34,78	44,21	59,80	69,85	1,43	5,65	10,14	17,48	23,49	0,00	0,95	1,98	3,78	4,07
13	7,83	9,36	13,76	20,52	40,65	0,26	1,61	3,14	5,55	13,27	0,00	0,25	0,34	1,03	2,88
14	21,58	30,39	47,81	54,86	61,30	0,68	4,66	9,13	16,73	22,96	0,00	1,01	2,10	3,75	4,05

	Glucose concentration (0,25 h)	Glucose concentration (4 h)	Glucose concentration (10 h)	Glucose concentration (24 h)	Glucose concentration (48 h)	Xylose concentration (0,25 h)	Xylose concentration (4 h)	Xylose concentration (10 h)	Xylose concentration (24 h)	Xylose concentration (48 h)	Arabinose concentration (0,25 h)	Arabinose concentration (4 h)	Arabinose concentration (10 h)	Arabinose concentration (24 h)	Arabinose concentration (48 h)
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
b0	16,36	27,12	31,79	36,64	36,76	1,81	6,50	9,83	13,08	14,49	0,27	1,39	1,82	2,16	2,27
b1	11,56	16,30	21,03	25,00	29,78	0,75	2,04	3,93	6,94	10,05	0,07	0,60	1,06	1,71	2,12
b2	5,35	8,89	8,74	6,34	3,17	1,47	4,64	5,43	6,11	5,32	0,16	0,70	0,85	0,78	0,49
b11	-4,39	-8,77	-5,15	-4,14	0,57	-1,65	-2,64	-3,20	-1,86	0,54	-0,32	-0,89	-0,66	-0,03	-0,07
b22	-11,76	-18,20	-20,13	-20,90	-14,15	-1,72	-3,24	-5,26	-7,26	-5,75	-0,09	-0,65	-1,01	-1,40	-0,74
b12	4,84	10,29	13,04	12,12	4,03	-1,90	0,28	1,50	3,06	2,01	0,09	0,51	0,97	0,76	0,07
R ²	0,982	0,979	0,980	0,962	0,986	0,885	0,952	0,980	0,993	0,983	0,934	0,976	0,981	0,987	0,986
DOFA	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DOFE	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DOFR	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
σ_{adj}^2	478	1073	1628	1934	2058	197	703	1151	1427	1472	565	3	6	11	10
σ_{expl}^2	799	1775	2696	3250	3428	332	1152	1892	2365	2416	943	4	10	18	17
σ_{res}^2	299	666	1011	1219	1286	125	432	709	887	906	354	2	4	7	6
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F _{fisher} (5%)	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Validity	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

Annexes

Tableau A-3 : Données des plans d'expériences pour les vitesses initiales et finales en réacteur fermé après bioextrusion de conversion des sucres.

n°	VRI Glucose	VF Glucose	VRI Xylose	VF Xylose	VRI Arabinose	VF Arabinose	Vi glucose (0 à 4 h)	Vi Xylose (0 à 4 h)
	%/h	%/h	%/h	%/h	%/h	%/h		
1	5,3	0,1	4,4	0,2	1,5	0,0	10,1	5,2
2	9,3	0,4	8,0	0,3	1,4	0,0	11,1	8,1
3	6,1	0,15	5,0	0,15	1,5	0,0	11,6	5,5
4	4,9	0,00	2,8	0,15	1,6	0,0	11,8	4,1
5	5,6	0,15	4,9	0,13	1,7	0,0	11,3	5,6
6	1,5	0,28	0,4	0,25	0,2	0,1	3,1	1,0
7	2,3	0,06	0,9	0,20	0,0	0,0	2,0	0,9
8	3,9	0,07	4,8	0,10	1,6	0,1	10,6	5,8
9	4,6	0,19	5,5	0,18	1,6	0,0	9,0	6,6
10	4,4	0,07	4,5	0,13	1,4	0,0	10,7	5,3
11	3,1	0,2	3,7	0,4	1,2	0,1	9,4	3,6
12	1,8	0,30	1,3	0,29	0,5	0,0	4,1	1,6
13	0,3	0,72	0,5	0,45	0,2	0,2	0,7	0,8
14	1,4	0,30	1,3	0,32	0,6	0,0	3,6	1,4

