

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE - GEMBOUX AGRO-BIO TECH

**IMPACT DE LA STEAM EXPLOSION ET DE
L'HOMOGENEISATION SUR LES PROPRIETES
PHYSICOCIMIQUES ET L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE
LA CELLULOSE**

Nicolas JACQUET

*Essai présenté en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Agronomiques et
Ingénierie Biologique*

Promoteur : Prof. Michel PAQUOT

2012

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et de des modifications ultérieures.

RESUME

JACQUET Nicolas (2012) – Impact de la *steam explosion* et de l'homogénéisation sur les propriétés physicochimiques et l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. (Thèse de Doctorat). Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique. 234 pages, 10 tableaux, 46 figures.

Dans le contexte économique et énergétique actuel de notre société, il est universellement reconnu que des alternatives à la pétrochimie devront être développées dans un futur proche. L'une des alternatives possible réside dans le développement de process permettant de générer des biocarburants et des produits biobasés à partir de matériaux qui n'entrent pas en concurrence avec le secteur alimentaire. Les principaux matériaux indiqués dans cette optique sont les substrats lignocellulosiques qui sont principalement composés de trois types de polymères : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Cette thèse s'est inscrite dans cette démarche en se focalisant spécifiquement sur une fraction bien définie de ces matériaux : la Cellulose.

La première partie du travail a consisté à évaluer l'impact de deux types de prétraitements (la steam explosion et l'homogénéisation) sur les propriétés physico-chimiques et les rendements d'hydrolyse d'une cellulose modèle. En ce qui concerne la steam explosion, les résultats obtenus ont montré, contrairement aux conclusions habituellement exposées dans la littérature, que l'application d'un traitement de steam explosion d'une intensité modérée n'améliorait pas les taux d'hydrolyse de la cellulose modèle.

Parallèlement, deux modèles ont été développés. Le premier modèle, applicable aux installations pilotes, permet d'estimer l'intensité des traitements de steam explosion. Le second modèle est axé sur la prédiction de la dégradation thermique de la cellulose en fonction de l'intensité du prétraitement appliqué.

A l'opposé, il a été montré que l'utilisation de l'homogénéisation comme technologie de prétraitement permettait d'améliorer significativement (de 25 à 100 %) les rendements d'hydrolyse de la cellulose.

Enfin, la dernière partie de la thèse a été consacrée à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose modèle et présente deux procédés qui permettent d'obtenir des hydrolysats concentrés (> 150g/l) par une gestion des ajouts d'enzyme et/ou de substrat en cours d'hydrolyse.

JACQUET Nicolas (2012) – Impact of steam explosion and homogenization on physico-chemical properties and enzymatic hydrolysis of cellulose. (PhD Thesis). Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique. 234 pages, 10 tables, 46 figures.

In the economic and energetic context of our society, it is universally recognized that an alternative to fossil fuels and oil based product will be needed in the nearest future. A potential solution is to develop second generation biofuel and biobased product that utilizes non-food plant materials. The major component of these materials is lignocellulose, which is a complex composed by widely available biological polymers such as cellulose, hemicelluloses and lignin. This thesis is a part of this approach and is focused on a well-define part of these materials: the cellulose.

The first part of this work was focused on the impact of two pretraitements (steam explosion and homogenization) on physico-chemical properties and hydrolysis yield of pure cellulose fiber. In contrast with literature, results obtained showed that moderate steam explosion treatments did not appear to improve the enzymatic hydrolysis yield of the cellulose fibers.

In Parralel, a model that predicts the effect of the intensity of the steam explosion treatment in correlation with temperature and time was assessed. Links between this model and the evolution physico-chemical properties of the cellulose during pretreatment and cellulose hydrolysis yield were established

In a second way, a theoretical diagram predicting the degradation of the cellulose during the steam explosion treatment was established.

Regarding the homogenization, it was shown that homogenization increase significantly the cellulose hydrolysis (from 25 to 100%). Results highlights potential of this technology to be used as a pretreatment

Finally, enzymatic hydrolysis step has been studied in order to improve cellulose hydrolysis and to obtain high concentrated hydrolysate. In this way, two methods based on successive addition of enzyme and substrate were assessed

REMERCIEMENTS

Ce doctorat m'a permis de côtoyer de nombreuses personnes qui n'ont pas hésité à partager leurs connaissances et leurs expériences dans des domaines très variés. D'autres m'ont apporté le soutien moral nécessaire à la réalisation de ce travail. Cette thèse n'aurait donc pu être concrétisée sans leur engagement à tous. Je voudrais donc les remercier en espérant n'oublier personne.

Je tiens à exprimer mes premiers remerciements et toute ma reconnaissance au Professeur Michel Paquot qui m'a guidé tout au long de l'avancement du doctorat tout en me laissant une très grande liberté de recherche. La confiance qu'il m'a accordée durant toutes ces années passées au sein du service de Chimie Biologique Industrielle, l'ouverture d'esprit dont il a fait preuve durant nos différents échanges ainsi que les nombreux conseils apportés, m'ont permis d'évoluer dans ma profession de chercheur, qui se traduit aujourd'hui par la concrétisation de ce travail. Son prochain départ à la pension ne me laissera pas indifférent.

J'adresse également de vifs remerciements au Professeur Christophe Blecker qui m'a formé à la rédaction des articles scientifiques (ce qui, je dois l'avouer, n'était pas un de mes points forts). Le temps qu'il a pris pour la relecture et les corrections apportées aux articles ont permis d'améliorer leurs structures et leurs contenus.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Madame Caroline Vanderghem, avec qui je partage des sujets de recherches identiques depuis quelques années et qui a relu patiemment

tous les articles présentés dans cette thèse. Je tiens également à souligner la disponibilité et l'extrême gentillesse de Caroline. Pour toutes ces qualités, un grand merci.

Je tiens particulièrement à remercier Messieurs Albert Vanvyve et Alain Janssens, qui se sont investis pleinement et avec passion dans la conception du prototype de steam explosion. Sans leur engagement, le prototype n'aurait pas vu le jour, et par conséquence, cette thèse n'aurait pu se concrétiser.

Je voudrais aussi remercier le Professeur Jacques Devaux et Monsieur Nicolas Quiévy de l'Unité de Chimie et de Physique des Hauts Polymères à Louvain-la-Neuve ainsi que Madame Sabine Danthine pour l'apport de leurs compétences. Le Professeur Devaux et Nicolas m'ont permis d'accéder aux technologies de TGA. Sabine, merci de m'avoir initié au monde des analyses par rayons X dont les résultats ont permis de façonner en grande partie ce doctorat.

Je remercie le Pr Patrick Gerin, rapporteur du doctorat, pour son travail approfondi de relecture et ses propositions d'amélioration. Je remercie également Madame Jacqueline Destain, également rapporteur du doctorat, pour ses remarques pertinentes et ses conseils avisés ainsi que Messieurs Bernard Wathelet et Jean-Paul Wathelet, membre du comité de thèse.

Je ne voudrais pas oublier le personnel technique. Merci à Guillaume, aujourd'hui passé au grade d'ingénieur, Frédéric, Alexandre et Virginie qui m'ont assisté aux laboratoires tout au long de la thèse. Un merci tout particulier à Lynn, pour les « légères » corrections anglophones.

Merci à mes collègues de bureau devenus amis au cours de ces années : Florence, Paul, Emilie, Sébastien.

Enfin, je remercie sans exception tous les membres des Unités de Chimie Biologique Industrielle et de Sciences des aliments et formulation pour leur sympathie et leur bonne humeur et qui m'ont tous apporté un plus dans ma vie professionnelle.

J'en arrive à présent aux personnes qui m'ont soutenu au cours de la réalisation de cette thèse et qui m'apportent énormément dans ma vie de tous les jours.

Un chaleureux merci à mes parents qui m'ont permis de réaliser des études et soutenu durant toute la durée de ce doctorat. Je remercie mon papa pour le côté à la fois scientifique et aussi technique qu'il m'a inculqué, je sais que la concrétisation de ce doctorat lui tenait particulièrement à cœur. Je remercie ma maman pour son dévouement et la méthode de travail qu'elle m'a inculqué durant toute ma jeunesse.

Sophie, merci pour ta patience et tes encouragements. Merci aussi pour ton optimisme permanent et ta façon d'aller de l'avant et ce, quel que soit le projet. Enfin, merci de partager ta vie avec la mienne et de te consacrer comme tu le fais à notre famille.

Pour terminer, une mention toute particulière à mes trois « petits bouts » : Théo, Lucie et Maxence qui égailent et animent fortement ma vie de tous les jours.

LISTE DES PUBLICATIONS

Cette thèse est basée sur les publications scientifiques présentées ci-dessous et est divisée en différents chapitres. Les chapitres II à VI du présent manuscrit reprennent les articles scientifiques et doivent être lus dans un ordre chronologique pour traduire la cohérence du travail. Les chapitres relatifs aux articles sont structurés de la façon suivante : résumé, introduction, matériel et méthodes, résultats et discussions, conclusions, références.

Article 1

Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Christophe Blecker, Michel Paquot. (2010). La steam explosion : application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. **14**(S2), 561-566.

Article 2

Nicolas Jacquet, Nicolas Quiévy, Caroline Vanderghem, Sébastien Janas, Christophe Blecker, Bernard Wathelet, Jacques Devaux, Michel Paquot. (2011). Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polymer Degradation and Stability*. **96** 1582-1588.

Article 3

Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Sabine Danthine, Nicolas Quiévy, Christophe Blecker, Jacques Devaux, Michel Paquot. (2012). Influence of steam explosion on physico-chemical properties and hydrolysis yield of pure cellulose fibers. *Bioresource Technology*. Volume **121**(10), 221-227.

Article 4

Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Sabine Danthine, Christophe Blecker, Michel Paquot. (2012). Influence of homogenization treatment on physico-chemical properties and enzymatic hydrolysis yield of pure cellulose fibers. *Applied Biochemistry*. Soumis.

Article 5

Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Christophe Blecker, Paul Malumba, Frank Delvigne, Michel Paquot. (2012). Improvement of the cellulose hydrolysis yields and hydrolysate concentration by management of enzymes and substrate input. *Cerevisia*. In press.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cervis.2012.10.002>

LISTE DES ABREVIATIONS

2F	:	Furfural
5-HMF	:	Hydroxymethyl-furfural
AFEX	:	Explosion à l'ammoniac
BMIMCl	:	1-butyl-3-methylimidazolium chloride
CBU	:	Cellobiase unit
DMAc	:	Dimethylacetamide
FPU	:	Filter paper unit
G'	:	Storage modulus
G''	:	Loss modulus
HA	:	Hydroxyacetone
HAA	:	Hydroacetaldehyde
LG	:	Levoglucosan
LVR	:	Linear viscoelastic region
NMMO	:	N-methylmorpholine N-oxide
SF	:	Severity factor
TGA	:	Thermogravimetric analyses
W _w	:	Wet samples
W _d	:	Dried samples
WRV	:	Water retention values
δ	:	Strain
σ	:	Critical stress

TABLE DES MATIERES

1	Chapitre I	17
1.1	Les matériaux lignocellulosiques	20
1.1.1	<i>La cellulose</i>	21
1.1.2	<i>Les hémicelluloses</i>	24
1.1.3	<i>La lignine</i>	25
1.2	Les prétraitements de la biomasse	26
1.2.1	<i>Les prétraitements physiques et thermo-physiques</i>	27
1.2.2	<i>Les prétraitements chimiques et thermo-chimiques</i>	27
1.2.3	<i>Les prétraitements physico-chimiques et thermo-mécano-chimiques</i>	29
1.2.4	<i>Les prétraitements biologiques</i>	30
1.2.5	<i>Faisabilité technico-économique des prétraitements</i>	31
1.3	Objectifs et stratégie de la thèse	34
1.4	Références	39
2	Chapitre II	47
2.1	Introduction	53
2.2	Description de la technique	54
2.2.1	<i>Le facteur de sévérité</i>	56
2.3	Effets physicochimiques du procédé sur les matériaux lignocellulosiques	57
2.4	Conclusions	63
2.5	Références	65

3	Chapitre III	71
3.1	Introduction	77
3.2	Materials and Methods	79
3.2.1	<i>Materials</i>	79
3.2.2	<i>Methods</i>	80
3.2.2.1	<i>Steam explosion treatment</i>	80
3.2.2.2	<i>Thermogravimetric analysis</i>	81
3.2.2.3	<i>2F and 5-HMF determination by HPLC</i>	81
3.3	Results	82
3.4	Discussion	87
3.5	Conclusion	90
3.6	Acknowledgements	91
3.7	References	92
4	Chapitre IV	97
4.1	Introduction	105
4.2	Materials and Methods	106
4.2.1	<i>Materials</i>	106
4.2.2	<i>Methods</i>	107
4.2.2.1	<i>Steam explosion treatment</i>	107
4.2.2.2	<i>Enzymatic hydrolysis</i>	108
4.2.2.3	<i>Analysis of cellulose hydrolysis products</i>	108
4.2.2.4	<i>X-Ray Diffraction analyses</i>	109
4.2.2.5	<i>Water retention values</i>	110
4.2.2.6	<i>Thermogravimetric analysis</i>	110
4.3	Results and discussion	111

4.4	Conclusion	120
4.5	Acknowledgements	120
4.6	References	121
4.7	Supplementary electronic material	127
5	Chapitre V	129
5.1	Introduction	135
5.2	Materials and Methods	137
5.2.1	<i>Cellulose material</i>	137
5.2.2	<i>Homogenization treatment</i>	138
5.2.3	<i>Analysis of cellulose hydrolysis products</i>	138
5.2.4	<i>Optical microscopy</i>	139
5.2.5	<i>X-ray diffraction analyses</i>	140
5.2.6	<i>Water retention values</i>	140
5.2.7	<i>Rheological analyses</i>	140
5.3	Results and discussion	141
5.3.1	<i>Multiple-pass homogenization and degree of homogenization</i>	141
5.3.2	<i>Characterization of homogenized cellulose</i>	144
5.3.3	<i>Rheological characterization of homogenized cellulose</i>	149
5.3.4	<i>Effect of homogenization treatment on hydrolysis yield</i>	153
5.4	Conclusion	155
5.5	Acknowledgements	156
5.6	References	157
6	Chapitre VI	163
6.1	Introduction	169
6.2	Materials and Methods	171

6.2.1	<i>Cellulose and cellulase materials</i>	171
6.2.2	<i>Cellulose hydrolysis</i>	171
6.2.3	<i>Inhibition by hydrolysis product</i>	173
6.2.4	<i>Analysis of cellulose hydrolysis products</i>	173
6.2.5	<i>Viscosity measurement during hydrolysis step</i>	174
6.3	Results and discussion	174
6.3.1	<i>Management of substrate and substrate/enzyme input</i>	174
6.3.2	<i>Influence of limiting factors</i>	179
6.3.3	<i>Viscosity evolution of hydrolysate during hydrolysis step</i>	183
6.4	Conclusion	185
6.5	Acknowledgements	185
6.6	References	187
7	Chapitre VII	193
7.1	Introduction	195
7.2	La steam explosion : modèle de calcul du facteur de sévérité et facteurs limitants	196
7.3	Evolution de la cristallinité de la cellulose modèle consécutive aux prétraitements d'homogénéisation et de steam explosion	207
7.4	Identification des paramètres permettant d'optimiser les procédés de montée en concentration (process 1 et 2) décrits au chapitre VI	209
7.5	Evaluation technico-économique des potentialités d'utilisation de l'homogénéisation comme technologie de prétraitement.	214
7.6	Références	225
8	Chapitre VIII	229

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

Dans le contexte économique de notre société, la flambée générale des prix des produits issus de la pétrochimie, couplée à la crise mondiale de 2008 ont contribué à un important développement de l'industrie des biocarburants et des produits bio-basés [Wiloso et al., 2012]. L'idée actuelle, qui s'était déjà présentée dans les années 1980 à la suite de la crise du pétrole, est de limiter la dépendance de la société vis-à-vis des produits pétroliers en substituant ces derniers par des produits équivalents issus de la biomasse. L'avantage majeur de cette stratégie réside dans l'utilisation de ressources renouvelables pour produire des produits tels que des polymères, des produits chimiques et des carburants.

Dans ce contexte, deux distinctions majeures sont envisagées. D'une part, les biocarburants et les produits bio-basés qualifiés de « première génération » qui sont issus principalement des ressources de l'industrie agroalimentaire [Diaz et al., 2009]. D'autre part, les biocarburants et produits bio-basés de « seconde génération » qui n'entrent pas en compétition dans le domaine de l'alimentaire et permettent de valoriser des résidus, issus notamment des industries agricoles ou forestières, qui ont en général une faible valeur ajoutée [González-García et al., 2012].

Au cours de la dernière décennie, beaucoup de recherches ont été axées sur la faisabilité technique et économique de ces produits de « seconde génération ». La finalité principale de ces recherches est axée sur la production d'éthanol de seconde génération qui, au vu de ces avantages environnementaux (réduction des émissions de CO et des particules fines, pas de résidus d'hydrocarbure), rencontre de plus en plus de succès comme biocarburant [Mabee and Saddler, 2010].

1.1. Les matériaux lignocellulosiques

Les nouveaux procédés développés s'appuient sur l'exploitation des ressources riches en lignocellulose (pailles de riz, switchgrass, miscanthus, pailles de maïs, eucalyptus, résidus des industries forestières...), matériaux qui sont majoritairement composés de trois types de polymères : la cellulose, la lignine et les hémicelluloses [Balat et al., 2008]. La cellulose et les hémicelluloses sont des polysaccharides composés de sucres fermentescibles. La cellulose est un polymère constitué exclusivement de glucose, un sucre à six carbones (C6). Les hémicelluloses ont une composition plus variée alternant une succession de sucres à six carbones combinés à des sucres à cinq carbones tels que le xylose ou le rhamnose. Enfin, la lignine est un polymère phénolique, qui n'est pas utilisable par les micro-organismes dans une fermentation éthanolique classique [Shen et al., 2011].

D'une manière générale, les matériaux lignocellulosiques peuvent être perçus comme des matériaux composites où la cellulose et les hémicelluloses forment les armatures qui sont englobées par la lignine, jouant le rôle de ciment.

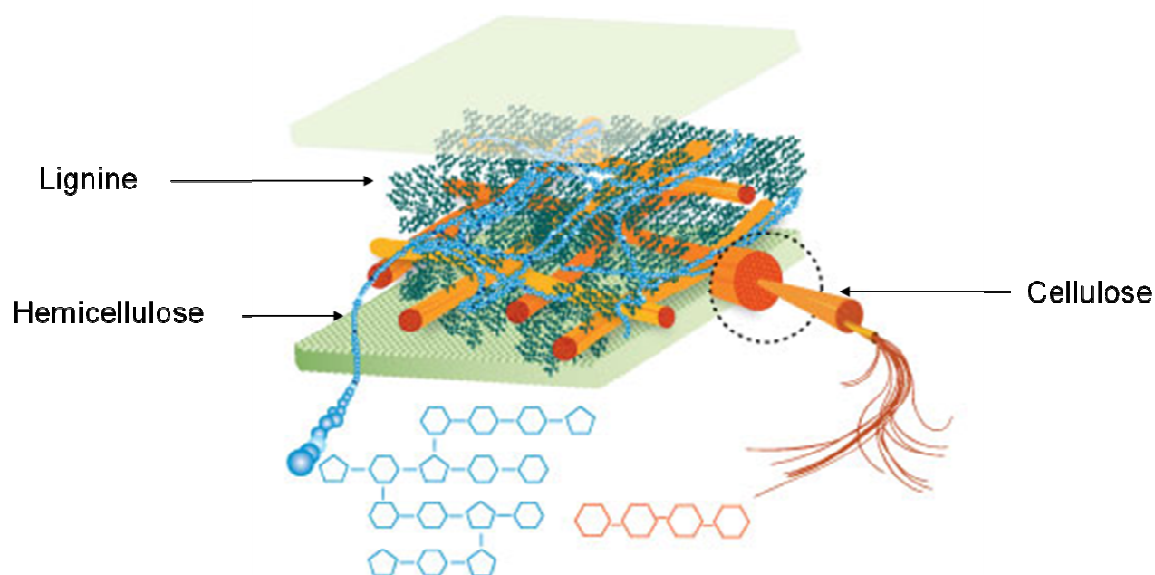


Fig. 1 : Représentation schématique de la structure d'un matériau lignocellulosique (paroi secondaire) [Jacquet et al., 2008]

1.1.1. La cellulose

La cellulose est l'un des constituants majeurs des matériaux lignocellulosiques qui assure la protection et le soutien des organismes végétaux. La cellulose se situe dans la paroi cellulaire des cellules qui compose la biomasse et est la substance organique la plus abondante dans la nature. C'est un solide blanc dont l'organisation en fibres le distingue des autres glucides [Paquot M., 1980].

La cellulose est un polysaccharide dont l'unité répétitive est le glucose, un sucre à 6 carbones. Une chaîne de cellulose est constituée de plusieurs centaines d'unités glucose liées entre elles par une liaison glycosidique β - (1,4). La cellulose possède donc un degré de polymérisation important qui va influencer ses propriétés mécaniques et physiques [Ribet J. (2003)].