	VRI Glucose	VF Glucose	VRI Xylose	VF Xylose	VRI Arabinose	VF Arabinose	Vi glucose (0 à 4 h)	Vi Xylose (0 à 4 h)
	%/h	%/h	%/h	%/h	%/h	%/h	%/h	%/h
b0	4,63	0,06	3,47	0,12	1,53	0,03	10,88	4,40
b1	-3,00	0,04	-2,65	0,03	-0,18	0,04	-1,69	-2,55
b2	1,77	-0,10	2,61	-0,05	0,78	-0,03	4,80	2,80
b11	0,80	0,26	1,18	0,21	-0,67	-0,03	-4,23	0,21
b22	-3,06	0,22	-1,52	0,13	-0,84	0,07	-5,77	-1,83
b12	0,60	-0,32	-0,73	-0,04	-0,13	-0,07	1,65	-1,26
R ²	0,90	0,74	0,90	0,74	0,96	0,71	0,94	0,94
DOFA	5	5	5	5	5	5	5	5
DOFE	3	3	3	3	3	3	3	3
DOFR	8	8	8	8	8	8	8	8
σ_{adj}^2	18	0	21	1969	2579	0	69	22
σ_{expl}^2	29	0	36	3282	4298	0	115	37
σ_{res}^2	11	0	13	1231	1612	0	43	14
F	1	1	1	1	1	1	1	1
F _{Fisher} (5%)	9	9	9	9	9	9	9	9
Validity	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

Annexes

Tableau A-4 : Données des plans d'expériences pour les aires, masses molaires moléculaires en poids des pics observés en chromatographie d'exclusion stérique, ratios des pics 1 à 3 sur le pic 4 et concentration finale (48 h) en acide coumarique.

n°	Aire pic 1 (24 h)	Aire pic 2 (24 h)	Aire pic 3 (24 h)	Aire pic 5 (24 h)	Mm pic 2	Mm pic 5	ratio grands sur petits oligomères (4 h)	ratio grands sur petits oligomères (10 h)	ratio grands sur petits oligomères (24 h)	ratio grands sur petits oligomères (48 h)
	mVxmin	mVxmin	mVxmin	mVxmin	kDa	kDa				
1	8,5	9,0	1,7	48,4	6820,5	240,5	0,7	0,6	0,6	0,9
2	38,9	31,7	11,5	72,4	5156,9	232,8	2,5	2,4	1,9	2,6
3	9,5	10,3	2,1	58,0	6522,6	240,3	0,8	0,7	0,7	0,9
4	5,7	7,5	1,4	57,7	6755,9	243,3	0,4	0,4	0,5	0,7
5	9,8	10,6	2,0	57,2	6576,5	240,7	0,8	0,6	0,8	0,8
6	6,8	7,9	1,3	34,4	6812,2	250,7	0,3	0,4	0,3	0,4
7	16,2	15,0	3,8	35,9	6462,9	251,3	1,2	1,4	1,3	1,1
8	5,8	7,3	1,0	48,9	6964,4	242,8	0,3	0,3	0,4	0,5
9	13,5	13,9	3,3	58,6	6570,8	242,5	1,0	1,1	1,1	1,1
10	6,0	7,7	1,0	56,7	7052,0	241,6	0,3	0,3	0,3	0,3
11	2,8	3,4	1,0	54,7	8352,5	248,9	0,3	0,3	0,3	0,6
12	2,8	7,3	1,0	50,1	8315,8	246,7	0,2	0,2	0,3	0,3
13	3,1	6,9	1,1	23,7	8321,0	256,0	0,2	0,2	0,4	0,6
14	2,2	6,0	0,9	42,9	8446,2	247,1	0,2	0,2	0,3	0,5