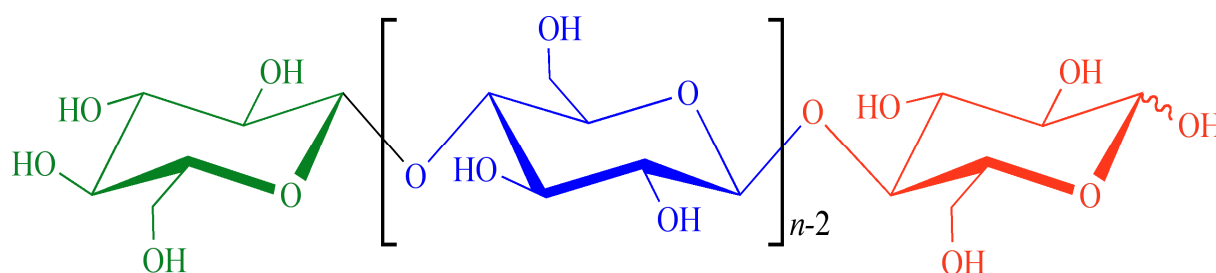


Fig. 2 : Représentation schématique d'une molécule de cellulose [Jacquet et al. 2008]

La conformation des cycles de glucose étant 4C_1 , les groupements hydroxyles (présents au nombre de trois par unité de glucose) ainsi que la liaison glycosidique sont tous en position équatoriale par rapport au plan moyen du cycle, ce qui implique une linéarité de la molécule de cellulose.

Cette linéarité permet une organisation spatiale des molécules de cellulose sous forme d'une maille monoclinique où les chaînes moléculaires sont reliées entre elles par des liaisons hydrogènes établies entre les différents groupements hydroxyles [French A.D., 2012].

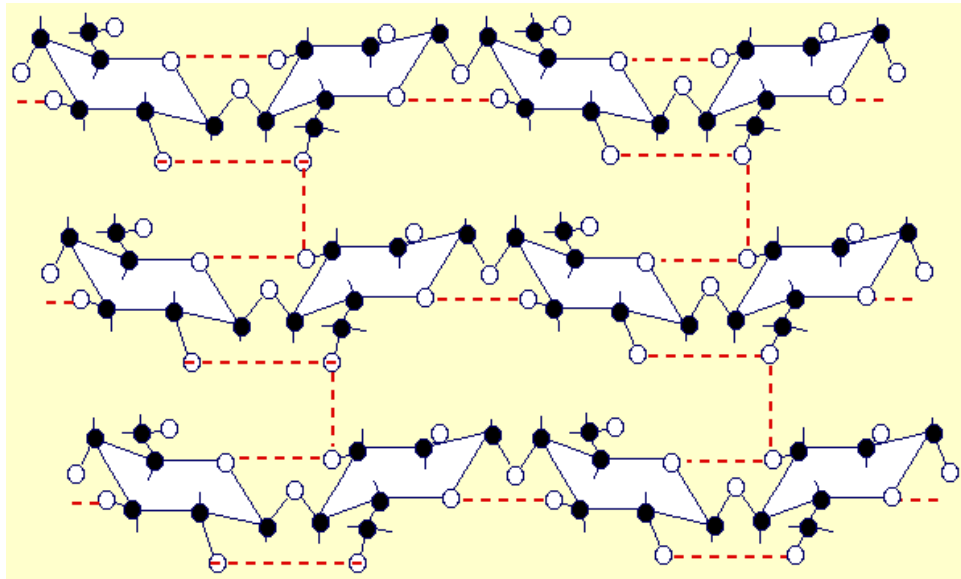


Fig. 3 : Schématisation des liaisons hydrogènes reliant les molécules de cellulose

[Ribet J., 2003]

Ce type de configuration va permettre à la cellulose de s'organiser de manière à former des fibrilles élémentaires composées d'une quarantaine de molécules, qui vont elles-mêmes s'agréger pour former des micro-fibrilles. Les micro-fibrilles vont ensuite s'associer entre-elles pour former des macro-fibrilles puis, des fibres de cellulose [Pérez and Samain, 2010].

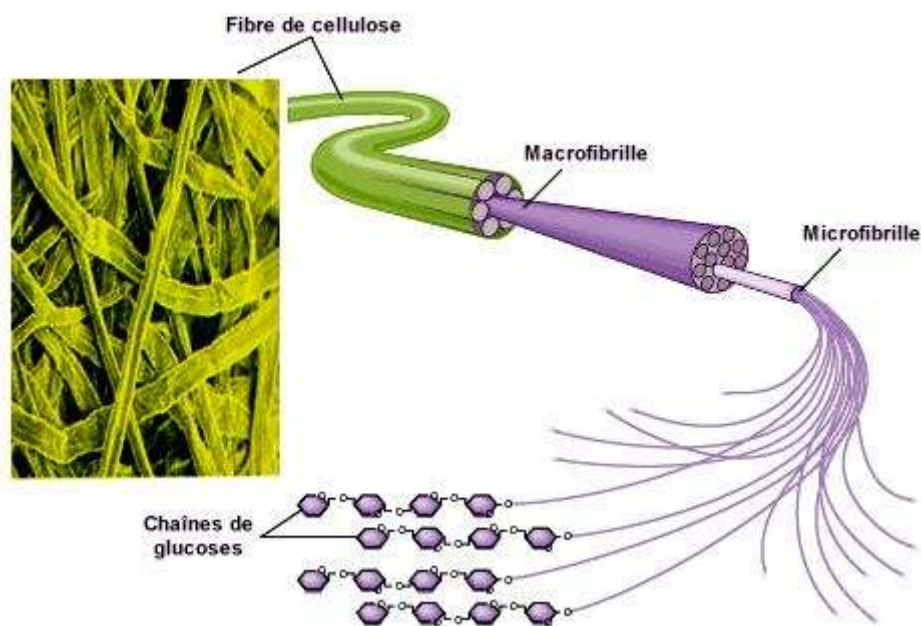


Fig. 4 : Arrangement structurel d'une fibre de cellulose

Les micro-fibrilles de cellulose ainsi formées sont caractérisées par des propriétés cristallines complexes. En effet, il est possible de distinguer des zones qui vont de l'arrangement hautement ordonné des molécules de cellulose (zones cristallines) jusqu'à des zones où l'on observe un agrégat de molécules disposées irrégulièrement (zones amorphes) [Ruel et al. 2012].

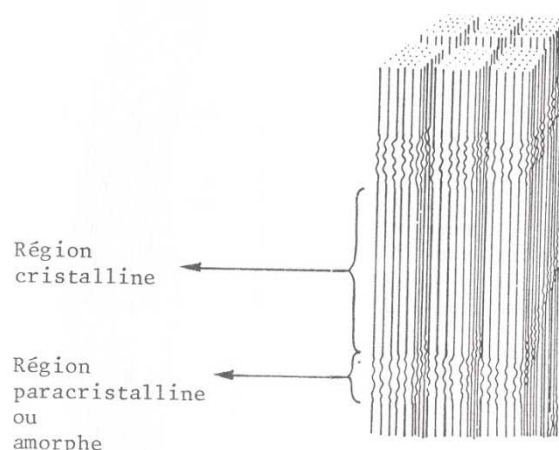


Fig. 5 : Arrangement structurel des molécules dans les zones cristallines et les zones amorphes [Paquot M., 1980]

Ce taux de zone cristalline et de zone amorphe, qui est fortement variable aux seins des différents matériaux cellulosiques [Zugenmaier P., 2001], influence fortement le comportement de la cellulose au niveau de ses propriétés mécaniques et physiques [Qiu et al. 2006], mais également au niveau des propriétés d'hydrolyse [Szijártó et al., 2008]. Le taux de cristallinité intervient également sur l'accessibilité de la cellulose à l'eau et aux réactifs chimiques qui pénètrent la cellulose principalement dans les zones amorphes [Czihak et al., 1999].

Beaucoup d'applications relatives aux industries alimentaires et pharmaceutiques utilisent de la cellulose qualifiée de microcristalline. La cellulose microcristalline est une cellulose purifiée et partiellement dépolymérisée. Elle est fabriquée par hydrolyse contrôlée dans une

solution d'acide minéral dilué à la température d'ébullition. Ce procédé a pour but d'hydrolyser préférentiellement les chaînes de cellulose des zones amorphes et de conserver uniquement les zones cristallines. Le produit final obtenu possède donc un haut degré de cristallinité [Paquot M., 1980].

La structure de la cellulose décrite ci-dessus a uniquement trait à la cellulose naturelle (appelée également cellulose native ou cellulose I). La disposition des molécules constitutives de la cellulose I peut être modifiée par des traitements chimiques pour donner des formes polymorphiques. Il s'agit des cellulose II, cellulose III et cellulose IV [Ishikawa et al., 1996]. La cellulose II est obtenue par une solubilisation de la cellulose native (cellulose I) dans des bases concentrées ou des solvants (DMAc + LiCl, NMMO...), suivie d'une régénération. La cellulose ainsi obtenue possède très peu de zones cristallines (cellulose amorphe). La cellulose III et la cellulose IV sont préparées à partir de la cellulose I ou de la cellulose II (traitement à l'ammoniaque liquide (T° : -80°C , durée : 2h) suivi d'une évaporation à -15°C). Ces celluloses, relativement instables, sont formées par un compactage plus étroit des chaînes de cellulose I et de cellulose II, ce qui leurs confèrent des propriétés cristallines différentes. [Paquot M. 1980].

1.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont des polysaccharides qui entourent les fibres de cellulose et contribuent au support des parois cellulaires des végétaux. Contrairement à la cellulose dont l'unité répétitive est le glucose, les hémicelluloses sont des polymères de composition variable constitués majoritairement de six sucres monomères principaux : l'arabinose, le glucose, le xylose, le mannose, le galactose et le rhamnose qui se combinent pour former des chaînes de xylanes, glucuronoxylanes, arabinoxylanes, glucomannanes et xyloglucanes [Sun and Cheng, 2002].

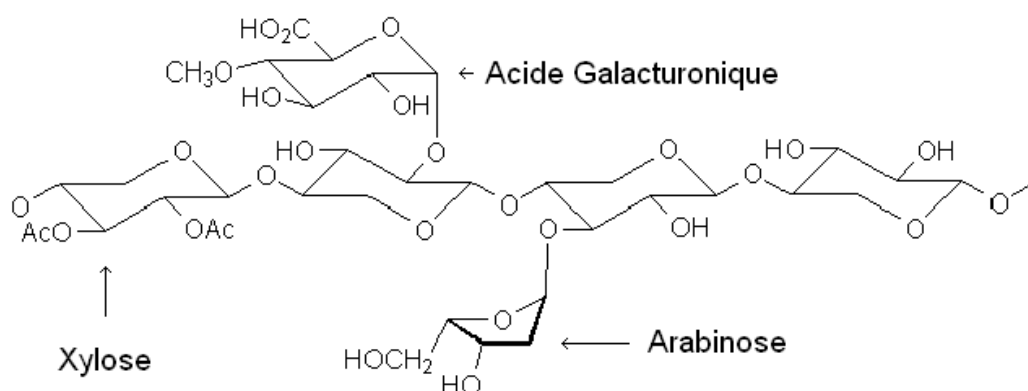


Fig. 6 : Exemple schématique de la structure des hémicelluloses [Jacquet et al., 2008]

La nature ramifiée des polyosides couplés à la diversité des monosaccharides qui les composent empêche toute organisation structurale des polymères et confère aux hémicelluloses une structure amorphe. Cette propriété induit que les hémicelluloses sont plus facilement accessibles aux agents d'hydrolyse tels que les enzymes et les acides, ce qui rend leur hydrolyse plus facile que celle de la cellulose [Girio et al., 2010].

1.1.3. La lignine

La lignine est le troisième composant de la paroi cellulaire des végétaux et le deuxième constituant le plus abondant de la biomasse après la cellulose. Dans la paroi végétale, la lignine agit comme un ciment, remplissant les espaces entre et autour de la cellulose et des hémicelluloses. Cette propriété rigidifie fortement la structure du matériau avec l'inconvénient qu'elle limite grandement l'accessibilité des fractions cellulosiques et hémicellulosiques contenues dans la biomasse.

Contrairement à la cellulose et aux hémicelluloses, la lignine n'est pas un polymère polysaccharidique. La lignine est un complexe tridimensionnel amorphe composé de structures phenylpropanes dont les précurseurs sont des alcools aromatiques (alcool p-coumarylique, alcool coniferylique et alcool sinapylique) incorporés dans la lignine sous

forme de p-hydroxyphenyle, guaiacyle et syringyle dont la proportion varie fortement suivant le type de biomasse. Cette variabilité, couplée aux changements apportés lors de l'extraction, rend difficile la présentation de leur structure et fait de la lignine un composé encore mal connu dont la valorisation reste aujourd'hui limitée [Vanderghem et al., 2011].

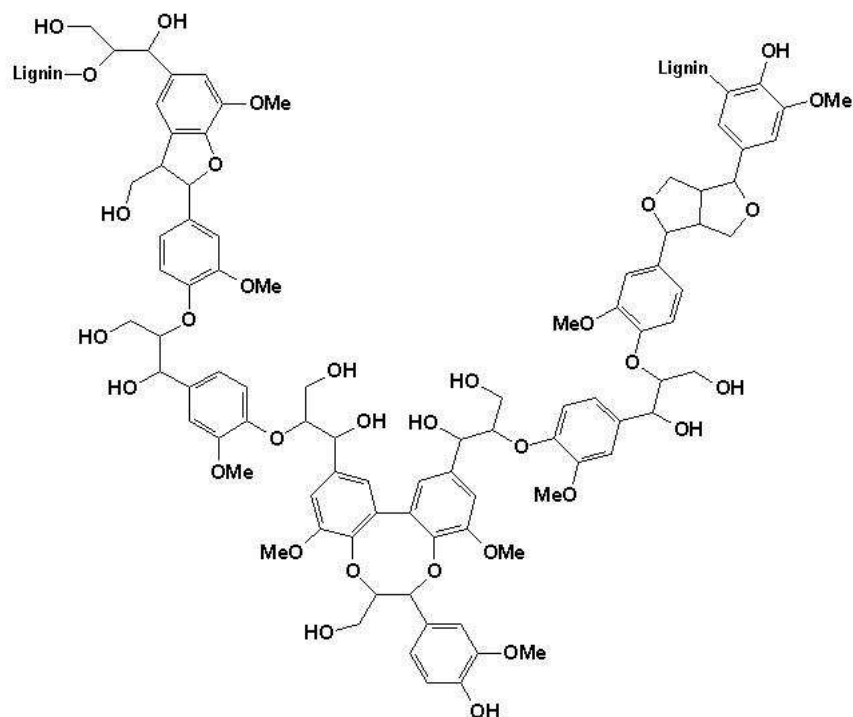


Fig. 7 : Exemple schématique de la structure de la lignine [Jacquet et al., 2008]

1.2. Les prétraitements de la biomasse

Les potentialités de valorisation des trois bio-polymères décrits ci-dessus nécessitent de briser la structure du matériau lignocellulosique pour extraire spécifiquement chacun de ces composés. Bien que plusieurs technologies d'extraction existent, toutes requièrent une étape de prétraitement pour ouvrir la structure de la biomasse.

L'efficacité d'un prétraitement se caractérise selon différents critères : réduction de la taille des particules du substrat, formation limitée d'inhibiteurs de dégradation, préservation de la fraction hémicellulosique, capacité à récupérer des molécules à haute valeur ajoutée, rapport

efficacité/coût, quantité d'énergie nécessaire pour le prétraitement, gestion des effluents... [Banerjee et al., 2010].

Une large gamme de prétraitements a été développée au cours de la dernière décennie pour améliorer l'accessibilité de la structure de la biomasse de l'échelle nanométrique à l'échelle micrométrique.

D'une manière générale, ces technologiques de prétraitements peuvent être regroupées en quatre catégories : les prétraitements physiques, les prétraitements chimiques, les prétraitements physico-chimiques et les prétraitements biologiques [Menon and Rao, 2012].

1.2.1. Les prétraitements physiques et thermo-physiques

Les prétraitements physiques englobent généralement les procédés mécaniques utilisés pour la réduction de taille. Les technologies de broyage, les radiations ionisantes, les ultra-sons et l'extrusion sont des technologies communément envisagées dans cette optique [Menon and Rao, 2012].

1.2.2. Les prétraitements chimiques et thermo-chimiques

Les prétraitements chimiques ont été développés à l'origine pour l'industrie papetière dans le but de réaliser la délignification des matériaux lignocellulosiques. Outre leur capacité de délignification, les prétraitements chimiques permettent d'extraire les fractions hémicellulosiques et ont également un impact sur la cristallinité et le degré de polymérisation de la cellulose.

Les prétraitements chimiques englobent les prétraitements acides et les prétraitements alcalins. Les procédés organosolv et la solubilisation dans les liquides ioniques sont également utilisés comme technologies de prétraitement de la biomasse [Menon and Rao, 2012].

Les prétraitements acides emploient des acides dilués ou concentrés (principalement l'acide sulfurique) pour briser la structure rigide de la biomasse en hydrolysant les hémicelluloses ainsi que (selon la concentration d'acide) les parties amorphes des fibres de cellulose [Zhang et al., 2007].

Les prétraitements alcalins utilisent des bases telles que la soude, la chaux et l'hydroxyde de potassium. L'utilisation de ces alcalis entraîne une altération des structures phenylpropanes des lignines, le gonflement et la décristallisation partielle de la cellulose [McIntosh and Vancov, 2012] ainsi que la mise en solution partielle des hémicelluloses [Sills and Gossett, 2011].

Les procédés organosolv révèlent également un important potentiel en terme de prétraitement de la biomasse [Papatheofanous et al., 1995].

Ces procédés utilisent différents solvants organiques ou aqueux tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'éthylène glycol... qui ont pour but de solubiliser la lignine, ce qui permet d'une part d'accroître l'accessibilité des fractions cellulosiques et hémicellulosiques et d'autre part de récupérer comme co-produit, une lignine purifiée [Zhao et al., 2009].

Selon les procédés, les solvants sont parfois combinés avec des catalyseurs acides (HCl, H₂SO₄, acide oxalique ou salicylique) qui permettent également l'hydrolyse des hémicelluloses.

L'emploi de solvants reste cependant l'inconvénient majeur de ces procédés. Le recyclage complet des solvants doit impérativement être réalisé en raison d'une part du prix initial du solvant (d'un point de vue économique, les alcools de faible poids moléculaires à bas point d'ébullition tels que l'éthanol, sont favorisés) et d'autre part des effets inhibiteurs qui pourraient être apportés par des traces de ce dernier lors des étapes d'hydrolyse enzymatique et de fermentation [Sun and Cheng, 2002].

La solubilisation par les liquides ioniques comme technique de prétraitement est beaucoup plus récente. Les liquides ioniques, qui portent le qualificatif de « solvants verts », sont des sels composés de cations et d'anions de tailles importantes, couplés à un faible degré de symétrie du cation. Cette conformation induit des températures de fusion généralement inférieures à 100 °C et confère aux liquides ioniques des propriétés dissolvantes selon le type d'ions qui les composent [Earle and Seddon, 2000]. De récentes études ont notamment confirmé les propriétés de dissolution de la cellulose, du switchgrass, des pailles et des pailles de maïs dans le BMIMCl (1-butyl-3-methylimidazolium chloride) et envisagent leur utilisation comme agents de prétraitement de la biomasse [Binder and Raines, 2010].

1.2.3. Les prétraitements physico-chimiques et thermo-mécano-chimiques

Les prétraitements physico-chimiques combinent à la fois les effets des prétraitements physiques et chimiques. Cette catégorie regroupe les technologies qui sont sujettes à un important développement et semblent les plus prometteuses. Ces technologies sont : la steam explosion et le vapocraquage, l'explosion à l'ammoniaque (AFEX) et les micro-ondes couplés à des agents chimiques.

La steam explosion est un procédé thermochimique qui permet de briser la structure des matériaux lignocellulosiques par les actions combinées de la chaleur apportée par la vapeur et du cisaillement appliqué au matériau lors du retour à la pression atmosphérique. Une étude bibliographique détaillée relative à cette technologie est présentée au chapitre II du présent manuscrit.

L'explosion à l'ammoniac (AFEX) est un prétraitement où les matériaux lignocellulosiques sont exposés à l'ammoniaque liquide à haute température et sous haute pression. Ce procédé induit une décristallisation partielle de la cellulose, une dépolymérisation des hémicelluloses

et le clivage des liaisons éthers des structures phenylpropanes des lignines [Holtzapple et al., 1992]. Cette phase d'exposition à l'ammoniaque est suivie d'une décompression explosive, très semblable à la steam explosion, qui augmente significativement la surface spécifique disponible pour les attaques chimiques ou enzymatiques. Les effets cumulés des deux phases de traitement induisent une amélioration significative des rendements d'hydrolyse et les taux de fermentation de différents matériaux lignocellulosiques. Ce procédé a notamment été testé avec succès sur la luzerne, les pailles de maïs, les pailles de blé... [Zheng et al. 2009].

Enfin, la substitution du chauffage conventionnel par un chauffage par micro-ondes montre une amélioration du potentiel des agents chimiques qui se traduit par une amélioration significative des rendements d'hydrolyse [Zhu et al., 2005]. Le chauffage par micro-ondes est habituellement combiné aux agents basiques et acides mais également aux agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène [Zhu et al., 2006].

1.2.4. Les prétraitements biologiques

Les prétraitements biologiques emploient des micro-organismes (principalement des champignons) qui s'attaquent à la structure lignocellulosique. Les champignons employés dans les prétraitements biologiques ont des caractéristiques de dégradation bien distinctes selon le type de souches utilisées. En général, les pourritures brunes et les pourritures molles attaquent majoritairement la cellulose, sans toucher à la lignine. Les pourritures blanches dégradent par contre activement la lignine [Sun and Cheng., 2002], ce qui suscite leur intérêt comme agent de prétraitement de la biomasse. La dégradation des lignines par les pourritures blanches se produit grâce des enzymes possédant des activités de types laccase et peroxydase [Okano et al., 2005]. Hatakka (1983) a montré l'efficacité des pourritures blanches sur l'amélioration des rendements d'hydrolyse des pailles de blé (amélioration allant pour certaines souches jusqu'à 200 % de rendement initial). Les résultats de cette étude montrent

cependant que les hydrolyses par les laccases et les peroxydases sont très lentes (jusqu'à 5 semaines), ce qui implique qu'il est nécessaire d'augmenter les activités spécifiques des enzymes pour rendre les prétraitements biologiques commercialement compétitifs [Talebnia et al. 2010]. Dans cette optique, Farnet et al. (1999) ont montré qu'il était possible de stimuler les activités des laccases de *Marasmius quercophilus* (de 1,8 à 7,3 fois l'activité initiale) par l'ajout de composés aromatiques tels que l'acide p-hydroxybenzoïque, l'acide férulique, et l'alcool coniferylque et de sulfate de cuivre à des concentrations assez basses (250 mg/l pour les composés aromatiques, 5 à 7 mg/l pour le sulfate de cuivre). Malgré cette amélioration, les prétraitements biologiques restent encore aujourd'hui à l'étape du développement bien que ce type de prétraitement soit respectueux de l'environnement, sécurisant, peu énergivore et possède toutes les qualités pour s'intégrer facilement dans un objectif de développement durable [Talebnia et al., 2010].

1.2.5. Faisabilité technico-économique des prétraitements

Bien que la recherche sur les prétraitements de la biomasse ait permis d'identifier toute une série de technologies prometteuses, il ne faut cependant pas oublier que la conversion de la biomasse s'inscrit dans une démarche compétitive économiquement et écologiquement durable.

Par rapport à cet aspect, les principaux obstacles des prétraitements existants sont très différents d'une technologie à l'autre : fractionnement limité du matériau en ces différents constituants, formation d'inhibiteurs de fermentation, utilisation de produits chimiques onéreux et/ou toxiques, utilisation trop importante d'énergie, production considérable de déchets... [Eggeman and Elander, 2005]. Sur base de ces critères, les technologies présentant les meilleurs potentiels en termes de faisabilité technico-économique (Tableau 1) ont pu être identifiés.

Tableau 1 : Faisabilité technico-économique des technologies de prétraitement : récapitulatif

Prétraitement	Amélioration des rendements d'hydrolyse	Formation de produits de dégradation	Génération de coproduit	Utilisation d'agents chimiques / Recyclage agents chimiques	Application à différentes biomasses	Coût de l'équipement	Succès à l'échelle pilote	Avantages	Inconvénients
Broyage mécanique	Faible	Aucun	Aucun	Non	Oui	Important	Oui	Augmentation de la surface spécifique	Consommation importante d'énergie
Acides	Important	Important	Important	Oui / Moyen	Oui	Moyen	Oui	Hydrolyse des hémicelluloses, hydrolyse partielle de la cellulose, altération de la structure des lignines	Dangereux, toxique, corrosif
Alcalins	Important	Faible	Important	Oui / Moyen	Oui	Moyen	Oui	Extraction des lignines et des hémicelluloses, gonflement de la cellulose	Durée du traitement, présence de sels
Steam explosion / Vapocraquage	Important	Important	Faible	Non	Oui	Important	Oui	Extraction des hémicelluloses, modification de la structure des lignines	Production d'inhibiteur, Déstructuration incomplète du matériau
AFEX	Important	Faible	Faible	Oui / Moyen	Non	Important	Début	Extraction de la lignine et des hémicelluloses	Peu d'efficacité sur les matériaux très riches en lignines
Micro-ondes / agents chimiques	Important	Moyen	Moyen	Oui	Oui	Important	Non	Rapidité de la réaction	Coût de l'équipement important, technologie uniquement à l'échelle laboratoire
Liquides inoniques	Moyen	Faible	Faible	Oui / Moyen	Oui	Important	Non	Dissolution de la cellulose	Technologie uniquement à l'échelle laboratoire

La littérature confirme l'analyse du tableau 1 qui montre que, actuellement, les technologies les plus prometteuses sont la steam explosion/vapocraquage, les prétraitements acides et l'AFEX [Eggeman and Elander, 2005]. La solubilisation par les liquides ioniques et les technologies micro-ondes sont encore peu développés et restent à l'échelle du laboratoire. Les prétraitements mécaniques ont, quant à eux, une efficacité qui reste limitée en termes d'amélioration des rendements d'hydrolyse, ce qui implique que ces deux technologies sont un peu en retrait [Menon and Rao, 2012].

A l'inverse, différentes études de faisabilité ont été réalisées dans le but de comparer les technologies de steam explosion/vapocraquage, l'AFEX, les prétraitements acides et alcalins. Une première approche a été menée en 2005 par Eggeman et Elander. Lors de cette étude, les différents procédés de prétraitement ont été inclus dans un modèle de simulation économique basé sur la production de bioéthanol via une hydrolyse enzymatique à partir de canne de maïs. Les conclusions montrent qu'il existe une différence minime en termes de coût entre les différentes technologies de prétraitement. L'étude montre ensuite que les coûts généraux des prétraitements dont les prix d'investissement sont faibles sont contrebalancés par les coûts importants engendrés par la récupération des acides et/ou des solvants. Il est également démontré qu'une variation infime de l'un des paramètres du modèle modifie complètement la hiérarchie des coûts des technologies. Il faut noter que cette étude a été menée en considérant une charge enzymatique toujours identique, ce qui doit normalement être optimisé pour chaque prétraitement [Sendich and Dale, 2009]. Enfin, une dernière conclusion montre que la technologie de steam explosion se démarque des autres technologies, non pas du point de vue économique, mais de part une faible utilisation d'agent chimique et/ou de solvant, ce qui permet à la steam explosion de s'intégrer plus favorablement dans une démarche écologiquement durable.

Une étude de faisabilité assez similaire a également été menée par Kazi et al. en 2010. Cette étude est basée sur la simulation des coûts de fonctionnement d'une usine de production de bioéthanol de seconde génération via une hydrolyse enzymatique à partir de différentes biomasses (taux d'amortissement de l'usine : 5 à 8 ans). Selon ce modèle, il a été montré que le prétraitement à l'acide dilué présentait un coût très légèrement inférieur aux autres technologies. L'analyse montre également que les coûts de l'étape de prétraitement ne représentent qu'une partie du coût de production et que des paramètres tels que les types de matières premières employées et les quantités d'enzymes utilisées ont un impact financier plus important [Kazi et al., 2010].

D'autres études technico-économiques réalisées par Aden et al. (2002) et Sassner et al. (2008) sur la production de bioéthanol par voie enzymatique, à partir de trois types de substrat lignocellulosiques conduisent également à des conclusions identiques. Les résultats de cette étude montrent que la moitié des coûts globaux de production de bioéthanol sont représentés par la matière première. Ils montrent également que les coûts enzymatiques représentent eux 53 à 65 % du coût total de la saccharification suivant le type de prétraitements utilisés (steam explosion ou acide dilué). Le coût des prétraitements intervient principalement au niveau du capital d'investissement.

1.3. Objectifs et stratégies de la thèse

La littérature montre que de très nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'hydrolyse de la cellulose depuis des décennies. Aujourd'hui, l'énorme potentiel de développement de produits à partir de la biomasse reste, à nouveau, un défi industriel à côté des réalisations actuelles telles que la production papetière ou de pâte cellulosique. Ces secteurs pourraient connaître à leur tour d'importantes évolutions, en regard des progrès réalisés en chimie verte et des contraintes en termes de développement durable.

La production de biocarburant de seconde génération au départ des matériaux lignocellulosiques cristallise la plupart des intérêts scientifiques et industriels. Cependant, le concept de bioraffinage montre aussi que le développement de produits bio-basés en dehors du secteur des biocarburants est une opportunité.

De nombreux travaux sont menés sur les technologies de prétraitements et leurs impacts sur les matériaux lignocellulosiques complexes. Leur nombre montre qu'il est encore difficile aujourd'hui d'apporter des réponses claires quant aux relations « types de prétraitements / types de substrats / structure des matériaux obtenus / produits visés et co-produits obtenus ».

Ce travail veut apporter une contribution à l'étude de ces relations. Pour atteindre cet objectif, sa spécificité est de se focaliser, non pas sur un substrat complexe mais sur une cellulose de référence, ce qui signifie qu'un procédé de fractionnement a précédé l'obtention du substrat étudié. Cette approche réduit bien évidemment le champ de l'étude. Elle devrait toutefois permettre de connaître plus précisément l'effet des prétraitements étudiés sur la structure et les dégradations éventuelles de la cellulose mais également sur ses perspectives d'hydrolyse enzymatique.

Deux prétraitements font l'objet de notre recherche : la steam explosion et l'homogénéisation. La steam explosion, de par son stade avancé de développement (pilote industriel), de ses coûts raisonnables et de sa faible utilisation d'agents chimiques, apparaît comme la technologie de prétraitement qui présente les meilleures perspectives de faisabilité technico-économique. Des prétraitements de steam explosion d'intensités variables ont donc été appliqués, à une échelle pilote, à la cellulose modèle. Les Chapitres II, III et IV reprennent la littérature et les résultats relatifs à l'étude de cette technologie. Le Chapitre II présente une étude bibliographique détaillée de la steam explosion et de son influence sur les matériaux lignocellulosiques complexes. Le Chapitre III est axé sur une étude pratique de la dégradation thermique (facteur

limitant de la technologie) de la cellulose modèle et de la formation de certains inhibiteurs de fermentation en cours du prétraitement. Le Chapitre III présente également le modèle développé en vue d'étendre la notion du calcul du facteur de sévérité à l'échelle du matériel pilote et d'en déduire les répercussions sur la structure de la cellulose. Le Chapitre IV étudie ensuite les modifications physico-chimiques (rétention d'eau, cristallinité...) apportées à la cellulose modèle par les prétraitements de steam explosion ainsi que leurs impacts sur les rendements d'hydrolyse enzymatique.

Le choix de la seconde technologie de prétraitement s'est porté sur l'homogénéisation. Contrairement à la steam explosion, très peu d'études ont été menées pour identifier le potentiel de l'homogénéisation en tant que prétraitement de la biomasse. L'homogénéisation et la steam explosion présentent certaines similarités de process (traitement sous-pression, cisaillement important) et sont assez proches de différentes technologies de raffinage mécanique développées dans les années 1980 [Tshiamala et al. 1984a ; Tshiamala et al. 1984b].

L'homogénéisation est de plus une technologie maîtrisée aujourd'hui à l'échelle industrielle. Les résultats présentés au Chapitre V illustrent les modifications physicochimiques apportées à la cellulose modèle par les traitements d'homogénéisation, toujours à l'échelle pilote, ainsi que leur influence sur les rendements d'hydrolyse. Ici également, des paramètres du process seront définis.

L'autre aspect original du travail a donc consisté à améliorer les connaissances des impacts des prétraitements étudiés en définissant des paramètres technologiques transposables à l'échelle industrielle.

Enfin, le dernier axe stratégique du doctorat a été basé sur la thématique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. En effet, travailler sur une cellulose modèle à l'échelle pilote a permis d'être confronté à des problèmes pratiques pour la conduite de l'hydrolyse enzymatique. En particulier si un des objectifs est la montée en concentration en substrat en vue d'obtenir des sirops suffisamment riches en glucose, d'importants problèmes rhéologiques apparaissent. La dernière partie de ce travail (Chapitre VI) illustre cette situation et veut y apporter des solutions en termes de gestion des apports en substrat et en enzymes.

L'ensemble du travail pratique mené sur cellulose modèle permet ensuite de revenir sur les relations « process-structure-applications » en les discutant (Chapitre VII) et en dégagant des conclusions et perspectives.

En résumé, les objectifs stratégiques du doctorat permettent d'apporter une réponse aux questions scientifiques suivantes :

- Quels sont les impacts spécifiques de la steam explosion sur les propriétés physico-chimiques, la dégradation thermique et l'amélioration des rendements d'hydrolyse enzymatique d'une cellulose modèle ?
- Quels sont les modifications apportées par l'homogénéisation sur les propriétés physico-chimiques et les taux d'hydrolyse par voie enzymatique de cette même cellulose modèle ?
- La concentration des hydrolyzats est-elle optimisable par une gestion adéquate des ajouts d'enzymes et de substrats en cours d'hydrolyse ?

1.4. Références

1. Wiloso, E.I., Heijungs R., Geert R. (2012). LCA of second generation bioethanol: A review and some issues to be resolved for good LCA practice. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 5295-5308
2. Dias, M.O.S., Ensinas, A.V., Nebra, S.A., Filho, R.M., Rossell, C.R.V, Maciel, M.R.W., (2012). Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. *chemical engineering research and design*, 87, 1206-1216
3. González-García, S., Iribarren, D., Susmozas, A., Dufour, J., Murphy, R.J. (2012). Life cycle assessment of two alternative bioenergy systems involving *Salix* spp. biomass: Bioethanol production and power generation. *Applied Energy*, 95, 111-122
4. Mabee, W.E., Saddler, J.N. (2010). Bioethanol from lignocellulosics: Status and perspectives in Canada. *Bioresource Technology*, 101, 4806-4813
5. Balat, M., Balat, H., Cahide, O. (2008). Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, 551-573.
6. Shen, J., Fatehi, P. Soleimani, P., Ni, Y. (2011). Recovery of lignocelluloses from pre-hydrolysis liquor in the lime kiln of kraft-based dissolving pulp production process by adsorption to lime mud. *Bioresource Technology*, 102, 10035-10039

7. Jacquet, N., Wertz, J.L., Paquot, M. (2008). Les produits lignocellulosiques comme source de biocarburants de deuxième génération dans un concept de bioraffinage. Conference Energy Mons.
8. Paquot, M. (1980). Possibilités de développement de l'utilisation de la cellulose. Thèse de doctorat. *Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux*. p. 287
9. Ribet J. (2003). Fonctionnalisation des excipients : Application à la comprimabilité des celluloses et des saccharoses. Thèse de doctorat. *Université de Limoges*. p. 264
10. French, A.D. (2012). Combining Computational Chemistry and Crystallography for a Better Understanding of the structure of cellulose. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 67, p. 19-93
11. Péreza, S., Samain, D. (2010). Structure and Engineering of Celluloses. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 64, p. 25-116.
12. Ruel, K., Nishiyama, Y., Joseleau, J.P. (2012). Crystalline and amorphous cellulose in the secondary walls of Arabidopsis. *Plant Science*. 193-194, p. 48-61.
13. Zugenmaier, P. (2008) Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Progress in polymer science*. 26, 1341-1417.

14. Qiu, W., Endo, T., Hirotsu T. (2006). Structure and properties of composites of highly crystalline cellulose with polypropylene: Effects of polypropylene molecular weight. *European Polymer Journal* ,42, 1059-1068.
15. Szijártó, N., Siika-aho, M., Tenkanen, M., Alapuranen, M., Vehmaanperä, J., Réczey, K., Viikari L. (2008). Hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose by heterologously produced cellulases of *Melanocarpus albomyces*. *Journal of Biotechnology*, 136, 140-147
16. Czihak, C., Muller, M., Schober, H., Heux, L., Vogl, G. (1999). Dynamics of water adsorbed to cellulose. *Physica B*, 266, 87-91.
17. Ishikawa, A., Okano, T., Sugiyama, J. (1996). Fine structure and tensile properties of ramie fibres in the crystalline form of cellulose I, II, III and IV. *Polymer*, 38, 463-468.
18. Sun, Y., Cheng, J., (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1–11
19. Gírio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S., Bogel-Lukasik R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101 4775-4800
20. Vanderghem, C., Richel, A., Jacquet, N., Blecker, C. Paquot, M. (2011). Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of *Miscanthus x giganteus* lignins. *Polymer Degradation and Stability*, 96, 1761-1770.

21. Banerjee, S, Mudaliar, S, Sen, R, Giri, B, Satupte, D, Chakrabarti, T. (2010). Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 4. 77-93.
22. Menon, V., Rao, M., (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, 522-550.
23. Zhang, Y.H.P, Ding, S.Y., Mielenz, J.R., Cui, J.B., Elander, R.T., Laser, M. (2007). Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnololy and Bioengeneering*. 97, 214-223.
24. McIntosh, S., Vancov, T. (2012). Enhanced enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*. 101, 6718-6727.
25. Sills, D.L, Gossett, J.M. (2011). Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. *Bioresource Technology*. 102, 1389-1398.
26. Papatheofanous, M.G., Billa, E., Koullas, D.P., Monties, B., Koukios, E.G. (1995). Two stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures. *Bioresource Technology*. 54, 305-310.
27. Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N., (2009). Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *Journal of. Biotechnology*. 139, 47-54.

28. Earle, M.J., Seddon, K.R. (2000). Ionic liquids - green solvents of future. *Pure Applied Chemistry*. 72, 1391-1398.
29. Holtzapple, M.T., Lundeen, J.E., Sturgis, R. (1992). Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 34, 5-21.
30. Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2, 51-68.
31. Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Liao, J, Zhang, Y. (2005). Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 40, 3082-3086.
32. Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S. (2006). Comparison of three microwave / chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biosystems Engineering*. 93, 279-283.
33. Binder, J.B., Raines, R.T. (2010). Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass. *Proceeding of the National Academy Science of the USA*. 107. 4516-4521.
34. Okano, K., Kitagawa, M., Sasaki, Y., Watanabe, T., (2005). Conversion of Japanese red cedar (*Cryptomeria japonica*) into a feed for ruminants by white-rot basidiomycetes. *Animal Feed Science and Technology*. 120, 235-243.

35. Hatakka, A.I., 1983. Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymic saccharification of cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 18, 350-357.
36. Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology* 101. 4744-4753.
37. Farnet A.M., Tagger S., LE Petit J. (1999). Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 322, 6, 499-503
38. Eggeman, T., Elander, R.T. (2005) Process economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 96, 2019-2025.
39. Sendich, E.D., Dale, B.E. (2009). Environmental and economic analysis of the fully integrated biorefinery. *Bioenergy*. 1, 331-345.
40. Kazi, F.K., Fortman, J.A., Anex, R.P., Hsu, D.D., Aden, A., Dutta, A. (2010). Technoeconomic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel*. 89, 20-28.
41. Aden, A, Ruth, M.F., Ibsen, K, Jechura, J, Neeves, K, Sheehan, J, Wallace, B. (2002) Lignocellulosic biomass to ethanol processing design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. NREL/TP-510-32438.

42. Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G. (2008). Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. 32. 422-430.
43. Tshiamala T., Frapont, L., Paquot, M., Thonart, Ph., Mottet, A. (1984)a. Etude comparative des pâtes de Bambou. *Holzforschung*. 38. 281-288.
44. Tshiamala T., Frapont, L., Paquot, M., Thonart, Ph., Mottet, A. (1984)b. Hydrolyse enzymatiques des pâtes de bambou. Influence des modes de cuisson et des traitements mécaniques. *Holzforschung*. 38. 343-351.

CHAPITRE II

LA STEAM EXPLOSION : APPLICATION EN TANT QUE PRETRAITEMENT DE LA MATIERE LIGNOCELLULOSIQUE

Adapted from: Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Christophe Blecker, Michel Paquot. (2010). La steam explosion : application en tant que prétraitement de la matière lignocellulosique. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 14(S2), 561-56

Dans le domaine des biocarburants et produits bio-basés de seconde génération obtenus à partir de biomasse, la littérature montre que la steam explosion est la technologie de prétraitement qui suscite beaucoup d'intérêt.

Avant d'entamer l'étude sur son impact sur une cellulose modèle, il est utile de faire une synthèse des connaissances actuelles de son action sur les substrats lignocellulosiques.

Les premiers efforts se sont donc axés sur l'élaboration d'une synthèse bibliographique relative à la technologie de steam explosion et de son impact sur ces matériaux.

La synthèse reprise dans le présent chapitre présente dans un premier temps une description technique de la technologie. Cette description est suivie de la présentation du modèle de calcul du facteur de sévérité tel qu'il est décrit actuellement dans la littérature. Ce facteur de sévérité permet d'estimer l'intensité du prétraitement de steam explosion sur base de la température et du temps de rétention appliqués pendant le prétraitement. Il faut noter que le modèle de calcul du facteur de sévérité décrit dans la littérature sera adapté à notre installation pilote pour y intégrer notamment l'impact de la montée en température (Chapitre III). Une discussion plus poussée relative au modèle de calcul du facteur de sévérité sera ensuite présentée dans la dernière partie de la thèse (Chapitre VII).

Enfin, la dernière partie du chapitre II est axée plus spécifiquement sur l'impact de ce prétraitement et illustre les différents avantages et inconvénients de la technologie ainsi que les défis à réaliser.

Résumé

La steam explosion est un procédé thermo-mécano-chimique qui permet la déstructuration de la matière lignocellulosique par l'action combinée de la chaleur issue de la vapeur, des hydrolyses induites par la formation d'acides organiques et du cisaillement résultant de l'augmentation du volume de la vapeur lors de la chute brutale de pression. Le procédé est composé de deux phases distinctes : le vapocraquage et la décompression explosive dont les actions combinées vont, selon les conditions, modifier les propriétés physiques du matériau (surface spécifique, rétention d'eau, coloration, taux de cristallinité de la fraction cellulosique...), améliorer l'hydrolyse des fractions hémicellulosiques (formation de mono et oligosaccharides) et induire des modifications dans la structure des lignines, ce qui facilite leurs extractions. Tous ces phénomènes permettent l'ouverture de la structure du matériau et améliorent significativement la sensibilité à l'hydrolyse de la fraction cellulosique en vue de l'obtention de sucres fermentescibles, valorisables dans les unités de production de biocarburants de deuxième génération ou de molécules à haute valeur ajoutée.