Concentration en acide coumarique (48 h)
mg.mL ⁻¹
Y_1
8,4
9,7
10,6
5,4
7,6
4,4
8,6
4,9
8,9
5,8
2,2
1,6
2,1
1,6

	Aire pic 1 (24 h)	Aire pic 2 (24 h)	Aire pic 3 (24 h)	Mm pic 2	Mm pic 5	ratio grands sur petits oligomères (4 h)	ratio grands sur petits oligomères (10 h)	ratio grands sur petits oligomères (24 h)	ratio grands sur petits oligomères (48 h)
	mVxmin	mVxmin	mVxmin	kDa	kDa				
b0	3,28	5,72	0,26	6971,88	242,25	0,29	0,19	0,35	0,46
b1	-17,43	-12,40	-4,79	1602,47	5,89	-1,14	-1,18	-0,90	-0,97
b2	0,33	-0,10	0,13	-28,59	-5,50	0,04	-0,01	-0,03	0,03
b11	19,27	14,86	6,51	-177,21	-1,89	1,23	1,35	0,97	1,20
b22	0,54	0,08	0,22	437,80	9,48	-0,05	0,14	0,05	-0,07
b12	-0,26	-2,29	-0,26	-72,19	-0,02	0,04	0,07	-0,01	-0,01
R ²	0,910	0,927	0,863	0,961	0,941	0,942	0,957	0,953	0,824
DOFA	5	5	5	5	5	5	5	5	5
DOFE	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DOFR	8	8	8	8	8	8	8	8	8
σ_{adj}^2	486	266	43	3663803	106	2	2	1	2
σ_{expl}^2	818	447	75	6049767	190	3	4	2	3
σ_{res}^2	307	168	28	2268663	71	1	1	1	1
F	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F _{fisher} (5%)	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Validity	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

	Ratio Oligo/Mono (0 h)
b0	6,58
b1	-4,91
b2	0,33
b11	-0,07
b22	-1,98
b12	0,33
R ²	0,895
DOFA	5
DOFE	3
DOFR	8
σ_{adj}^2	39
σ_{expl}^2	68
σ_{res}^2	25
F	1
F _{fisher} (5%)	9
Validity	Valid

Annexes

A.3. Données plans d'expérience sans bioextrusion (paille de blé prétraitée)

Tableau A-5 : Vitesses entre 0 et 4 h de conversion du glucose et du xylose sans bioextrusion préalable.

n°	Vi Glucose (0 à 4 h)	Vi Xylose (0 à 4 h)	Vi Glucose (0 à 4 h)	Vi Xylose (0 à 4 h)
	%/h	%/h	%/h	%/h
1	4,4	2,0	6,11	3,10
2	8,4	7,6	-2,78	-2,69
3	6,8	3,9	3,93	2,23
4	6,8	3,9	-0,50	1,34
5	6,8	3,9	-1,21	0,20
6	8,1	4,8	-1,26	-0,39
7	2,4	3,5		
8	1,3	1,0		
9	11,0	7,9		
			R ²	0,993
				0,969
			DOFA	1
			FOFE	2
			DOFR	3
			σ_{adj}^2	153
			σ_{expl}^2	76
			σ_{res}^2	51
			F	2
			F _{fisher} (5%)	19
			Validity	Valid

Tableau A-6 : ratios des aires des pics 1 à 3 (voire 4) sur le pic 4 ou 5 obtenus en chromatographie par exclusion stérique.

n°	ratio grands sur petits oligomères (4 h)	ratio grands sur petits oligomères (10 h)	ratio grands sur petits oligomères (24 h)	ratio grands sur petits oligomères (48 h)		ratio grands sur petits oligomères (4 h)	ratio grands sur petits oligomères (10 h)	ratio grands sur petits oligomères (24 h)	ratio grands sur petits oligomères (48 h)
	1	0,6	1,1	1,6	1,8	b0	1,01	1,30	1,98
2	2,5	2,4	2,6	2,5	b1	-0,90	-0,62	-0,65	-0,56
3	1,3	1,5	2,2	2,3	b2	0,12	-0,07	0,21	0,04
4	1,3	1,5	2,2	2,3	b11	0,41	0,36	-0,08	-0,18
5	1,3	1,5	2,2	2,3	b22	0,10	-0,11	-0,29	-0,03
6	1,1	1,1	1,9	2,1	b12	0,00	0,07	0,29	0,04
7	1,8	1,9	2,1	2,4	R ²	0,977	0,925	0,983	0,961
8	0,9	1,2	1,4	2,0	DOFA	1	1	1	1
9	2,0	1,7	2,2	2,4	FOFE	2	2	2	2
					DOFR	3	3	3	3
					σ_{adj}^2	7	4	4	3
					σ_{expl}^2	3	2	2	2
					σ_{res}^2	2	1	2	1
					F	2	2	2	2
					F _{fisher} (5%)	19	19	19	19
					Validity	Valid	Valid	Valid	Valid

Annexes

A.4. Données plans d'expérience comparaison avec et sans bioextrusion (paille de blé prétraitée)

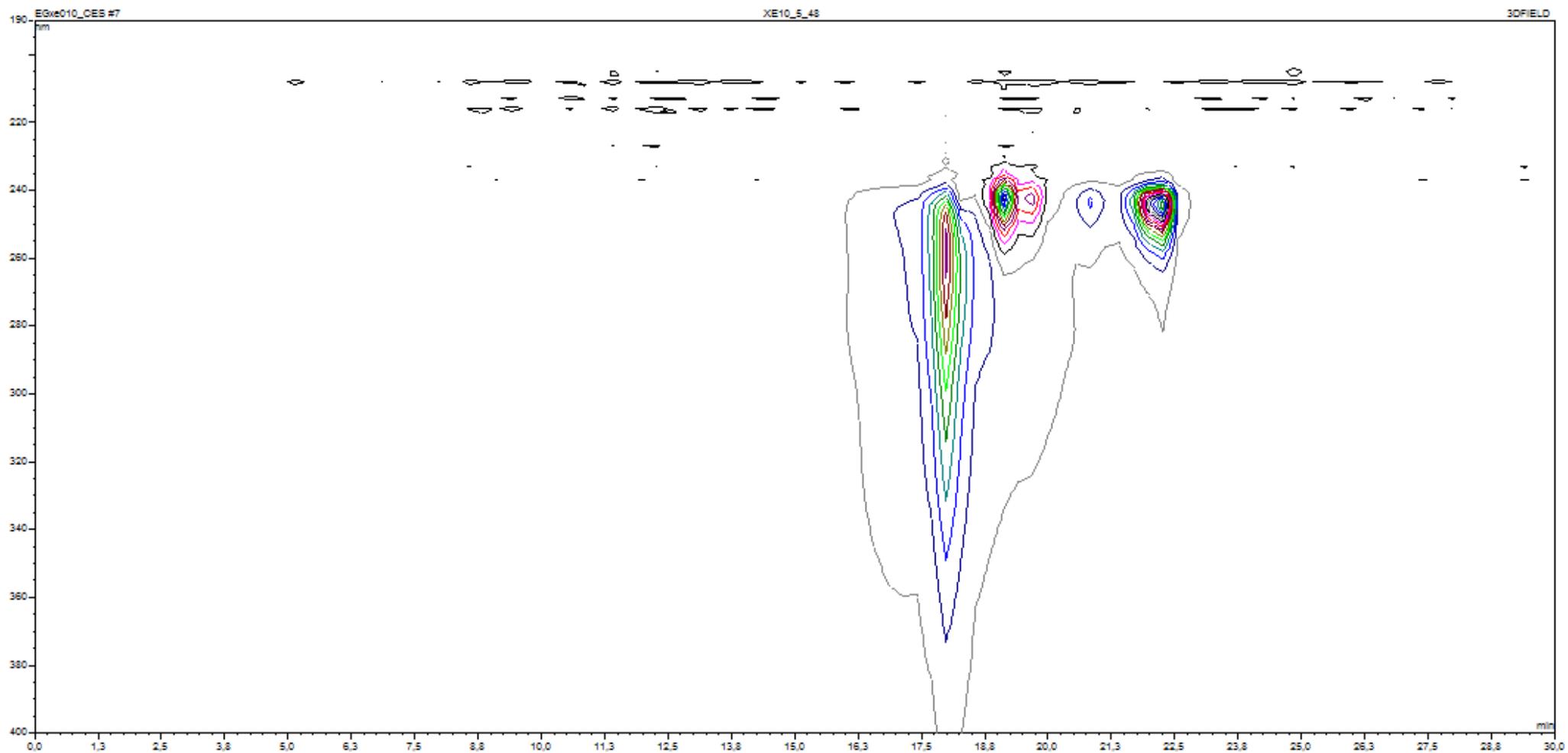
Tableau A-7 : Données des plans d'expériences pour la soustraction entre les valeurs expérimentales de conversion des sucres après bioextrusion et valeurs théoriques obtenues à partir de modèles sans bioextrusion préalable.