Mots-clés

Steam Explosion, Vapocraquage, Prétraitement, Cellulose, Hémicellulose, Lignine.

Abstract

Steam explosion is a thermomechanicochemical process which allows the breakdown of lignocellulosic structural components by steam heating, hydrolysis of glycosidic bonds by organic acid formed during the process and shearing forces due to the expansion of the moisture. The process is composed of two distinct stages: vapocracking and explosive decompression. Cumul effects of both phases include modification of the physical properties of the material (specific surface area, water retention capacities, color, cellulose crystallinity index...), hydrolysis of hemicellulosic components (mono and oligosaccharides released) and modification of the chemical structure of lignin. These effects permit the opening of lignocellulosic structures and increase the enzymatic hydrolysis yield of cellulose components in the aim to obtain fermentable sugars used in second generation biofuels or high value-added molecules process.

Keywords

Steam Explosion, Vapocracking, Pre-treatment, Cellulose, Hemicellulose, Lignin.

2.1. Introduction

Dans le contexte énergétique actuel, de nombreuses études montrent que les matériaux lignocellulosiques peuvent être utilisés comme matières premières en vue de produire des biocarburants de deuxième génération. Pour ce faire, ces matériaux doivent être soumis à des prétraitements dont le but est de déstructurer la matrice pour permettre la libération plus aisée de monosaccharides fermentescibles.

Pour Grous et al. (1986), trois facteurs principaux permettent de faciliter la libération de sucres fermentescibles. Le premier facteur est la séparation de la fraction hémicellulosique qui permet d'augmenter l'accessibilité de la fraction cellulosique en créant de larges pores au sein de la structure fibreuse, avec pour conséquence une augmentation du nombre de sites disponibles pour les réactions d'hydrolyse (McMillan, 1994).

Le second facteur déterminant est la cristallinité de la cellulose. Différentes études montrent que les traitements thermochimiques ont tendance à augmenter l'indice de cristallinité de la fraction cellulosique, avec pour conséquence une diminution de l'accessibilité du substrat.

Enfin, l'accès aux fibres de cellulose est fortement restreint par la présence de lignine, matrice qui entoure la fraction cellulosique. L'élimination de cette dernière est indispensable pour la réalisation des opérations d'hydrolyse (Grous et al., 1986).

Plusieurs types de prétraitements permettent le fractionnement des matériaux lignocellulosiques : prétraitements acides et alcalins, vapocraquage, steam explosion, traitement haute pression... Le principal avantage du prétraitement de steam explosion réside dans sa faible consommation énergétique. Holtzapple et al. (1989) ont montré que les techniques conventionnelles de broyage, appliquées sur du peuplier tremble, nécessitent un surplus énergétique de 70 % pour obtenir une réduction granulométrique comparable au

traitement de steam explosion. L'impact environnemental de ce procédé est de plus restreint car cette technologie n'utilise pas (ou très peu) d'agent chimique.

Le présent article bibliographique, qui se focalise spécifiquement sur la steam explosion, reprend les principes de cette technique et ses effets sur les différentes fractions constitutives des matériaux lignocellulosiques.

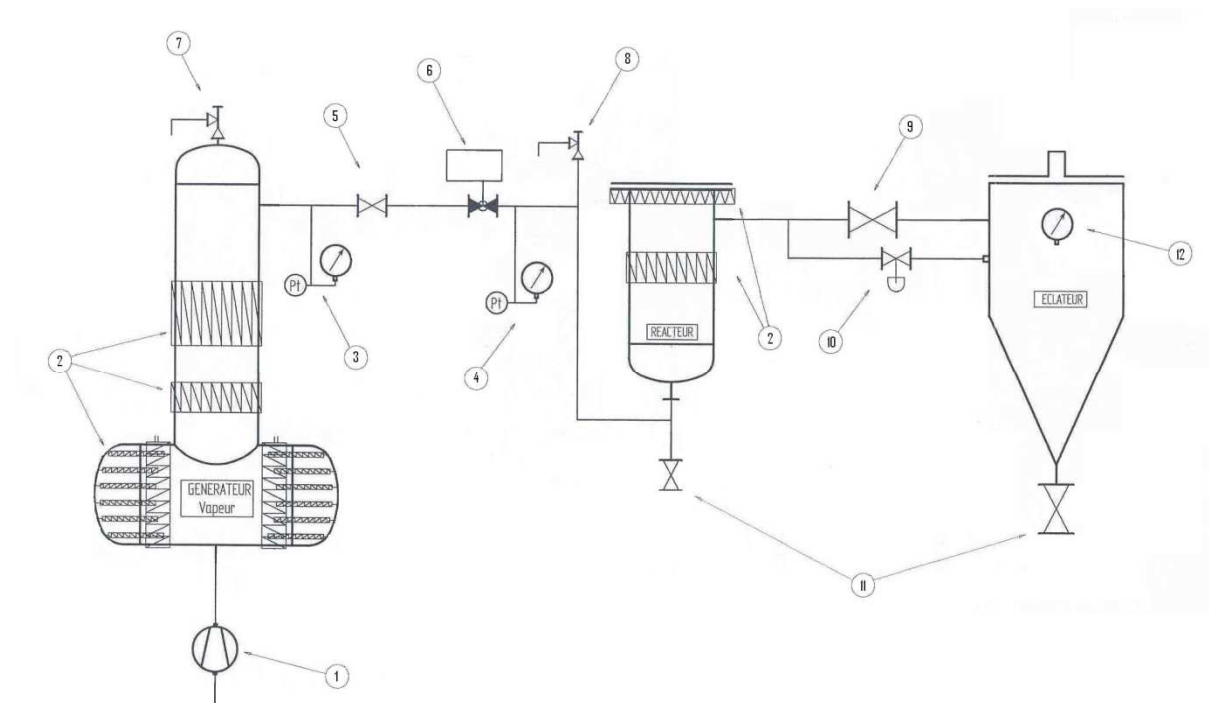
2.2. Description de la technique

La steam explosion a été développée initialement en 1924 par W. H. Mason pour réaliser la production de panneaux de bois agglomérés. Son application a ensuite été étendue à la production d'aliments pour ruminants durant la seconde moitié du vingtième siècle (Brecc et al., 1998). D'un point de vue technique, l'installation de steam explosion est composée d'un générateur de vapeur qui alimente un réacteur qui sera soumis à une dépressurisation soudaine. Lors de la dépressurisation, la matière est éjectée du réacteur et est récupérée au niveau d'un éclateur (Fig. 1).

Le procédé de steam explosion présente deux phases distinctes : le vapocraquage et la décompression explosive. Le vapocraquage consiste à faire pénétrer la vapeur sous haute pression par diffusion à l'intérieur de la structure du matériau. De la sorte, la vapeur se condense et « mouille » le matériau (Avella et al., 1998). L'eau condensée, couplée à une température élevée, va initier l'hydrolyse des groupements acétyles et méthylglucuroniques contenus dans les xylanes et dans certaines fractions galactomannanes. Les acides organiques (acides acétique et uronique) ainsi libérés contribuent à augmenter l'acidité du milieu et catalysent la dépolymérisation des fractions hémicellulosiques, ce qui entraîne la libération de xylanes et d'une quantité limitée de glucanes. L'application de conditions plus drastiques

permet l'obtention de monosaccharides et l'hydrolyse d'une partie de la fraction cellulosique (Sun et al., 2005).

Dans un second temps, la décompression explosive est provoquée par une chute brutale de pression qui entraîne la revaporisation d'une partie de l'eau de condensation présente dans le matériau. Cette expansion brutale de la vapeur d'eau va induire l'apparition de forces de cisaillement qui seront appliquées à l'ensemble du matériau. Si ces forces sont suffisantes, elles engendreront l'éclatement mécanique de la structure de ce dernier.



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

Fig. 1 : Schéma général d'une installation de steam explosion

La description de la technologie montre que deux facteurs sont déterminants pour optimiser l'efficacité du procédé : le temps de rétention et la pression.

Plusieurs études indiquent que l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique est corrélée au temps de séjour de la biomasse dans le réacteur. Plus ce temps est élevé, plus l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique est complète, ce qui favorise notamment les processus de fermentation en aval du process (Chornet et al., 1988). En contrepartie, bien que les produits d'hydrolyse (mono et oligo-saccharides) soient relativement stables en conditions acides, ils peuvent subir d'autres réactions telles que la déshydratation, la fragmentation ou la condensation. Ces réactions ultérieures génèrent divers produits comme du furfural, de l'hydroxyméthylfurfural, des acides lévulinique et formique ainsi que divers composés aromatiques qui sont des inhibiteurs de fermentation. L'augmentation du temps de rétention contribue à accroître la production de ces produits de dégradation dont les quantités doivent absolument être minimisées.

Quant à la pression, elle joue aussi un rôle prépondérant dans le procédé. La pression étant corrélée à la température, l'importance de cette dernière va avoir un impact aussi bien sur les cinétiques d'hydrolyse des fractions cellulosiques que sur la production des produits de dégradation. De plus, la différence de pression entre l'intérieur du réacteur et la pression atmosphérique est proportionnelle à l'intensité des forces de cisaillement qui vont s'appliquer à la biomasse au moment de la détente explosive (Sun et al., 2005).

Au vu du nombre d'études menées sur la biomasse, Chornet et al. (1988) ont montré qu'il était impératif de déterminer un facteur représentatif des paramètres du procédé pour comparer les différents traitements appliqués.

2.2.1. Le facteur de sévérité

Les résultats des premières études menées sur la steam explosion montrent qu'il existe une relation entre la température du procédé, couplée au temps de rétention, et l'accessibilité du substrat qui se traduit par une amélioration des rendements d'hydrolyse (Chornet et al., 1988).

De ces observations, les auteurs ont élaboré un modèle qui définit la sévérité du prétraitement sur base des effets cumulés de la température et du temps de rétention. Ce modèle se base sur les hypothèses que la cinétique du procédé est d'ordre 1 et obéit à la loi d'Arrhenius.

$$S = \text{Log}_{10} \int_0^t e^{[(Tr-Tb)/14,75]} .dt$$

Où : S = Facteur de sévérité

Tr = Température du procédé (°C)

Tb = Température d'ébullition de l'eau à pression atmosphérique (°C)

t = Temps de rétention (min)

14,75 = Valeur d'énergie d'activation dans les conditions où la cinétique du procédé est d'ordre 1 et obéit à la loi d'Arrhenius

Par la suite, Chornet et al. (1988) ont montré que ce modèle peut être utilisé pour décrire des résultats exposés dans la bibliographie. Ainsi les quantités en sucres C5 obtenues par Belkacemi (1989) et Heitz et al. (1991) sur différents substrats lignocellulosiques peuvent être corrélées au facteur de sévérité. Une étude plus récente (Kaar et al., 1998) a toutefois démontré que le modèle de Chornet et al. (1988) ne peut s'appliquer à tous les substrats. En effet, les rendements en glucose obtenus par l'hydrolyse enzymatique de bagasses de canne à sucre prétraitées ne sont pas constants pour un facteur de sévérité donné, résultats obtenus dans des conditions opératoires différentes.

2.3. Effets physico-chimiques du procédé sur les matériaux lignocellulosiques

Les premières utilisations de la steam explosion pour le prétraitement de la biomasse ont été réalisées au début des années 1980. La société Iotech Corporation fut la première à étudier l'effet de la steam explosion sur du peuplier tremble « *Populus tremula* L. » (Foody, 1980). Les résultats de cette étude montrent que les rendements en glucose et xylose après hydrolyse

dépendent de la pression et du temps de rétention appliqués. Le maximum de rendement pour l'ensemble des monosaccharides (xylose + glucose) a ainsi été obtenu pour une pression de 35 à 40 bars (température : 250°C) et un temps de rétention de 40 secondes.

Une étude a ensuite été menée pour déterminer l'efficacité du traitement de steam explosion sur les taux d'hydrolyse de différents substrats lignocellulosiques (copeaux de bois dur, coques de riz, tiges de maïs et bagasses de canne à sucre) (Schultz et al., 1984). L'application d'un traitement de steam explosion à une pression de 40 bars (250°C) et un temps de rétention de 1 minute permet d'augmenter significativement les taux d'hydrolyse enzymatique des différents substrats étudiés dans des proportions similaires à l'augmentation des taux d'hydrolyse d'une cellulose de référence (papiers filtres) traitée également. Par contre, les rendements d'hydrolyse par voie acide n'ont pas été améliorés par le prétraitement.

Martinez et al. (1990) ont, eux, utilisé comme matières premières de l' « *Onopordum nervosum* L. », une espèce herbacée ligneuse de la péninsule ibérique, et du « *Cyanara cardunculus* L. », un chardon épineux. Les résultats obtenus sur les échantillons d' « *Onopordum n.* » (pression : 30 bars, température : 233°C, temps de rétention : 1 à 2 minutes) et de « *Cyanara c.* » (pression : 20 bars, température : 212°C, temps de rétention : 2 à 4 minutes) ont montré des rendements d'hydrolyse supérieurs à 90%.

L'efficacité du traitement de steam explosion sur les rendements d'hydrolyse enzymatique a également été montrée sur le bois d'eucalyptus par Nunes et Pourquie (1996), sur des copeaux de pins par Martin et al. (1995), sur les pailles de riz par Moniruzzaman et al. (1996) et sur le « *Miscanthus x Giganteus* » par Sorensen et al. (2008).

Wu et al. (1999) ont montré qu'un traitement modéré (facteur de sévérité 3,5) donne le meilleur compromis concernant d'une part, la récupération de sucres de la fraction hémicellulosique et d'autre part, l'amélioration des propriétés d'hydrolyse de la fraction cellulosique. Des études similaires précisent que la récupération des sucres issus de la fraction hémicellulosique diminue avec l'augmentation de la sévérité du traitement. L'effet inverse fut observé pour les propriétés d'hydrolyse de la fraction cellulosique (Wang et al., 2009). Il a également été constaté que, sous conditions relativement modérées (pression 15 à 25 bars : température 200 à 220°C, 1 à 5 minutes), il est possible d'hydrolyser la fraction hémicellulosique et de récupérer des monomères et oligomères d'hémicellulose (Sun et al, 2005).

Sur base d'une étude menée sur une plante vivace herbacée « *Brassica carinata* L. », par Ballesteros et al. (2002), il a été montré que l'efficacité du prétraitement dépend aussi de la granulométrie initiale du substrat prétraité. Les meilleurs rendements d'hydrolyse sont obtenus pour des particules de substrats dont les dimensions sont comprises entre 8 et 12 mm. L'utilisation de particules plus petites n'a pas d'effets significatifs sur l'amélioration du rendement d'hydrolyse.

A l'opposé, Jin et al. (2006) montrent qu'un broyage extrêmement fin (< 1mm) pratiqué sur des particules de paille de riz explosées permet d'accroître significativement les rendements d'hydrolyse.

Plusieurs études ont également été menées pour étudier les possibilités de combiner le prétraitement de steam explosion à d'autres prétraitements chimiques.

Morjanoff et al. (1987) ont été les premiers à montrer que l'addition d'acide sulfurique pendant le prétraitement améliore l'hydrolyse enzymatique et diminue la production d'inhibiteurs tels que les furfurals et hydroxymethylfurfurals. L'étude a montré qu'un

prétraitement de steam explosion d'une durée de 30 secondes à une température de 220°C, appliqué sur les bagasses de canne à sucre (pression : 25 bars) dans l'acide sulfurique à 1% permettait d'accroître significativement les rendements d'hydrolyse et l'efficacité du procédé de steam explosion.

En 1995, Vignon et al. ont également couplé un traitement de steam explosion et une pré-imprégnation d'acide sulfurique à faible concentration (0.1% w/w H₂SO₄). Les auteurs ont montré que les traitements de steam explosion pratiqués à 200 et 210°C ne permettent pas d'obtenir une délignification poussée en raison de la déstructuration insuffisante du matériau. Des températures de 220 à 230°C sont requises pour l'obtention de fibres de cellulose individualisées.

Viola et al. (2008) ont, quant à eux, appliqué sur des algues « *Zostera marina* L.» un traitement de steam explosion à une température de 180°C pendant 300 secondes, combiné à une pré-imprégnation du substrat à l'acide oxalique (2%), ce qui a permis d'accroître significativement les rendements d'hydrolyse de la fraction cellulosique.

Outre la récupération des sucres de la fraction hémicellulosique et l'amélioration des propriétés d'hydrolyse de la fraction cellulosique, la steam explosion a une action importante sur la morphologie et les propriétés physiques du substrat. Plusieurs études montrent qu'il est possible de déstructurer la fibre de cellulose et de produire des microfibrilles à des pressions supérieures à 30 bars et des temps de rétention supérieurs à 15 minutes. Les caractéristiques dimensionnelles des fibrilles obtenues varient avec le temps de rétention. Au plus ce dernier est élevé, au plus les fibrilles produites sont fines et courtes (Wu et al, 1999).

D'autres études mettent l'accent sur une augmentation du degré de cristallinité de la fraction cellulosique pendant la phase de vapocraquage (Excoffier et. al., 1988). Cette hausse de la cristallinité est attribuée à une recristallisation des zones amorphes de la cellulose induite par

le réarrangement des chaînes cellulosiques à haute température et pression. Atalla (1988) a notamment montré qu'un court traitement à haute pression a plus d'impact sur la cristallinité qu'un traitement de longue durée à une pression plus faible.

De récentes études ont également mis en évidence le fait que la steam explosion induit des modifications dans la structure des lignines. En présence d'acides organiques, les groupements hydroxyles des carbones α vont devenir très réactionnels et mener à la formation d'ions carbonium. Deux phénomènes entrent alors en compétition. D'une part, les ions carbonium vont déstabiliser la liaison β -O-4 établie entre les différentes unités phénoliques et induire une dépolymérisation de la lignine. D'autre part, l'ion carbonium va réagir avec les carbones 2 et 6 des cycles benzéniques qui à leur tour vont générer un phénomène de repolymérisation (Sun et al., 2004 ; Li et al., 2007 ; Bonini et al., 2008 ; Li et al., 2009).

Des études indiquent que ces réactions de repolymérisation sont limitées lorsque les paramètres opératoires sont modérés (pression inférieure à 28 bars, temps de rétention inférieur à 2 minutes) (Li et al., 2007, Li et al., 2009).

Dans des conditions plus drastiques, l'ajout d'un inhibiteur compétitif (phénol réactif tel que le 2-naphtol), qui réagit avec l'ion carbonium, va permettre de limiter significativement le phénomène de repolymérisation et d'extraire plus aisément et uniformément la lignine de faible poids moléculaire (Sun et al., 2004).

Enfin, Negro et al (2003) ont montré que l'efficacité du traitement de steam explosion pouvait être évaluée par d'autres méthodes que la mesure des cinétiques d'hydrolyse et la détermination des rendements d'extraction des sucres totaux. L'étude, menée sur « *Pinus pinaster* L. », a identifié que des changements importants de coloration sont engendrés par l'application du prétraitement (diminution de la brillance et des composantes bleu, verte et

rouge de la coloration), Pour des températures modérées (190°C), Ballesteros et al. (2000) imputent un éclaircissement de couleur à l'extraction de la fraction hémicellulosique. Pour les températures plus élevées (> 210°C), Lomax et al. (1994) ont montré que des brunissements pouvaient être imputés aux réactions simultanées de dépolymérisation et de repolymérisation de la lignine.

Une détermination de la composition élémentaire des échantillons traités a également permis à ces auteurs d'observer une diminution des ratios O/C et H/C, en relation avec la température du traitement et la granulométrie du matériau. Cette diminution des ratios est induite par l'apparition de réactions de condensation liées aux modifications des structures des lignines.

Les résultats obtenus indiquent également une amélioration significative des propriétés de rétention d'eau des matériaux prétraités. L'étude a mis en évidence que la désolidarisation des fractions cellulosiques et hémicellulosiques (hydrophiles) et de la lignine (hydrophobe) accroît fortement le nombre de groupement hydroxyle disponible pour réaliser des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau. Les résultats montrent que les propriétés de rétention d'eau sont liées à l'ouverture de la structure du matériau et donc à l'accessibilité de ce dernier. Enfin, une considération économique de la technologie montre que la steam explosion se révèle peu coûteuse et ne présente pas de contraintes environnementales importantes. L'étude économique réalisée sur « *Eucalyptus globulus L.* » par Sawada et al. (2001), qui prend en compte dans son calcul la composition du substrat, les quantités d'eau nécessaires au traitement et la balance énergétique de l'installation, a montré que la steam explosion était le prétraitement le plus avantageux énergétiquement pour réaliser la délignification d'un matériau lignocellulosique.

2.4. Conclusions

Le présent article de synthèse bibliographique, qui vise à présenter les effets de l'application d'un prétraitement de steam explosion sur les matériaux lignocellulosiques, reprend les principes de cette technique et ses effets sur les différentes fractions constitutives de la biomasse.

En premier lieu, la fraction hémicellulosique est facilement hydrolysée suivant l'intensité du prétraitement. Les hémicelluloses sont hydrolysées en oligo ou monosacharrides, produits d'hydrolyse qui peuvent se dégrader en furfural et hydroxyméthyl furfural si les conditions de traitement sont trop sévères.

En second lieu, la steam explosion induit des modifications dans la structure de la lignine. La maîtrise des conditions opératoires et l'ajout de molécules inhibitrices du phénomène de repolymérisation permet de favoriser l'extraction de la lignine.

Cette délignification couplée à l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique va augmenter considérablement l'accessibilité de la fraction cellulosique du matériau avec comme conséquence un accroissement des cinétiques d'hydrolyse de cette fraction.