n°	Glucose conversion (4 h)	Glucose conversion (10 h)	Glucose conversion (24 h)	Glucose conversion (48 h)	Xylose conversion (4 h)	Xylose conversion (10 h)	Xylose conversion (24 h)	Xylose conversion (48 h)
	%	%	%	%	%	%	%	%
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	Y_7	Y_8
1	11,4	9,1	6,8	6,4	0,4	1,7	-1,4	-8,8
2	-1,5	-1,0	-0,3	-1,8	-3,5	-2,2	-3,0	-5,3
3	13,8	11,9	11,2	11,4	-1,5	0,8	-0,5	-5,3
4	17,4	16,2	16,1	8,7	-2,6	-1,3	-1,6	-9,0
5	12,2	11,2	9,7	11,7	-1,6	2,2	-0,8	-8,2
6	0,5	-0,2	1,5	5,1	-6,8	-11,7	-15,6	-22,9
7	-5,6	-4,8	-4,1	-5,9	-11,9	-19,6	-24,6	-32,9
8	3,4	4,9	10,2	4,8	-5,8	-4,8	-4,0	-9,9
9	-7,6	-0,9	2,9	-3,5	-10,3	-5,6	-6,6	-9,1
10	4,1	6,1	10,9	5,6	-7,2	-3,9	-2,3	-7,4
11	7,4	8,6	6,0	6,2	-5,9	-7,2	-6,4	-4,8
12	8,0	7,0	8,7	11,3	-2,3	-4,5	-6,7	-8,3
13	3,4	3,1	-2,7	7,7	-1,6	-4,8	-7,7	-7,9
14	7,2	12,8	8,8	9,2	-3,0	-4,8	-6,0	-6,8

	Glucose conversion (4 h)	Glucose conversion (10 h)	Glucose conversion (24 h)	Glucose conversion (48 h)	Xylose conversion (4 h)	Xylose conversion (10 h)	Xylose conversion (24 h)	Xylose conversion (48 h)
	%	%	%	%	%	%	%	%
b0	15,98	14,11	13,79	11,87	-0,92	0,96	-0,51	-7,99
b1	9,05	8,22	5,99	8,63	3,02	2,13	2,86	4,25
b2	0,54	2,43	4,67	0,04	-0,55	3,68	6,42	8,26
b11	-15,09	-11,06	-11,61	-9,68	-3,34	-6,07	-6,61	-0,21
b22	-16,98	-13,57	-12,03	-9,65	-7,32	-11,10	-11,19	-8,04
b12	6,56	3,64	2,60	0,34	-1,10	-5,45	-6,03	-8,59
R ²	0,892	0,906	0,933	0,814	0,670	0,795	0,837	0,759
DOFA	5	5	5	5	5	5	5	5
DOFE	3	3	3	3	3	3	3	3
DOFR	8	8	8	8	8	8	8	8
σ_{adj}^2	373	269	200	180	62	506	1624	3603
σ_{expl}^2	656	449	347	332	134	838	2593	5842
σ_{res}^2	246	169	130	125	50	314	972	2191
F	1	1	1	1	0	1	1	1
F _{fisher} (5%)	9	9	9	9	9	9	9	9
Validity	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid	Valid