Enfin, il a été montré que la steam explosion a un impact sur les propriétés physico-chimiques des matériaux lignocellulosiques. La cristallinité de la fraction cellulosique résiduelle est augmentée, ce qui représente un inconvénient de la technique puisque les opérations d'hydrolyse sont généralement plus difficiles pour des taux de cristallinité élevés. La coloration, la composition élémentaire et les propriétés de rétention d'eau des matériaux sont également modifiés par le traitement de steam explosion.

Cependant, une contrainte majeure rencontrée par la technique réside à transposer la technologie en batch, actuellement disponible sur le marché, en une technologie continue. En effet, les installations en batch ne permettent pas de traiter des volumes importants (volume limité par la taille du réacteur) et restent très lourdes d'utilisation. Les systèmes continus, qui

sont actuellement en phase d'industrialisation (Foody et al., 2006), sont basés sur un procédé proche de la steam explosion qui rencontre d'importantes difficultés techniques. L'avenir de la steam explosion passe donc aujourd'hui par le développement de pilotes continus qui pourront être extrapolés et incorporés aux chaînes de production de bioéthanol de seconde génération.

2.5. Références

Atalla R.H., 1988. Structural Transformations in Celluloses. *Proceedings of the International Workshop on Steam Explosion Techniques : Fundamentals and Industrial Applications*, 97-119.

Avella R., Scoditti E., 1998. The Italian Steam Explosion Program At Enea. *Biomass and Bioenergy*, **14**(3), 289-293.

Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros M., 2002. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry*, **38**, 187-192.

Ballesteros I. Oliva J.M., Navarro A.A., GonzSalez A., Carrasco J, Ballesteros M., 2000. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Applied Biochemistry Biotechnology*. **84**, 97-110.

Belkacemi K., 1989. Valorisation des déchets agricoles : tiges de maïs et *Stipa Tenacissima* par voies d'hydrolyse acide et enzymatique. *Thèse de Doctorat : Université de Sherbrooke (Canada)*

Bonini C., D'Auria M., Di Maggio P., Ferri R., 2008. Characterization and degradation of lignin from steam explosion of pine and corn stalk of lignin: The role of superoxide ion and ozone. *Industrial crops and products*, **27**, 182-188.

Brecc K., Vellar A., Glasser W.G., 1998. Steam-assisted biomass fractionation I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass and Bioenergy*, **14**(3), 205-218.

Chornet E., Overend R.P., 1988. Phenomenological Kinetics and Reaction Engineering Aspects of Steam/Aqueous Treatments. *Proceedings of the International Workshop on Steam Explosion Technique : Fundamentals and Industrial Applications*, 21-58.

Excoffier G., Peguy A., Rinaudo M., Vignon M., 1988. Evolution of lignocellulosic components during steam Explosion potential applications. *Proceedings of the international workshop on steam explosion techniques : Fundamentals and Industrial Applications*, 83-95.

Foody B., Anand V., 2006. Continuous flowing pre-treatment system with steam recovery. *World Intellectual Property Organization*, WO2006034590.

Foody P., 1980. Optimization of Steam Explosion Pretreatment. *Final Report to DOE, Contract AC02-79ET23050*.

Grous W.R., Converse A.O., Grethlein H.E., 1986. Effect of Steam Explosion Pretreatment on Pore Size and Enzymatic Hydrolysis of Poplar. *Enzyme and Microbial Technology*, **8**(5), 274-280.

Heitz M., Capek-Menard E., Koeberle P. G., Gagne J., Chornet E., Overend R. P., Taylor J. D., Yu E., 1991. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale : optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresource Technology*, **35**, 23-32.

Holtzapple M.T., Humphrey A.E., Taylor J.D., 1989. Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood. *Biotechnology and Bioengineering*, **33**, 207-210.

Jin S., Chen H., 2006. Superfine grinding of steam-exploded rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, **30**, 225-230.

Kaar W.E., Gutierrez C.V., Kinoshita C.M., 1998. Steam Explosion of Sugarcane Bagasse as a pretreatment for Conversion to Ethanol. *Biomass and Bioenergy*, **14**(3), 277-287.

Li J., Gellerstedt G., Toven K., 2009. Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. *Bioresource Technology*, **100**, 2556-2561.

Li J., Henriksson G., Gellerstedt G., 2007. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource Technology*, **98**, 3061-3068.

Lomax T.D., Mackie K.L., Meder R., Croucher M., Burton R.J., 1994. Steam explosion of *Pinus radiata* bark. *Journal of Wood Chemistry Technology*, **14**, 539-561.

Martin R.S., Perez C., Briones R., 1995. Simultaneous Production of Ethanol And Kraft Pulp From Pine (*Pinus Radiata*) Using Steam Explosion. *Bioresource Technology*, **53**, 217-223.

Martinez J., Negro M.J., Saez F., Manero J., Saez R., Martin C., 1990. Effect of Acid Steam Explosion on Enzymatic Hydrolysis of *O. nervosum* and *C. cardunculus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **24**(25), 127-134.

McMillan J.D., 1994. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In M.E. Himmel, J.O. Baker, R. P. Overend (Eds.). *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, 292-324.

Moniruzzaman M., 1996. Saccharification and Alcohol Fermentation of Steam-Exploded Rice Straw. *Bioresource Technology*, **55**, 111-117.

Morjanoff P.J., Gray P.P., 1987. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 733-741.

Negro M.J., Manzanares P., Oliva J.M., Ballesteros I., Ballesteros M., 2003. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, **25**, 301-308.

Nunes A. P., Pourquie J., 1996. Steam Explosion Pretreatment And Enzymatic Hydrolysis of Eucalyptus Wood. *Bioresource Technology*, **57**, 107-110.

Sawada T., Nakamura Y., 2001. Low Energy Steam Explosion Treatment of Plant Biomass. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **76**, 139-146.

Schultz T.P., Templeton M.C., Biermann C.J., Mc Ginnis G.D., 1984. Steam Explosion of Mixed Hardwood Chips, Rice Hulls, Corn Stalks, and Sugar Cane Bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **32**, 1166-1172.

Sorensen A., Teller P.J., Hilstrom T., Ahring B.K., 2008. Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresource Technology*, **99**, 6602-6607.

Sun X.F., Xu F., Sun R.C., Wang Y.X., Fowler P., Baird M.S., 2004. Characteristics of degraded lignins obtained from steam exploded wheat straw. *Polymer Degradation and Stability*, **86**, 245-256.

Sun X.F., Xu F., Sun R.C., Geng Z.C., Fowler P., Baird M.S., 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, **60**, 15-26.

Vignon M.R., Garcia-Jaldon C., Dupeyre D., 1995. Steam explosion of woody hemp chénevotte. *International Journal of Biological Macromolecules*, **17**(6) 395-404.

Viola E., Cardinale M., Santarcangelo R., Villone A., Zimbardi F., 2008. Ethanol from eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, **32**, 613-618.

Wang K., Jiang J.X., Xu F., Sun R.C., 2009. Influence of steaming explosion time on the physic-chemical properties of cellulose from Lespedeza stalks (Lespedeza crytobotrya). *Bioresource Technology*, **100**, 5288-5294.

Wu M., Chang K., Gregg D., Boussaid A., Beatson R., Saddler J., 1999. Optimization of Steam Explosion to Enhance Hemicellulose Recovery and Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Softwoods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **47**, 77-79.

CHAPITRE III

INFLUENCE OF STEAM EXPLOSION ON THE THERMAL STABILITY OF CELLULOSE FIBER

Adapted from: Nicolas Jacquet, Nicolas Quiévy, Caroline Vanderghem, Sébastien Janas, Christophe Blecker, Bernard Wathelet, Jacques Devaux, Michel Paquot. (2011). Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polymer Degradation and Stability*. **96** 1582-1588.

La synthèse bibliographique montre que la steam explosion induit des phénomènes majeurs au sein de la structure des matériaux lignocellulosiques. La steam explosion a une action marquée sur l'extraction des hémicelluloses ainsi que d'une petite partie de la lignine, ce qui se traduit par un accroissement de l'accessibilité de la fraction cellulosique.

La littérature souligne également que la steam explosion influence spécifiquement les propriétés physico-chimiques de la cellulose notamment en ce qui concerne ses propriétés de cristallinité et de rétention d'eau.

Une partie du travail a donc consisté à améliorer les connaissances relatives à la dégradation thermique de la cellulose car cette dégradation pourrait être l'un des facteurs limitant de la technologie. De plus, il ressort de la synthèse bibliographique que cet aspect a été très peu abordé.

Etant de surcroît un facteur limitant de la technologie de steam explosion, il s'est donc révélé judicieux d'initier l'étude sur la cellulose modèle par une approche axée sur la dégradation thermique en fonction de l'intensité du prétraitement appliqué.

Le chapitre III détaille les résultats de cette étude. La première partie du chapitre illustre la théorie relative à la dégradation thermique de la cellulose, phénomène complexe qui induit différentes réactions parallèles. Le chapitre III présente ensuite le modèle de calcul du facteur de sévérité que nous avons adapté en vue d'étendre la notion du calcul du facteur de sévérité à l'échelle du matériel pilote. Le chapitre se poursuit par la présentation des résultats relatifs à la dégradation thermique et à la formation d'inhibiteur de fermentation tels que les furfurals et hydroxyméthyl-furfurals. Enfin, la dernière partie du chapitre aborde l'élaboration d'un modèle de prédiction de la dégradation thermique de la cellulose en fonction de la sévérité du prétraitement appliqué.

Abstract

The aim of the present study was to compare the effect of different steam explosion treatments on the thermal degradation of a bleached cellulose. The intensity of a steam explosion treatment, which allows to breakdown the structural lignocellulosic material was estimated by a severity factor, determined by a correlation between time and temperature of the process.

Results of this study showed that thermal degradation of cellulose fibers was limited when the severity factor applied was below 4.0 (theoretically equivalent to: 220 °C; 3.30 min). For higher intensities, determination of the degradation products in the water-soluble extract showed an important increase of the 5-hydroxymethylfurfural concentration with the temperature. When the severity factor reached 5.2. (theoretically equivalent to: 260 °C; 3.30 min), TGA analysis showed that the increase of degradation products was coupled to an increase of the char level meaning a strong degradation of the cellulose. dTGA behaviour also showed that thermal stability of the steam explosion samples decreased with the intensity of the treatment. To conclude, a theoretical diagram predicting the degradation of the cellulose during the steam explosion treatment was established.

Keywords

Steam Explosion, Microcrystalline cellulose, Degradation mechanism, Hydroxymethylfurfural.

3.1. Introduction

In the economic and energetic context of our society, it is universally recognized that an alternative to fossil fuels will be needed in the nearest future. A potential solution is to develop second-generation bioethanol that utilizes non-food plant materials. The major component of these materials is lignocellulose, which is a complex composed of widely available biological polymers such as cellulose, hemicelluloses and lignin [1].

The economic feasibility of second-generation bioethanol production from lignocellulosic components depends on the ability to perform a complete fractionation of the biomass. Research has been conducted on a large number of fractionation processes and recent review articles have shown that steam-explosion offers several attractive features when compared to other fractionation technologies [2-3]. The advantages include the potential for significantly lower environmental impact, lower capital investment, more potential for energy efficiency, and fewer hazardous process chemicals and conditions. Steam explosion also presents the possibility of using a large chip size and limiting the use of acid [4].

Steam explosion is a thermo-mechano-chemical process which allows the breakdown of lignocellulosic structural components by steam heating, hydrolysis of glycosidic bonds by the organic acid formed during the process and by shearing forces due to the vaporization and expansion of moisture. The process is composed of two distinct stages: vapocracking and explosive decompression [4-5]. Cumulative effects of both stages include modification of the physical properties of the material (specific surface area, water retention capacities, colour, cellulose crystallinity index...), hydrolysis of hemicellulosic components (mono and oligosaccharides released) and modification of the chemical structure of lignin [6]. These effects allow the opening of the lignocellulosic structures and increase the enzymatic hydrolysis yield of cellulose components in the aim to obtain fermentable sugars for use in the second generation biofuel process [7].

Generally, steam explosion processes occurs at temperatures between 200°C and 280°C (pressure: 15 to 60 bars) for retention times varying from 2 to 10 minutes. At these conditions, thermal degradation of cellulose can take place [8].

Thermal degradation of cellulose was studied by Arseneau [9], Broido and Nelson [10], Bradbury et al. [11], and Shafizadeh [12]. The hypothesis proposed by these authors is that the degradation mechanisms implicate different parallel reactions [9-12]. The first one is a dehydration reaction which is conducting to the production of anhydrocellulose and leads to the decomposition of the anhydrocellulose to carbonaceous residues (char). The second reaction implies an active depolymerizing of cellulose. This reaction leads to anhydrosugar intermediaries (tars), especially levoglucosan (LG) [8]. Several authors have shown that intermediates products are involved in thermal secondary decomposition involving the formation of different degradation products such as Hydroacetaldehyde (HAA), Hydroxyacetone (HA), 5 Hydroxymethyl-Furfural (5-HMF) and Furfural (2F). These authors have also shown that HAA, HA and 5-HMF could be produced at high temperature ($T^{\circ} > 300^{\circ}\text{C}$) by the direct ring-opening and rearrangement reactions of cellulose unit molecules [12-17].

Several studies have shown that degradation products must be limited because they are strong inhibitors of downstream processes such as fermentation [3]. In the case of steam explosion, the process temperature favours dehydration reactions leading to char and the decomposition of anhydrosugar intermediates, mainly 5-HMF. According to Shen and Gun (2009), 2F is produced from the secondary reaction of 5-HMF [17]. Fig. 9 summarize the chemical pathways of cellulose degradation which are generally presented in different literature data [8,17].

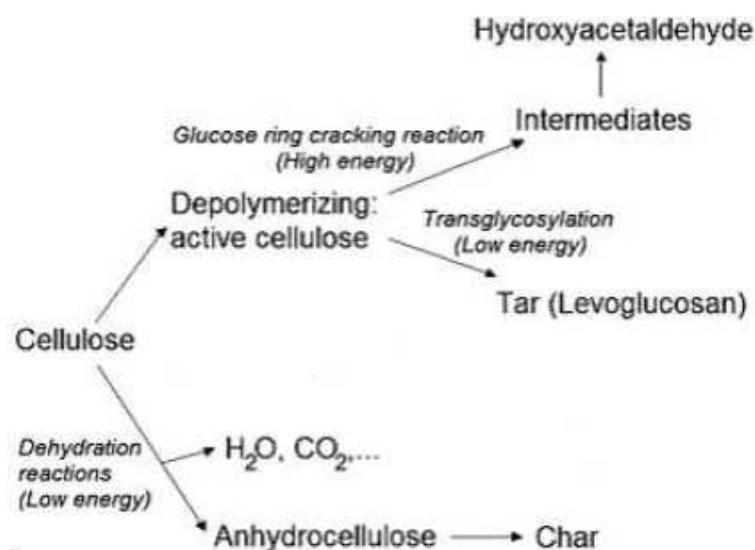


Fig. 1. Speculative chemical pathways for the direct conversion of the cellulose molecules (adapted from [7])

In this paper, the thermal degradation of cellulose fibers induced by steam-explosion treatment was studied. Links between thermogravimetric analysis (TGA) observations and the thermal degradation mechanism were established. In addition to the thermal degradation study, the amount of 5-HMF and 2F products were determined in order to detect the formation of these fermentations inhibitors during the treatment. Finally, the impact of different steam explosion treatments were investigated in order to identify the critical parameters (temperature and retention time) conducive to minimizing the thermal degradation of cellulose and the formation of inhibitors products.

3.2. Material and Methods

3.2.1. Material

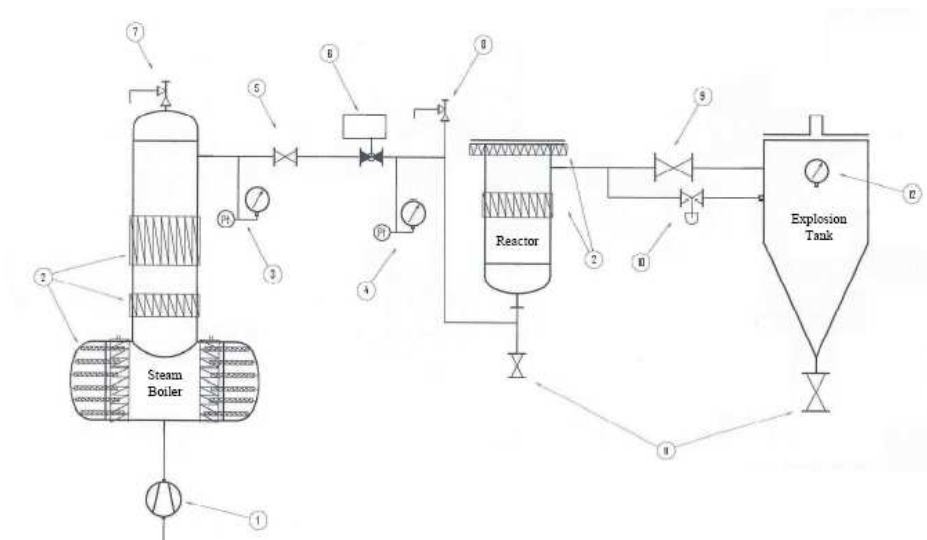
The sample tested in this study is a microcrystalline cellulose purchased from Mikro-technik GmbH under the trade name of Alba-fibre C200. This commercial product is a bleached cellulose obtained from wood pulp and purified from hemicelluloses and lignins. The average

fiber size is around 200 μm length with a diameter of 30 μm . Its apparent density is between 120-150 g/dm^3 with a moisture content of at least 8%.

3.2.2. Methods

3.2.2.1. Steam explosion treatment

Treatment of cellulose fibers was carried out in a steam explosion pilotscale equipment, designed in the department of Industrial Biological Chemistry - ULG - Gembloux Agro-Bio Tech (Fig. 2). This steam explosion prototype consists of a steam generator (operating pressure : 6.0 Mpa), a 50 liters vessel designed to reach a maximum operating pressure of 5.1 Mpa and a cyclone explosion tank, where the exploded product is recovered. A quick-opening ball valve, placed between the vessel and the explosion cyclone tank, is used to release quickly the pressure and give the explosion effect.



1. High pressure pump, 2. Heaters, 3. Gauges of steam boilers, 4. Gauges of reactor, 5. Isolation valve 6. Charging valve, 7. Safety steam boiler valve, 8. Safety reactor valve, 9. Explosion valve, 10. Purge valve, 11. Recovery valves, 12. Gauge of explosion tank

Fig. 2. ULG - Gembloux Agro-Bio Tech steam explosion pilot plan

Steam explosion runs were carried out using the same amount of cellulose fibers (500 g of dry matter). After placing the material, the combination of steam pressure (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 Mpa) and retention time (2 and 5 minutes) were adjusted to the desired treatment conditions. Counting the retention time was started when the vessel reached 96 % of the target pressure.

After the treatment, the exploded material was cooled to about 30°C and was centrifuged to recover the liquid and solid parts. The solid fraction was water-washed and used for TGA analysis. The water-soluble extract was analyzed by HPLC to determine the 5-HMF and 2F products.

3.2.2.2. Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analyses were performed on a Mettler Toledo TGA/SDTA 851e under nitrogen (50 ml/min). Samples were heated from 30 to 600°C at a heating rate of 20°C/min. The mass of the sample ranged from 5 to 10 mg depending on the experiment. Analyses were performed in triplicate. Standard deviations were comprised between 0,2 and 0,3 % for dTGA analyses and < 0,02 %/°C.

Beforehand, the impacts of different initial masses of the sample were checked (results not shown). 5 and 10 mg of sample mass did not influence the relative amount of carbonaceous residues at the end of the pyrolysis meaning that quantitative analysis of the char can be performed [7].

3.2.2.3. Furfural (2F) and 5-hydroxymethyl-furfural (5-HMF) determination by HPLC

The method was adapted from the method of Zappalà et al. [18]. Five grams of sample were diluted up to 50ml with distilled water, filtered on 0.45µm filter and 20µl were injected in a HPLC Waters equipped with a Diode Array Detector (Waters 2690 Separation Module,

Waters 996 Photodiode Array Detector). The HPLC column was an Agilent Zorbax 300SB-C18 4.6x150mm, 5 μ m. The column temperature was 30°C. The solvent A was 90% water at 1% acetic acid and 10% methanol and solvent B was CH₃CN (HPLC grade solvents). The gradient was as follow : 0-5 min 0% B, 5-10 min linear gradient up to 100% B, 10-15 min 100% B, 15-20 min linear gradient down to 0% B, 20-30' 0% B. Calibration was made with 4 solutions containing 2-furaldehyde (2F, Acros organic, ref.181100250) and 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde (5-HMF, Acros organic, ref.121460010) with concentrations of 0.16, 0.8, 4 and 20 μ g/ml H₂O. Detection was made at 284 nm and purity was controlled with the diode array spectrum. The retention times were 2.9 min for 5-HMF and 3.4 min for 2F. HMF and 2F analysis were performed in triplicate.

3.3. Results

The best experimental conditions, that limit thermal degradation of cellulose fibers, were determined on the basis of different treatment severities.

Several studies have shown that treatment severity is determined by a correlation between temperature process and retention time. Concerning this point, Chornet and Overend (1988) have elaborated a model that describes the treatment severity. This model is based on the hypothesis that process kinetics are of first order and obey to Arrhenius law [19].

$$S = \text{Log}_{10} \int_0^t \exp \left(\frac{T(t)-100}{14,75} \right) . dt$$

Where: S = Severity Factor

$T(t)$ = Process temperature (°C)

t = Retention time (min)

14,75 = Activation energy value in the conditions where process kinetics are of first order and obey to Arrhenius law

When the volume of the steam explosion reactor is small, the steam pressure can reach the target value in a very short time. In this case, the severity factor can be calculated by the following equation:

$$S = \text{Log}_{10}[t \cdot \exp(\frac{T-100}{14,75})]$$

where T is the process temperature (°C) [20].

After considering the efficiency of our pilot-scale steam-explosion plant of 50 liters, it was shown that approximately 10 to 25 minutes (demand time) was required to reach the different target pressures. In these cases, the treatment severity must include the time necessary to reach the target pressure and the severity factor is calculated by the integral form

$$S = \text{Log}_{10} \int_{t_2}^{t_1} \exp(\frac{T(t)-100}{14,75}) dt$$

where t_1 and t_2 are the time at the start and the end of reaction respectively.

If we take the hypothesis which assumes that the temperature increases linearly with every increment in pressure (0,1 Mpa), the severity factor can be calculated by the following integral form:

$$S = \text{Log}_{10} \sum \int_{t_n}^{t_{n+1}} \exp(\frac{T_n + (\frac{T_{n+1}-T_n}{t_{n+1}-t_n})(t-t_n) - 100}{14,75}) dt$$

Or the equation:

$$S = \text{Log}_{10} \sum \frac{14,75(t_{n+1}-t_n)}{(T_{n+1}-T_n)} [\exp(\frac{T_{n+1}-100}{14,75}) - \exp(\frac{T_n-100}{14,75})] \quad (\text{Eq. 1})$$

where t_n and t_{n+1} are the initial times for increments n and $n + 1$, and T_n and T_{n+1} are the process temperatures for times t_n and t_{n+1} respectively [21].

Severity factor (SF) of each steam explosion treatment applied are reported in Table 1 with the corresponding process pressures (Mpa) and temperatures (°C) and the different time

settings (retention time and demand time and theoretical equivalent time). Results of equation (Eq. 1) showed that severity factor values increased with the temperature and retention time set.

Table 1. Pressure, temperature, retention time, demand time and severity factor applied for steam explosion treatments applied

Samples Name	Pressure (Mpa)	Process temperature (°C)	Retention Time (min)	Demand Time (min)	Severity Factor	Theoretical equivalent Time (min)
C200 (SF 2.62)	0.98	172.8	2.03	11.16	2.62	3.00
C200 (SF 2.86)	0.99	174.1	5.00	13.33	2.86	4.77
C200 (SF 3.75)	1.96	208.5	1.59	12.13	3.75	3.59
C200 (SF 4.00)	2.05	209.5	5.03	15.03	4.00	5.97
C200 (SF 4.40)	2.95	228.9	2.02	16.20	4.40	4.02
C200 (SF 4.63)	3.00	229.7	4.59	19.36	4.63	6.47
C200 (SF 4.91)	3.94	246.3	2.04	17.97	4.91	4.00
C200 (SF 5.14)	4.02	247.1	4.58	20.51	5.14	6.44
C200 (SF 5.33)	5.33	259.0	2.01	20.01	5.33	4.45
C200 (SF 5.56)	4.98	260.1	5.02	23.32	5.56	7.02

The thermal stability of the different solid fraction obtained for each steam explosion treatment was evaluated by TGA. Fig. 3 presents the thermal behaviour of steam exploded samples obtained for each severity factor.

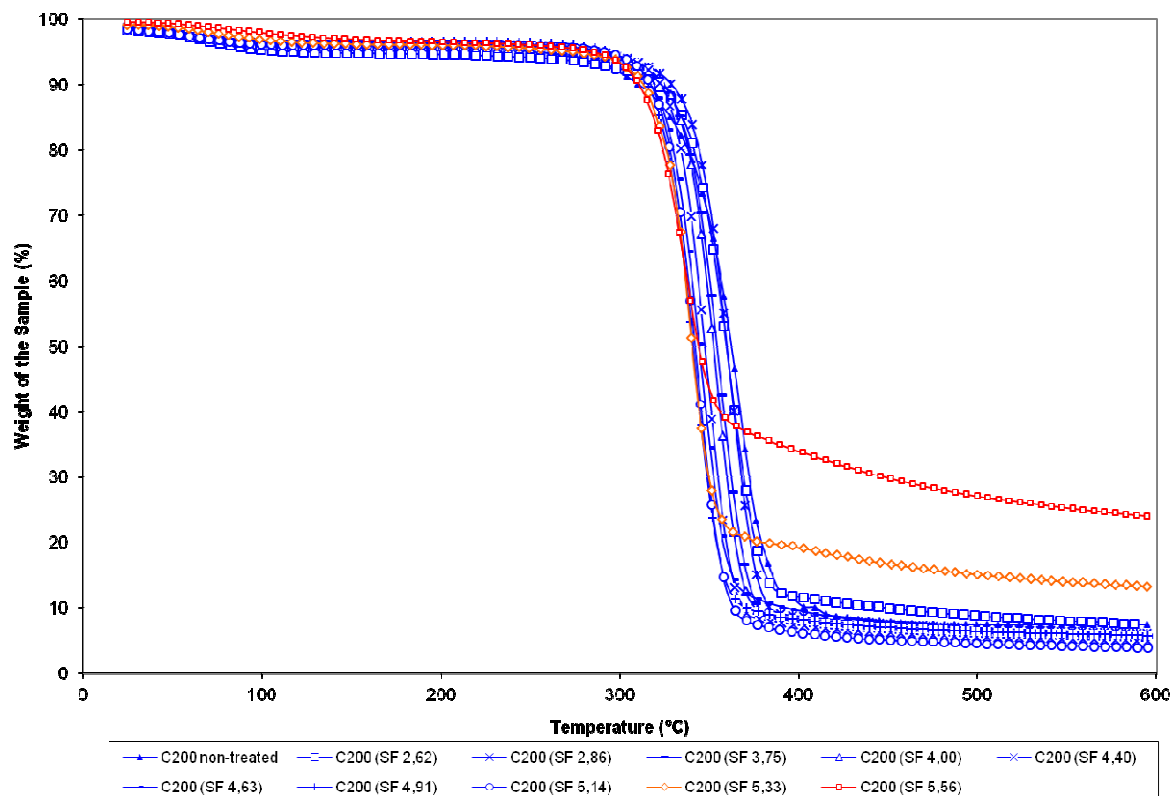


Fig. 3: TGA evolution of steam exploded C200 with severity factor at 20°C/min (Standard Deviation < 0,3 %)

Analysis of the thermal behaviour showed that mass loss of steam exploded samples started at lower temperature than non-treated cellulose C200 in particular for the high severity factor. The first deflection observed around 70°C, for each steam exploded samples, corresponded to the evaporation of free water. The carbonaceous residues at the end of the pyrolysis (char) were similar (7 to 10 %) for the standard cellulose and the treated cellulose obtained at a severity factor below 5.2. For higher treatment severity, the char level was more important. 13 % for C200(SF 5.33), and 24 % for C200(SF 5.56) compared to standard cellulose C200.

In parallel, the derivative of the thermogravimetric analysis (dTGA), presented in Fig. 4, showed that the main peak of the cellulose degradation decreased with the treatment severity. The main peak is located around 370°C for the standard cellulose C200, 360°C for the treated

samples with a severity factor between 2.5 and 3.5, 350°C for a severity factor between 3.5 and 4.5, 340°C for a severity factor between 4.5 and 5.2 and 330°C for treated sample with a severity factor higher than 5.2.

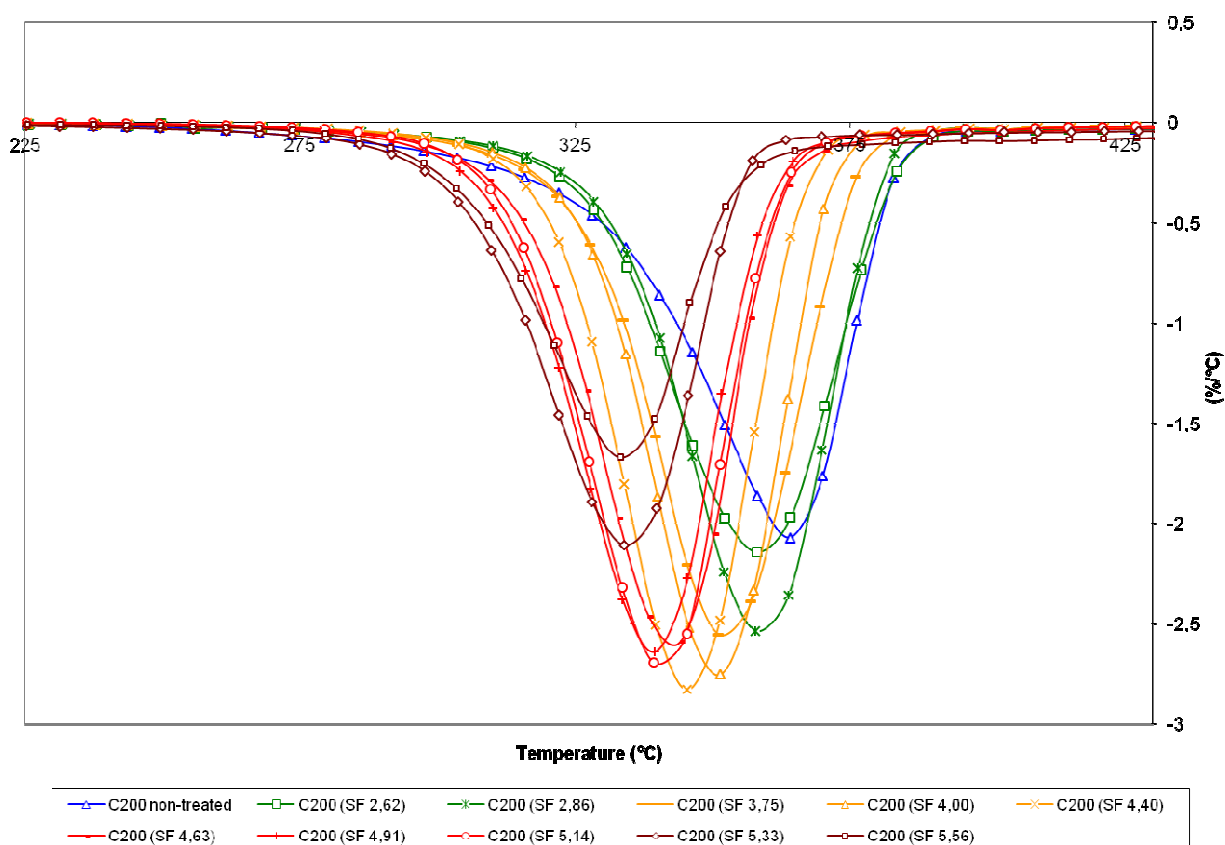


Fig. 4: dTGA curves of steam exploded C200 at 20°C/min (standard deviation < 0,02 %/°C)

In order to understand the decrease of the thermal stability of the different cellulose samples, degradation products released during the steam explosion treatment were analyzed by HPLC. Fig. 5 presents an evolution of 5-HMF and 2F in the water-soluble extract in relation to the severity factor applied. Results are expressed in percent of cellulose dry weight.

Results show that degradation products (5-HMF and 2F) were not present in the water-soluble extract when the severity factor was below 4.0. For severity factor above 4, an exponential increase of 5-HMF concentration was highlighted. The amount of HMF in water-soluble

extracts is 0.1 % of cellulose dry weight for C200(SF 4.40), 0.4 % for C200(SF 4.63), 1.3 % for C200(SF 4.91), 3.1% for C200(SF 5.14); 5.3% for C200(SF 5.33) and 9.0 % for C200(SF 5.56). In parallel, quantities of 2F increased slowly with the severity of the treatment.

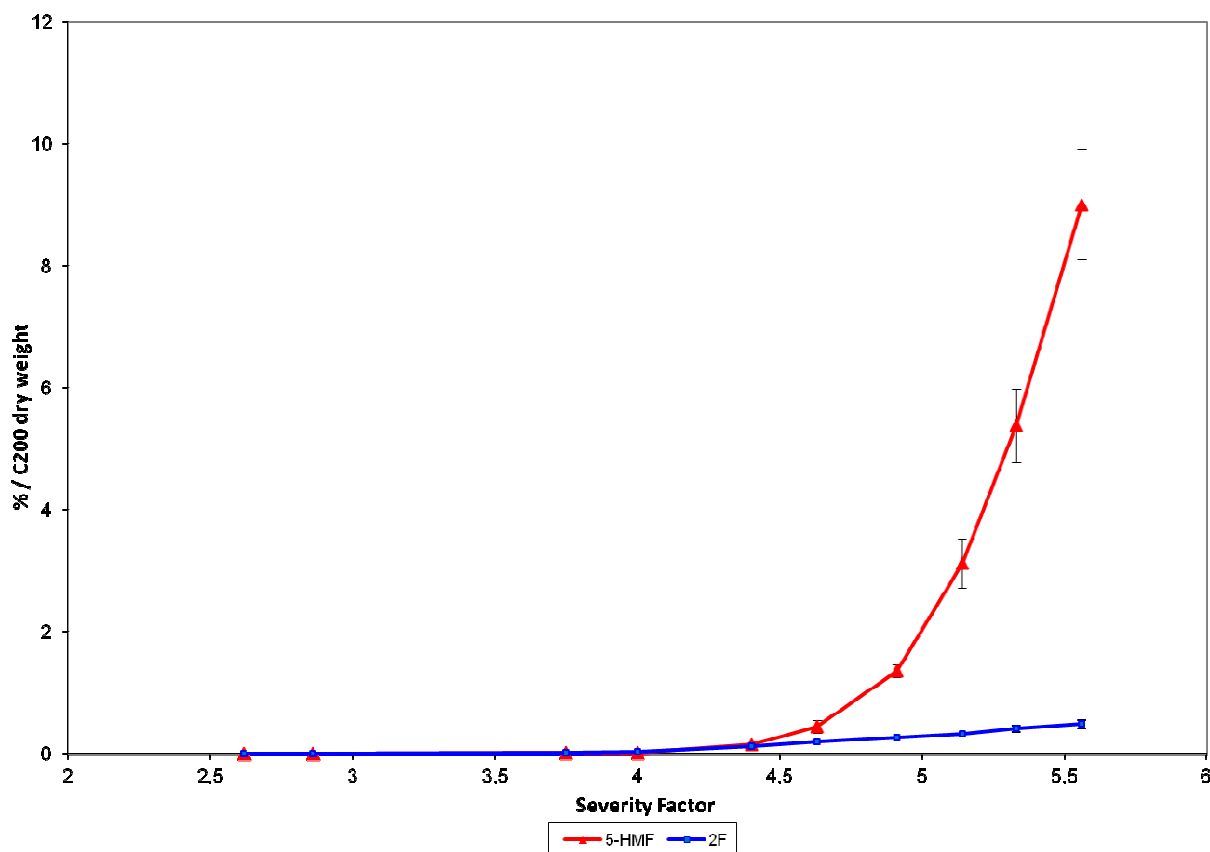


Fig. 5: Evolution of 5-HMF and 2F in relation to the severity factor

3.4. Discussion

TGA experiments and analysis of degradation products showed that the steam explosion treatment severity played a role in the thermal degradation of cellulose. Observations made can be linked and explained by the thermal degradation mechanism presented in Fig. 1. These models indicate two competitive reactions for the cellulose degradation. The first one consists mainly in dehydration. The other one, the so-called “depolymerization” (chain scission), is followed by formation of tars or glucose ring cracking reaction. In the case of steam

explosion, the glucose ring cracking reaction is not significant compared to depolymerization because it requires high heating rates ($> 300^{\circ}\text{C}$) [8].

When the severity factor is below 4.0, results showed that the thermal degradation of cellulose was still limited. Degradation products were not detected by HPLC assay and char level at the end of the pyrolysis was similar to the standard cellulose. Nevertheless dTGA behaviour showed that the thermal degradation phenomenon of cellulose was initiated at a much lower temperature (360°C), indicating a slight decrease of the thermal stability [22].

For a severity factor between 4.0 and 5.2, results indicated an increase of 5-HMF in the water soluble extract resulting from the secondary decomposition of tars (Fig.2), following to the active depolymerization of the cellulose [12-17]. However, char level at the end of the pyrolysis stayed similar to the standard cellulose. These results confirmed that the depolymerization mechanism is favored over the dehydration reaction in this severity factor range.

In parallel, temperature peaks of dTGA behaviour continued to decrease ($340 - 350^{\circ}\text{C}$) which confirmed that thermal stability of the cellulose decreased with the intensity of the treatment. This decrease of stability is an important finding because it may lead to an early thermal degradation of cellulose in downstream processes where high temperatures are applied, especially in the case of the developpement of new composite materials based on cellulose [23].

For a severity factor higher than 5.2, the dehydration reactions led to anhydrocellulose formation which induced an increase of char level as observed on the TGA curves. 5-HMF

production was enhanced and confirmed that the two competitive mechanisms of degradation were initiated.

With respect to furfural, HPLC assays showed a slight increase of quantities of 2F with the increase of treatment severity. These low concentration in furfural are explained by the use of a microcrystalline cellulose purified from hemicelluloses and lignins. According to the literature, furfural is produced mainly by C5 from hemicelluloses [24]. 2F detected in this study came only from the decomposition reaction of 5-HMF as described by Shen and Gu and stayed limited [17].

From the combination of the different results obtained and the model developed by Chornet et Overend, a theoretical scheme was developed (Fig 6.) showing the evolution the of thermal degradation mechanism of cellulose with the process temperature and retention time.

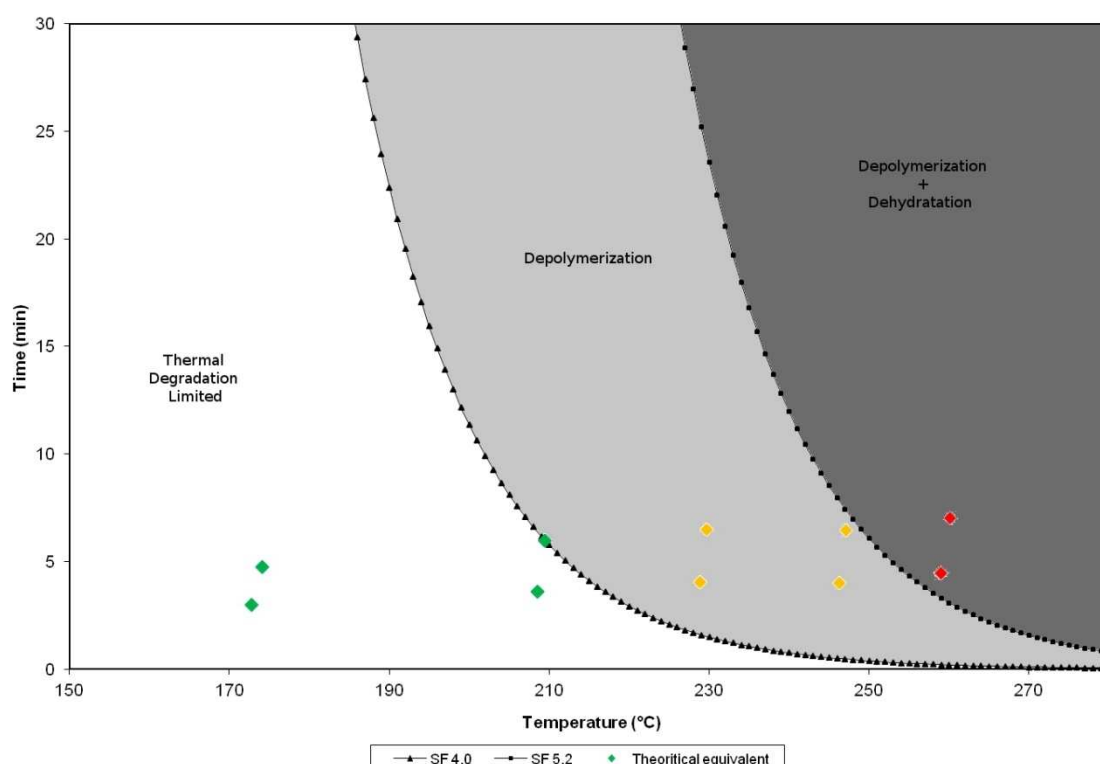


Fig. 6: Evolution of thermal degradation phenomenon of cellulose with temperature and retention time

This theoretical scheme could only be elaborated with the hypothesis that the steam pressure reached the target value in a very short time. The following equation was then used:

$$S = \text{Log}_{10}[t \cdot \exp(\frac{T-100}{14,75})]$$

To establish the scheme, severity factor was fixed at 4.0 and 5.2. which corresponded respectively to values where depolymerization reaction and dehydration were initiated. Equation results allowed to determine critical couple temperature / retention time where thermal degradation began and predicted the degradation mechanism which occurred for any temperature and retention time applied during the steam explosion treatment.

3.5. Conclusions

In this study, intensity of the steam explosion treatment was characterized by a severity factor, established on base of the temperature and the time needed to realise the treatment.

Results obtained shows that the intensity of steam explosion treatment had an influence on the thermal degradation of cellulose.

Result showed that thermal degradation of cellulose was limited when the severity factor of the treatment was below 4.0. In this case, carbonaceous residues and fermentation inhibitor like 5-HMF were not detected in the treated sample. For a severity factor between 4.0 and 5.2, the thermal degradation mechanism was initiated. Quantities of 5-HMF in the water-soluble extract increased with the increasing of the severity factor consecutive to an active depolymerization of the cellulose. For higher treatment intensities, carbonaceous residues increased indicating that dehydration reaction occurred, which confirmed the strong degradation of the cellulose. dTGA behaviour also showed that thermal stability of cellulose decreased significantly with the treatment intensity.