Annexes

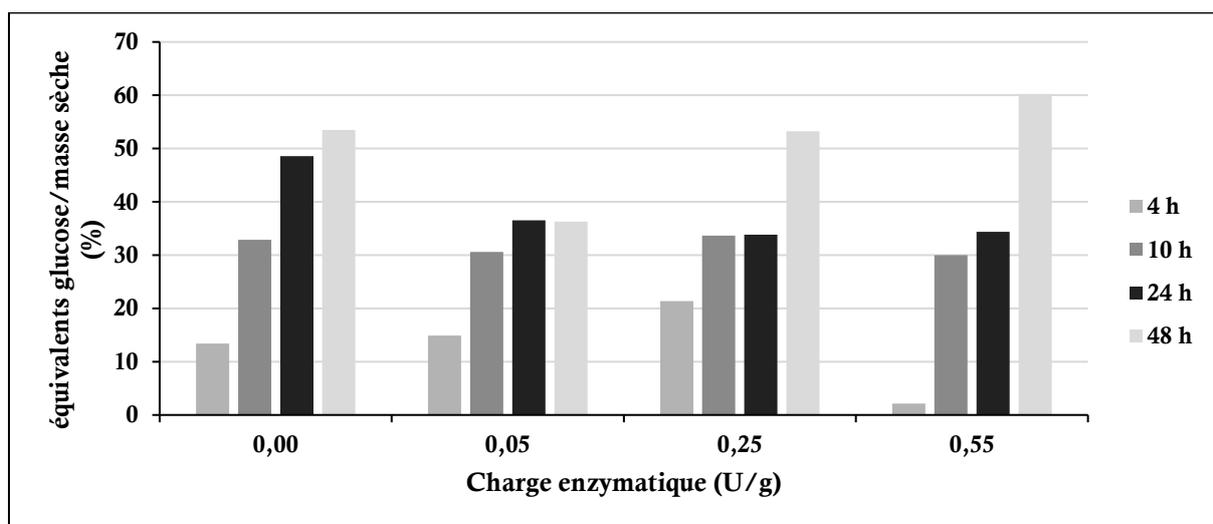
A.5. Données complémentaires des chromatographies en exclusion stérique



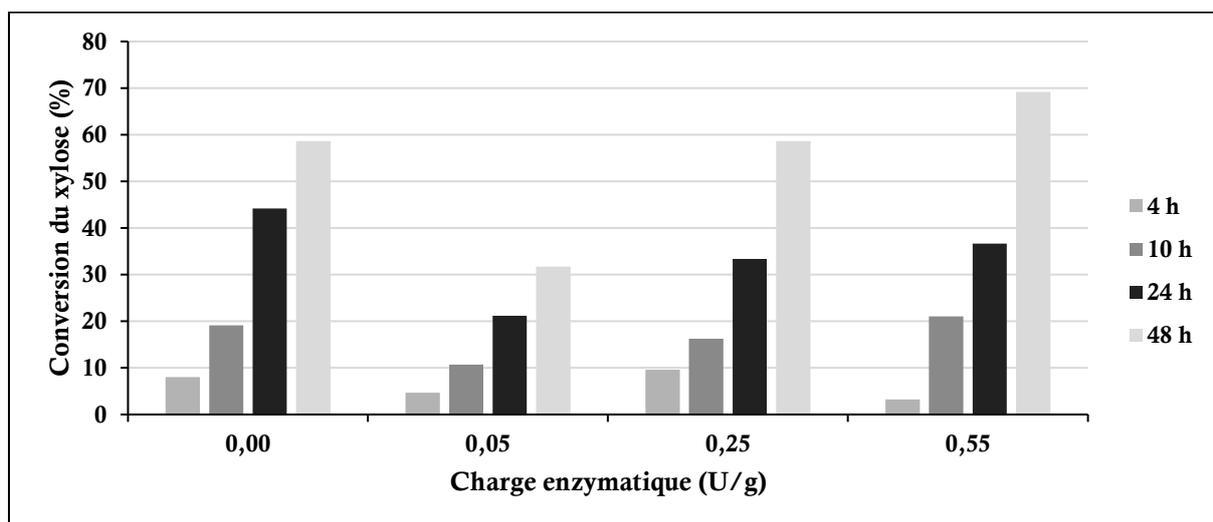
Graphique A-1 : Surface de réponse de l'intensité du signal UV suivant le temps en min (abscisses) et la longueur d'onde en nm (ordonnées), lors de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique de l'expérience 5 à 48 h.