To conclude, a theoretical diagram of cellulose degradation during the treatment was established. This diagram allowed to identify the treatment conditions which minimized the degradation of cellulose and limited the formation of inhibitors products like 5-HMF.

3.6. Acknowledgements

Authors are grateful for the financial support of the Walloon Region in the frame of the LIGNOFUEL program (convention n°716721) and TECHNOSE program (convention n°716757). Mr Meyer Frederic and Mrs Doran Lynn are acknowledged for excellent assistance.

3.7. References

1. Wang K., Jiang J.X., Xu F., Sun R.C. Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (*Lespedeza crytobotrya*): Part 1. Characteristics of degraded cellulose. *Polym Degrad Stab* 2009;94(9):1379–1388
2. Galbe, M., Zacchi, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007;108:41-65
3. 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* 2010 ;101(13):4851–4861
4. Avellar B.K., Glasser W.G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass Bioenergy* 1998;14(3):205–218
5. Jacquet N., Vanderghem C., Blecker C., Paquot M. La steam explosion : Application en tant que prétraitement et effet sur la matière lignocellulosique. *BASE* 2010;14(S2):561-566
6. Sun X.F., Xu F., Sun R.C., Wang Y.X., Fowler P., Baird M.S. Characteristics of degraded lignins obtained from steam exploded wheat straw. *Polymer Degradation and Stability* 2004; 86: 245-256.

7. Sun X.F., Xu F., Sun R.C., Geng Z.C., Fowler P., Baird M.S. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydr Polym* 2005; 60(1):15-26
8. Quiévy N., Jacquet N., Sclavons M., Deroanne C., Paquot M., Devaux J. Influence of homogenization and drying on the thermal stability of microfibrillated cellulose. *Polym Degrad Stab* 2009;95:306-314
9. Arseneau D. F. Competitive reactions in the thermal decomposition of cellulose. *Can J Chem* 1971;49(4):632-638
10. Broido A, Nelson M A. Char yield on pyrolysis of cellulose. *Combust Flame* 1975;24:263-268
11. Bradbury A.G.W., Sakai Y, Shafizadeh F. A kinetic model for pyrolysis of cellulose. *J Appl Polym Sci* 1979;23(11):3271-3280
12. Shafizadeh F., Lai Y.Z. Thermal degradation of 1,6-anhydro- β -Dglucopyranose. *J Org Chem* 1972;37(2):278-284
13. Piskorz J., Radlein D., Scott D.S. On the mechanism of the rapid pyrolysis of cellulose. *J Anal Appl Pyrolysis* 1986;9(2):121-137
14. Li S., Lyons-Hart J., Banyasz J., Shafer K. Real-time evolved gas analysis by FTIR method: an experimental study of cellulose pyrolysis. *Fuel* 2001;80(12):1809-1817

15. Hosoya T., Kawamoto, H., Saka, S. Different pyrolytic pathways of levoglucosan in vapor- and liquid/solid-phases. *J Anal Appl Pyrolysis* 2008;83(1):64-70
16. Kawamoto K., Morisaki H., Saka S. Secondary decomposition of levoglucosan in pyrolytic production from cellulosic biomass. *J Anal Appl Pyrolysis* 2008;85(1-2):247-251
17. Shen D.K., Gu S. The mechanism for thermal decomposition of cellulose and its main products. *Bioresour Technol* 2009;100(24):6496–6504
18. Zappalà M., Fallico B., Arena E., Verzera A. Method for the determination of HMF in honey : a comparison. *Food Control* 2003;16(3),273-277
19. Chornet E., Overend R.P. Phenomenological Kinetics and Reaction Engineering Aspects of Steam/Aqueous Treatments. *Proceedings of the International Workshop on Steam Explosion Techniques, Fundamentals and Industrial Applications* 1988:21-58
20. Overend R.P., Chornet E., Gascoigne J.A.. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos Trans R Soc Lond A* 1987.321(1561):523-536.
21. Li H. , Chen H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochem* 2008;43(12):1447-1451

22. George J., Ramana K.V., Bawa A.S.. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. *Int J Biol Macromol* 2011;48(1):50-57
23. De la Orden M.U., Sánchez C.G., Quesada M.G., Urreaga J.M. Effect of different coupling agents on the browning of cellulose–polypropylene composites during melt processing. *Polym Degrad Stab* 2010;95(2):201-206
24. Riansa-Ngawong W., Prasertsan P. Optimization of furfural production from hemicellulose extracted from delignified palm pressed fiber using a two-stage process. *Carbohydr. Res.* 2011;346(1):103-110.

CHAPITRE IV

INFLUENCE OF STEAM EXPLOSION ON PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND HYDROLYSIS YIELD OF PURE CELLULOSE FIBERS

Adapted from: Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Sabine Danthine, Nicolas Quiévy, Christophe Blecker, Jacques Devaux, Michel Paquot. (2012). Influence of steam explosion on physico-chemical properties and hydrolysis yield of pure cellulose fibers. *Bioresource Technology*. Volume **121**(10), 221-227.

L'étude sur la dégradation thermique finalisée, le travail s'est orienté vers l'étude de l'évolution des paramètres physico-chimiques de la cellulose modèle en fonction de l'intensité des prétraitements appliqués.

Des liens ont ainsi été établis entre les rendements d'hydrolyse observés, les propriétés physico-chimiques de la cellulose et la dégradation thermique de cette dernière. Des analogies et des différences de comportement entre les matériaux complexes et les celluloses modèles ont été mises en évidence.

Le chapitre IV présente dans un premier temps un rappel des différentes études récentes menées sur l'amélioration des rendements d'hydrolyse par voie enzymatique de la cellulose des matériaux lignocellulosiques complexes, après l'application d'un prétraitement de steam explosion.

Les résultats relatifs à l'hydrolyse de la cellulose modèle sont ensuite présentés. Des liens entre l'évolution de ces rendements d'hydrolyse et les propriétés physico-chimiques de la cellulose (cristallinité et rétention d'eau) ont été établis. Il faut cependant noter que les rendements d'hydrolyse enzymatique ont été établis sur base des quantités de glucose et de cellobiose formées en cours d'hydrolyse. Les différents oligosacharrides d'un degré de polymérisation plus élevé (plus difficilement quantifiables) n'ont pas été pris en compte.

Enfin, la fin du chapitre inclut dans la réflexion le rôle de la dégradation thermique de la cellulose pour les prétraitements les plus drastiques.

Abstract

The aim of this study is to compare the effect of different steam explosion treatments on the physicochemical properties and the hydrolysis yield of a pure bleached cellulose. The results showed that moderate steam explosion treatments (severity factor below 5.2) did not appear to improve the enzymatic hydrolysis yield of the cellulose fibers. However, characterization of the samples showed a modification of the physicochemical properties of the cellulose, resulting in an increase of the water retention values (WRV) coupled to an increase of the overall crystallinity. For higher treatment intensities, an important thermal degradation of the cellulose was highlighted. This thermal degradation caused an important modification of the cellulose composition which leads to a decrease of the hydrolysis yield.

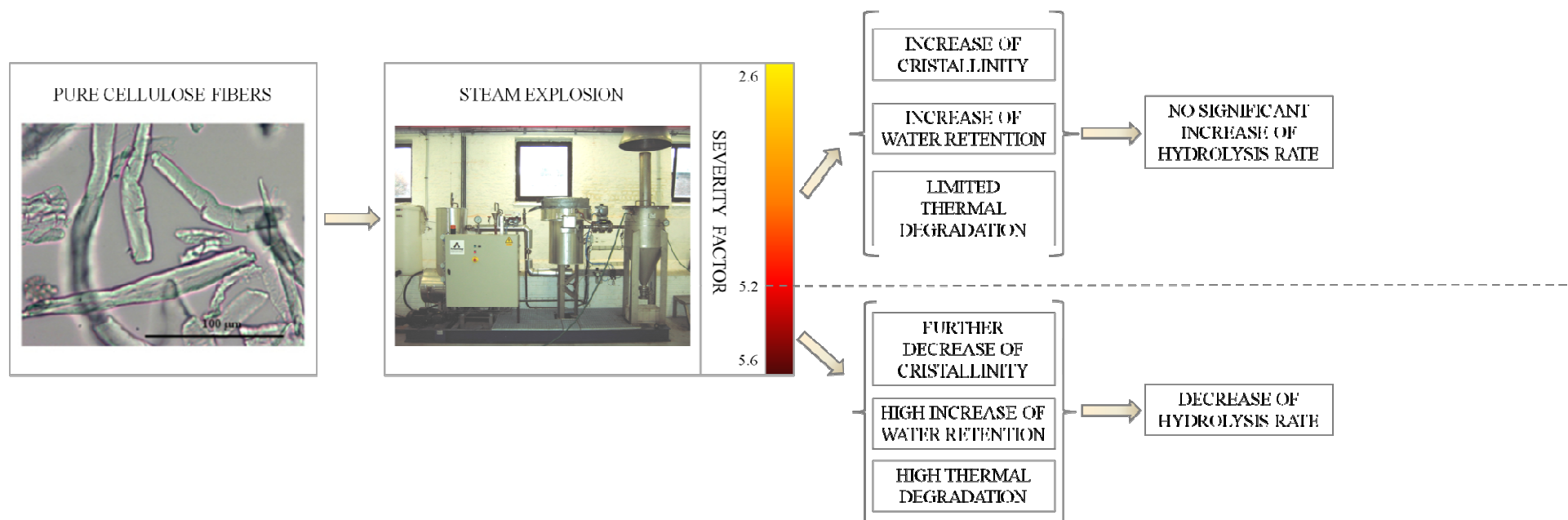
Keywords

Steam Explosion, Microcrystalline Cellulose, Hydrolysis, Crystallinity, Water retention.

Highlights

- The study shows the impact of steam explosion on the hydrolysis of cellulose fiber.
- The steam explosion treatment affected the physicochemical properties of cellulose.
- The links between crystallinity, water retention and hydrolysis were established.
- For high treatment intensities, thermal degradation impacts the hydrolysis yield.

Graphical Abstract



4.1. Introduction

In the current energy context, many studies show that biomass can be used as raw materials to produce second generation biofuels (Chun and Keat, 2011; Sarkar et al., 2012; Zhu and Zhuang, 2012). The economic feasibility of second-generation biofuels production from lignocellulosic components depends on the ability to perform a complete fractionation of the biomass, which is composed of biological polymers such as cellulose, hemicelluloses and lignin (Wang et al., 2009). To achieve this goal, materials must be subjected to a pretreatment.

Research has been conducted on a large number of pretreatment processes (Avellar and Glasser, 1998; Galbe and Zacchi 2007; Alvira et al., 2010) and showed that steam-explosion offers several attractive features when compared to other fractionation technologies: lower environmental impact, lower capital investment, more potential for energy efficiency, fewer hazardous process chemicals and conditions, possibility of using a large chip size, etc.

Steam explosion allows the breakdown of biomass components by steam heating, shearing forces due to the expansion of moisture and hydrolysis of glycosidic bonds by the organic acid formed during the process (Avellar and Glasser, 1998; Jacquet et al., 2010).

Many studies confirm that steam explosion treatment leads to the opening of lignocellulosic structures, the modification of the physical properties of the material (specific surface area, water retention capacities, colour...), and increases the enzymatic hydrolysis yield of cellulose components. Schultz et al. (1984) have shown that a steam explosion treatment, applied at a pressure of 40 bar and a retention time of 1 minute can significantly increase the enzymatic hydrolysis yield of cellulose components for various biomass (hardwood chips, rice hulls, corn stalks and sugarcane bagasse).

Martinez et al. (1990) used *Onopordum nervosum* L. and *Cyanara cardunculus* L. as raw materials. Increase of hydrolysis yields above 90% was observed for samples of *Onopordum*

nervosum L. pretreated at a pressure of 30 bars and a retention time of 1 to 2 minutes and *Cyanara cardunculus* L. pretreated at 20 bars for a retention time of 2 to 4 minutes.

The effectiveness of steam explosion treatment on the yield of enzymatic cellulose hydrolysis was also shown on eucalyptus wood by Nunes and Pourquié (1996), pine chips by Martin et al. (1995), rice straw by Moniruzzaman et al. (1996), olive stones by Fernandez-Bolanos et al. (2001), *Pinus Pinaster* Wood by Negro et al. (2003), *Miscanthus x Giganteus* by Sorensen et al. (2008) and spent Shiitake mushroom media by Chikako et al. (2011).

All these studies incontestably show the impact of steam explosion on the cellulose hydrolysis yields of complex biomass, but none of them show exactly if the improvement of the hydrolysis yields results from the removing of biomass components (such as hemicelluloses, lignin, etc.) during the pretreatment, or if the steam explosion induce modifications to the cellulose fibers themselves.

In this paper, different steam explosion treatments were applied on a pure cellulose fiber in order to identify the impact of the process on its physicochemical properties and hydrolysis yield. Links between cellulose hydrolysis yields, crystallinity index and moisture retention were found. In addition, TGA analyses were performed to detect thermal degradation mechanisms which modify cellulose composition (Quievy et al. 2009) and influence the hydrolysis yields.

4.2. Material and Methods

4.2.1. Material

The sample tested in this study was a microcrystalline cellulose purchased from Mikro-technik GmbH under the trade name of Alba-fibre C200. This commercial product is a

bleached cellulose obtained from wood pulp and purified from hemicelluloses and lignin. The average fiber size is around 200 μm in length with a diameter of 30 μm . Its density is between 120-150 g/dm^3 with a moisture content of at least 8%.

4.2.2. Methods

4.2.2.1. Steam explosion treatment

Treatment of pure cellulose fibers was carried out in a steam explosion pilotscale equipment. This steam explosion prototype, designed in the department of Industrial Biological Chemistry - ULg - Gembloux Agro-Bio Tech (Jacquet et al., 2011), This steam explosion prototype consists of a steam generator (29.4 kW, operating pressure: 6.0 MPa), a 50 liters vessel designed to reach a maximum operating pressure of 5.1 MPa and a cyclone explosion tank, to recover the exploded product that is brought away by the expanding steam. A quick-opening ball valve, placed between the vessel and the explosion cyclone tank, is used to induce a sudden decrease in pressure and give the explosion effect. Heating resistors are present on the reactor wall to carry out preheating (100°C) and thus limiting the amount of steam required to reach the target temperature.

Steam explosion runs were carried out using the same amount of cellulose fibers (500 g of dry matter, moisture : 8%). After placing the material in the reactor, the combination of steam pressure (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 MPa) and retention time (2 and 5 minutes) were adjusted to the desired treatment conditions. Counting of the retention time was started when the vessel reached 96 % of the target pressure.

After the treatment, the exploded material was cooled to about 30°C and was centrifuged to recover the solid parts. This fraction was water-washed and used for enzymatic hydrolysis. In parallel, water retention, X-ray diffraction and TGA analysis were performed.

4.2.2.2. Enzymatic hydrolysis

Hydrolysis process was adapted from the method of Vanderghem et al. (2011). Cellulose was enzymatically hydrolyzed by a cellulase mixture from *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Celluclast® 1.5 L) and cellobiase from *Aspergillus Niger* (Novozym 188) (Novozymes A/S Denmark). Both enzymes were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The activities of Celluclast® 1.5 L and Novozym 188 were of 30 FPU/mL and 295 CBU/mL respectively. Applied enzyme loadings were 7.5 FPU/gram of cellulose for Celluclast® 1.5 L and 37 CBU/gram of cellulose for Novozym 188.

Steam exploded cellulose were suspended in citrate buffer (0.05 M, pH 4.8) at a concentration of 50 g/l. Hydrolysis took place in 250 mL capped Duran bottles incubated in a water bath equipped with a submersible magnetic stirrer (2mag MIXdrive 6, Munich, Germany) at 52 °C for 24 h. Stirring was continuously performed with a stir bar at 400 rpm.

4.2.2.3. Analysis of cellulose hydrolysis products and determination of hydrolysis yield

Separation and quantification of hydrolysis products (glucose, cellobiose) were performed using a high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD, ICS-3000) (Dionex, Sunnyvale, USA). Before HPAEC-PAD analysis, samples of withdrawn hydrolysate were subjected to 100× dilution and filtered (0.45 µm). Glucose (G8270-100G - ≥ 99.5 %) and cellobiose (C7252-25G - ≥ 98 %) standards were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). The components were separated using a CarboPac PA100 column set (guard and analytical) (Dionex). The solvent A was 100 mM NaOH, solvent B was 600 mM CH₃COONa and 100 mM NaOH, solvent C was 500 mM NaOH and solvent D was distilled water (HPLC grade solvents). The gradient was as follow: 0–8 min 50% A and 50% D, 8–12 min linear gradient up to 100% A, 12–15 min 100% A, 15–

25 min linear gradient up to 30% B and 70% A, 25–28 min 30% B and 70% A, 30–40 min 50% B and 50% C (cleaning).

Hydrolysis yield after 24 hours was determined by comparing the amount of glucose and cellobiose produced in the hydrolysate to the total amount of glucose in the pretreated biomass by using the following equation (Eq.1).

$$\text{Hydrolysis rate (\%)} = \left(\frac{\text{Glucose produced} + 1.053 \times \text{cellobiose produced}}{\text{Total amount of glucose in the pretreated biomass}} \right) \times 100$$

(Eq.1)

Where 1.053 is the factor to determine equivalents of glucose from cellobiose (Dowe et al., 2008).

4.2.2.4. X-Ray Diffraction analyses

The crystalline state of the cellulose samples were determined isothermally by X-ray diffraction using a D8 Advance diffractometer (Bruker, Germany) (λ Cu=1.54178 Å, 40kV, 30mA) equipped with a Vantec (Bruker, Germany) detector, and a TTK450 low-temperature Chamber & TCU 110 Temperature Control Unit (Anton Paar, Graz, Austria) connected to a circulating water bath (Julabo, Germany). D-spacings were determined in the $15^\circ < 2\sigma < 27^\circ$ range using the Bragg law. Diffrac Plus Evaluation 14.0.0.0 program (Bruker, Germany) was used to normalize and process the results.

The sample crystallinity was determined by the Segal method (Eq. 2).

$$X_{cr} = \frac{I_{22.7} - I_{18.5}}{I_{22.7}}$$

(Eq. 2)

Where X_{cr} is crystallinity index. Equation 2 using the height of the $I_{22.7}$ peak and the $I_{18.5}$ peak. $I_{22.7}$ represents both crystalline and amorphous material while $I_{18.5}$ represents amorphous material only.

The expression requires that the amorphous material diffracts with the same intensity at 18.5° and 22.7°, and that the crystalline cellulose does not contribute to the intensity at 18.5° (Segal et al. 1959).

Evolution of samples crystallinity was also estimated by the method described by Bibin et al. (2010) which used the ratio of scattering intensity at 22.7° (indicative of cellulose I content) vs. intensity at 20.4° (indicative of cellulose II content).

4.2.2.5. Water retention values

Water retention values were determined by the method described by Ioannis et al. (2006) and Sikora et al. (2008).

About 0.5 g samples were immersed in deionized water for 24 h at ambient temperature. Samples were then placed in a filter centrifugation tube (pore diameter: 0,2 µm) and centrifuged at 8000g for 10 min (Beckman Coulter Allegra X-15R Centrifuge). Wet samples were then weighed (W_w), dried in an oven for 24 h at 105°C and cooled in a desiccator. The weight of the dried samples was recorded (W_d). The water retention value (WRV) was then calculated by using the following equation (Eq.3).

$$WRV (\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100$$

(Eq.3)

4.2.2.6. Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermogravimetric analyses were performed on a Mettler Toledo TGA/SDTA 851e under nitrogen (50 ml/min). Steam exploded cellulose were heated from 20 to 600°C at a heating rate of 20°C/min. The mass of the sample ranged from 5 to 10 mg depending on the experiment.

4.3. Results and Discussion

Steam explosion treatment severities were determined using a model developed by Chornet and Overend (1988). This model describes the treatment severity by a correlation between temperature process and retention time.

$$S = \text{Log}_{10} \int_0^t \exp\left(\frac{T(t)-100}{14,75}\right).dt$$

Where: S = Severity Factor

$T(t)$ = Process temperature (°C)

t = Retention time (min)

 14,75 = Activation energy value in the conditions where process kinetics are
 of first order and obey to Arrhenius law

After considering the efficiency of our pilot-scale steam-explosion plant, it was shown that a long time (approximately 15 to 25 minutes) was required to reach the different target pressures. In these cases, the treatment severity must include the time necessary to reach the target pressure (demand time) and the severity factor is calculated by the integral form.

$$S = \text{Log}_{10} \int_{t_2}^{t_1} \exp\left(\frac{T(t)-100}{14,75}\right).dt$$

Where T is the process temperature (°C) and t_1 and t_2 are respectively the time at the start and the end of the reaction (Overend et al. 1987).

By considering the hypothesis that the temperature increases linearly with every increment in pressure (Li and Chen. 2008), the severity factor can be calculated by the following equation, corresponding to the integral resolution.

$$S = \text{Log}_{10} \sum \frac{14,75(t_{n+1} - t_n)}{(T_{n+1} - T_n)} \left[\exp\left(\frac{T_{n+1} - 100}{14,75}\right) - \exp\left(\frac{T_n - 100}{14,75}\right) \right]$$

where t_n and t_{n+1} are the initial times for increments n and $n + 1$, and T_n and T_{n+1} are the process temperatures for times t_n and t_{n+1} respectively (Jacquet et al. 2011).

Severity factors (SF) of each steam explosion treatment are presented in Table 1 with the corresponding process pressures (MPa) and temperatures (°C) and the different time settings (retention time and demand time (total test time which include the rising in temperature)).