A.6. Bioextrusion de paille de blé prétraitée avec des laccases.

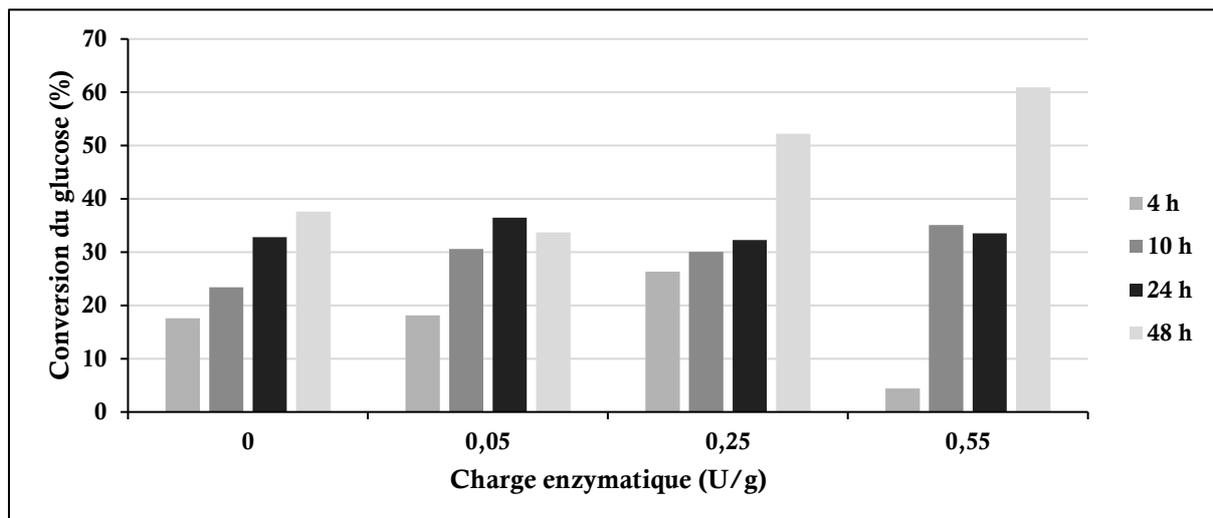
L'introduction de laccases (Metgen L111) durant le procédé d'extrusion a été testée sur de la paille de blé prétraitée par extrusion alcaline puis essorée par centrifugeuse. Du fait d'un débit très faible de solution de laccases, l'introduction est faite par une pompe péristaltique directement au niveau de l'entrée solide. Le ratio S/L et la charge enzymatique en cellic ctec2 sont fixés à 25%. Durant la bioextrusion, les cosignes de température sont fixée à 50°C et la vitesse des vis à 100 rpm. Après bioextrusion (0,25 h), des micro-tubes sacrificiels de 2 mL sont remplis de bioextrudats et placé dans un incubateur à 40°C avec agitation orbitale à 120 rpm (x10) jusqu'à 48 h. Les rendements en sucres réducteurs, glucose et xylose sont présentés dans les tableaux suivants :



Graphique A-2 : Cinétiques de rendement en sucres réducteurs libres après bioextrusion suivant différentes charges enzymatiques en laccases.



Graphique A-3 : Cinétiques de conversion du xylose après bioextrusion suivant différentes charges enzymatiques en laccases.



Graphique A-4 : Cinétiques de conversion du glucose après bioextrusion suivant différentes charges enzymatiques en laccases.