Table 1. Pressure, temperature, retention time, demand time and severity factor for steam explosion treatments applied

Samples Name	Pressure (MPa)	Process temperature (°C)	Retention Time (min)	Demand Time (min)	Severity Factor
C200 (SF 2.63)	0.97	171.8	2.01	11.35	2.63
C200 (SF 2.84)	0.98	173.1	5.02	13.12	2.84
C200 (SF 3.79)	2.01	210.3	2.02	12.43	3.79
C200 (SF 3.97)	2.02	209.0	4.98	14.33	3.97
C200 (SF 4.41)	2.99	230.9	2.00	16.14	4.41
C200 (SF 4.61)	3.02	229.7	4.57	19.11	4.61
C200 (SF 4.90)	3.99	247.2	2.01	17.83	4.90
C200 (SF 5.14)	4.03	248.4	5.03	20.57	5.15
C200 (SF 5.31)	5.01	259.3	2.02	19.95	5.31
C200 (SF 5.55)	5.03	261.1	5.00	23.29	5.55

Hydrolysis yield of the different cellulose fractions obtained for each steam explosion treatment were evaluated by high-performance anion exchange chromatography. Fig. 1

presents the hydrolysis yield obtained after 24 hours for different severity factor pretreatments.

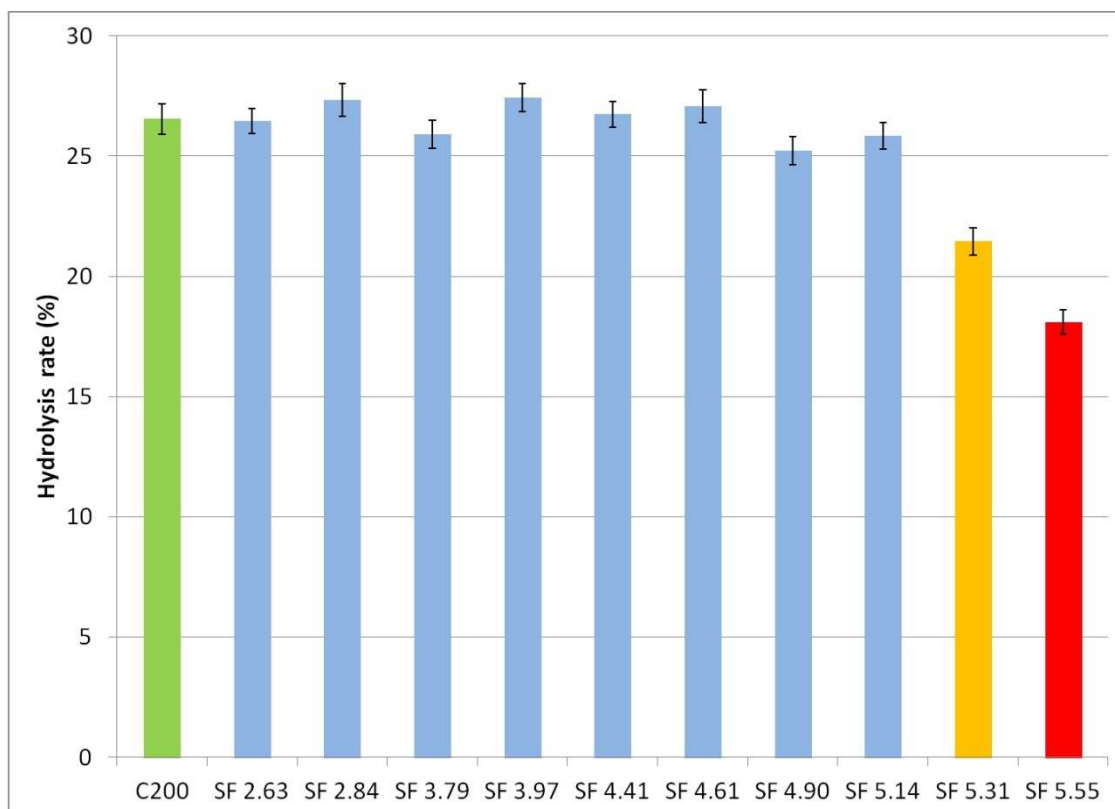


Fig 1: Proportion of cellulose C200 and steam exploded cellulose C200 samples hydrolysed after 24 hours

When the severity factor was below 5.2, results showed that hydrolysis yield of standard cellulose and steam exploded samples were in a range between 25 and 27 %. For higher severity factors, a decrease of the hydrolysis yield was observed. 22 % for C200 (SF 5.31) and 18% for C200 (SF 5.51) compared to the standard cellulose C200. Standard deviations of each hydrolysis yield value were comprised between 0.5 and 0.7 %.

A first conclusion drawn from these results is that it seems that steam explosion treatment did not improve the hydrolysis properties of pure cellulose fibers when the severity factor applied

was less than 5.2. For higher intensities, results showed even an important decrease of the hydrolysis yield.

This result is widely opposed to the results obtained on various biomass described in many studies (Schultz et al. 1984; Nunes and Pourquié. 1996; Fernandez-Bolanos et al., 2001; Negro et al., 2003; Sorensen et al., 2008; Chikako et al., 2011). This result further suggests that the increase of enzymatic hydrolysis yield was due to the removal of other biomass components like hemicelluloses and lignin during the steam explosion treatment, but may not improve the hydrolysis properties of the cellulose fiber.

To explain these observations, the present study focused on the determination of the accessibility of the steam exploded samples to enzymes attack. Literature shows that cellulose accessibility to enzymatic complex can be mainly characterized by studying two physico-chemical properties: crystallinity and water retention (Paquot et al. 1981, Yeh et al. 2010, Vanderghem et al. 2012).

X-ray diffraction analyses were done on cellulose C200 and cellulose C200 steam exploded samples for each severity factor. A comparison of the different pattern show differences in the overall crystallinity and cellulose I/cellulose II content of the samples. Samples exhibit highest intensities at a scattering angle of 22.7° indicating the presence of cellulose I, which correspond to the crystalline part of the cellulose fiber (Nelson and O'Connor 1964).

When the severity factor was below 5.2, scattering intensity at 22.7° became more prominent in steam exploded samples with the severity factor intensity. In order to semi quantify the crystallinity development of steam exploded samples, the crystallinity indexes were estimated from the peak height at 22.7° and 18.5° (Seagal et al. 1962, Thygesen et al. 2005). Crystallinity indexes are reported in Figure 2.

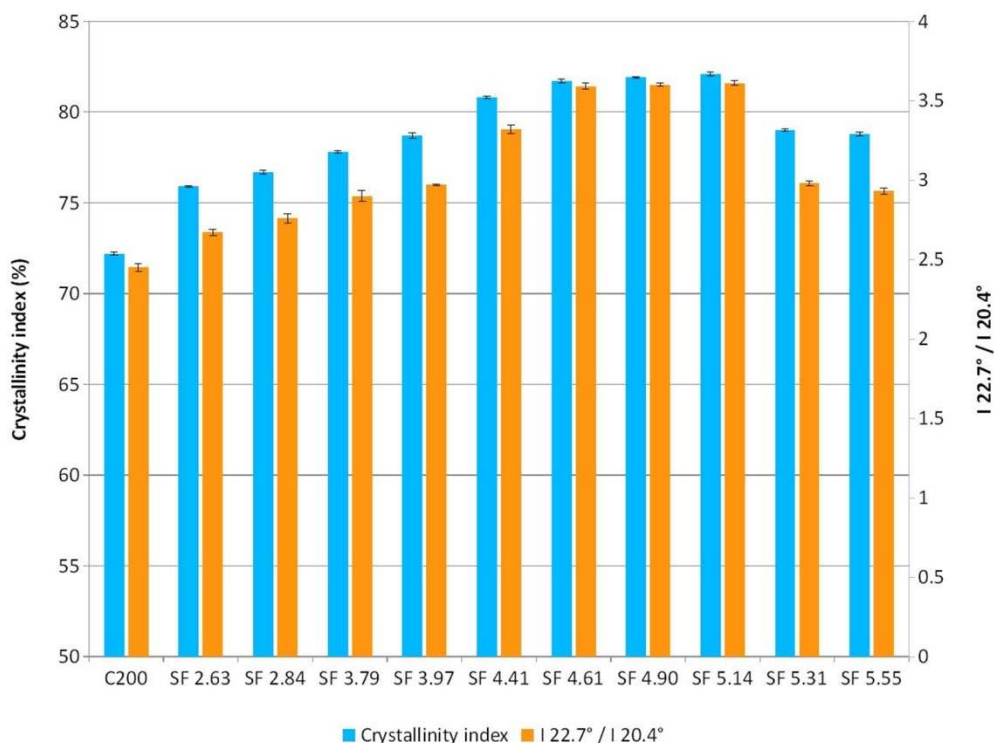


Fig. 2: Crystallinity index and $I_{22.7^\circ}/I_{20.4^\circ}$ ratio of cellulose C200 and steam exploded samples

Results obtained showed a slight increase of the crystallinity of the steam exploded sample with the increasing of severity factor (72 % for C200 to 82% for C200 (SF 5.14)). The ratio of scattering intensities at 22.7° and 20.4° ($I_{22.7^\circ}/I_{20.4^\circ}$) also indicate a modification in cellulose I/cellulose II content (Figure 2.). The progressive increase of the ratio $I_{22.7^\circ}/I_{20.4^\circ}$ (2.45 for C200 to 3.61 for C200 (SF 5.14)) may be interpreted as an increase in the proportion of cellulose I crystallites with respect to cellulose II crystallites which confirmed the increase of cellulose I correlated to an intensification in the overall crystallinity of the samples (Bibin et al. 2010).

When the severity factor reached 5.2, patterns showed a further decrease of intensities at 22.7° and exhibited a slight shoulder at a scattering angle of 20.4° indicating a change in the

relative cellulose I / cellulose II content resulting in a decrease of the crystallinity of the samples.

Several studies showed that crystallinity of the cellulose has an impact on enzymatic hydrolysis yield (Paquot et al. 1981, Yeh et al. 2010, Vanderghem et al. 2012). Crystalline regions of cellulose are very compact and resistant to enzymes and are less susceptible to enzymatic hydrolysis than amorphous regions. In the amorphous regions, endo and exo-glucanases are believed to hydrolyze cellulose whereas the crystalline region hydrolysis is dominated only by exo-glucanases, resulting in a much slower hydrolysis yield in the crystalline regions than in the amorphous regions (Yeh et al. 2010). Therefore, the increase of crystallinity could lead to a decrease of the hydrolysis yield, which is not observed in this study. This result implicates that crystallinity is not the only factor to consider to explain the hydrolysis patterns. Other factors than crystallinity could influence the contact between the enzyme and substrate. Water retention is an important factor affecting cellulose hydrolysis. (Mantanis et al. 1995). Water retention determines accessibility of the water to the substrate. This property is an element which contributes toward control over the swelling potential and the accessibility of the enzyme since cellulose chains must be hydrated to permit an enzymatic attack (Vanderghem et al. 2012). As the fiber swells, intermolecular bonds are broken as a result of the internal stresses produce by swelling. The degree of order within the fiber is reduced and there is an increase in the specific surface available for enzymatic hydrolysis (Mantanis et al. 1995). Water retention could be influenced by the morphology of the substrates (particle size, pore size, etc.) which determines a specific surface area that will be available for enzymatic attack, but also by the dimensions of the crystallites and the degree of crystallinity.

Water retention values of C200 cellulose and steam exploded cellulose are presented in figure 3.

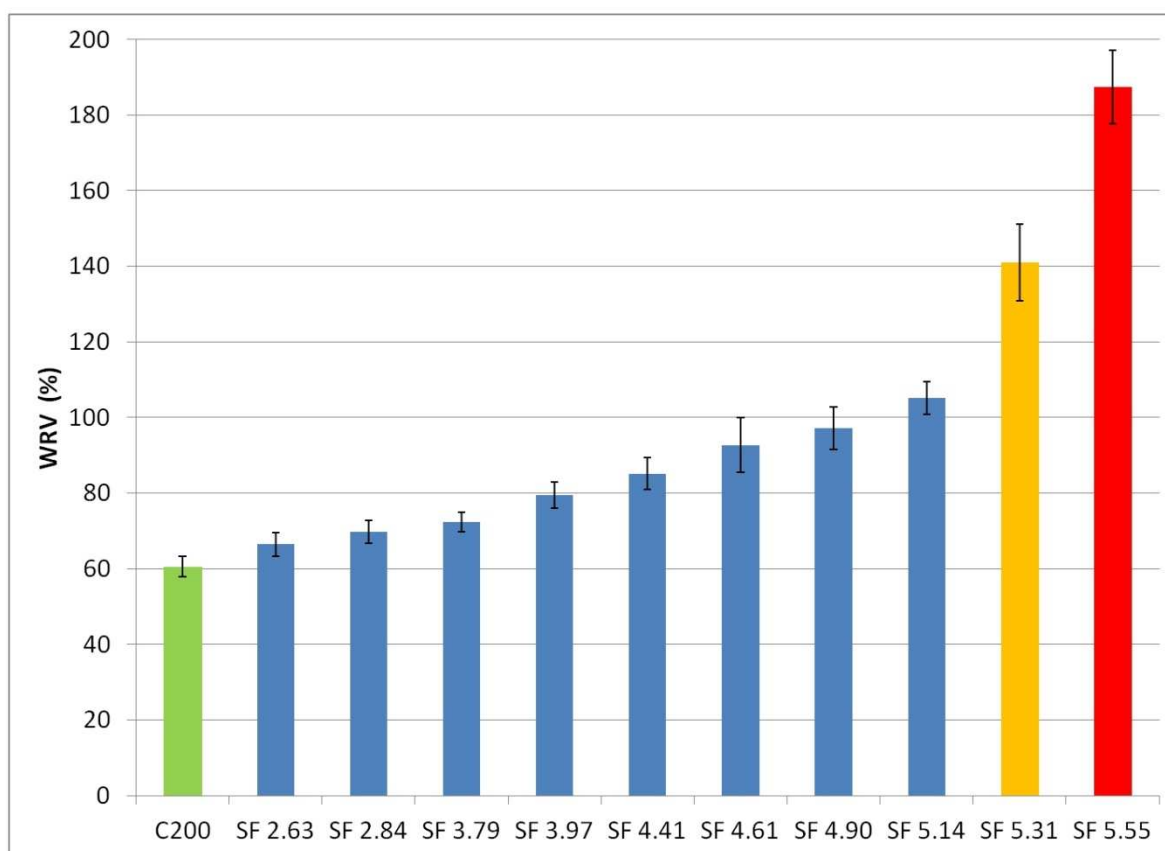


Fig. 3: Water retention values of cellulose C200 and steam exploded samples

Results show a continuous increase of the water retention values with the severity factor applied (from 60 % for the raw C200 cellulose to 105 % for treated C200 cellulose (SF 5.14)). For severity factors higher than 5.2, a very high increase of water retention values was highlighted (141 % for C200 (SF 5.31) and 187 % for C200 (SF 5.55)).

When the severity factor was below 5.2, the increase of water retention values was related to an increase of specific surface area and swelling by hydration of the cellulose fiber (Paquot et al. 1981, Vanderghem et al. 2012). However, this increase in accessibility to water and probably to enzymes is not correlated to an increase of hydrolysis yield.

To explain the hydrolysis patterns, water retention and crystallinity of the samples must be considered simultaneously.

Hypothesis to explain this phenomenon was, in one way, that steam explosion increases the water retention values of cellulose. This increase results to the increasing of the specific surface area of cellulose fiber. This increase of surface area increases the accessibility of cellulose to enzymatic attack by increasing the amount of potential enzymatic binding sites.

On the other hand, the increase of crystallinity means that most of the enzymatic attack is performed only by exo-glucanases.

Therefore, the increase of the amount of potential enzymatic binding sites is counterbalanced by the fact that a greater proportion of the substrate will be accessible only to exo-glucanases and explains the similarity of the hydrolysis patterns.

For treatment intensities higher than 5.2, the further decrease of crystallinity, combined with the increasing of the retention moisture values should have led to an important increase of hydrolysis yield, which was not observed. In this range of treatment intensities, an additional factor must be considered to explain the results.

A previous study has shown that the intensity of steam explosion treatment had an influence on the thermal degradation of cellulose (Jacquet et al. 2011). The thermal degradation of cellulose implies two parallel reactions. The first one is a dehydration reaction which conduct to the production of a first intermediary (anhydrocellulose) which is further quickly decomposed to carbonaceous residues (char). The second reaction implicates an active depolymerizing of cellulose. This reaction leads to anhydrosugar intermediaries (tars), especially levoglucosan which lead to the formation of different degradation products such as 5-HydroxymethylFurfural (Quiévy et al. 2009, Jacquet et al. 2011). When the severity factor of the steam explosion treatment is higher than 5.2., it was shown that the thermal degradation of cellulose is mainly conducted by the dehydration reaction (Jacquet et al. 2011).

Figure 4 shows the carbonaceous residues values (char level) observed on the TGA curves at the end of the pyrolysis of C200 cellulose and steam exploded cellulose samples.

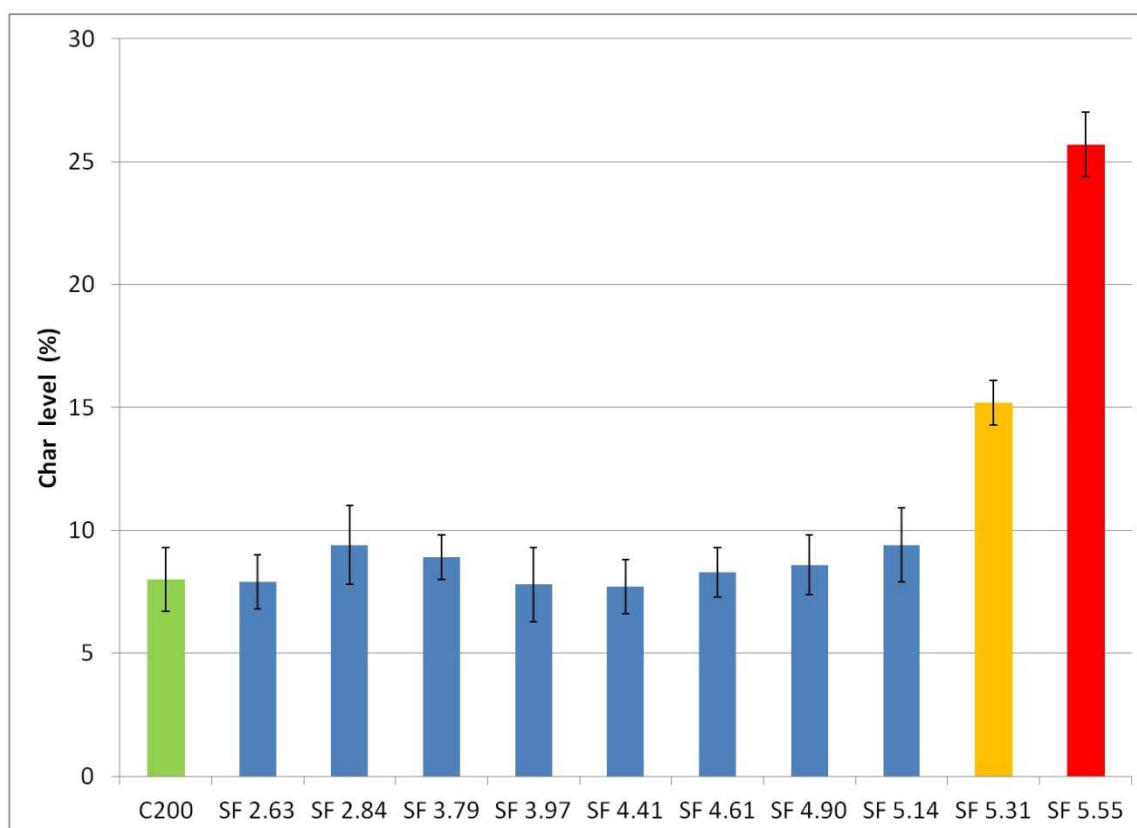


Fig. 4: Carbonaceous residues values at the end of pyrolysis for cellulose C200 and steam exploded samples

The results obtained from figure 4. show that carbonaceous residues at the end of the pyrolysis seemed similar for the cellulose C200 and the treated cellulose obtained at a severity factor below 5.2 (7,5% to 9,5 %). For higher severity factors, an important increase of the char level was observed (15 % for C200 (SF 5.31) and 25,5 % for C200 (SF 5.55). These results, in agreement with previous work (Jacquet et al. 2011) confirmed a significant thermal degradation of cellulose in this severity factor range. This thermal degradation leads to an important change in substrate composition (Quievy et al. 2009). Increasing amounts of degradation products in the sample induced a decrease of the cellulose available for hydrolysis and explained the decrease of the observed hydrolysis yield. In the same way, the

change in composition had an impact on the physico-chemical properties of the samples. The decrease in the cellulosic ratio of the samples was correlated to the decrease of the overall crystallinity. As for water retention, the large amount of degradation product was mainly due to a dehydration reaction (such as anhydrocellulose) (Scheirs et al. 2001) combined with a significant disintegration of the material (Quievy et al. 2009) which induced a very high increase of the specific surface area explaining the important increase of the water retention values observed.

4.4. Conclusion

The main conclusion drawn from this study was that steam explosion treatments, applied on a pure cellulose fiber, under the conditions of this study, did not appear to improve the enzymatic hydrolysis yield. However, this study showed that steam explosion had an impact on the physico-chemical properties of the cellulose fiber. For severity factors below 5.2, an increase of the accessibility of the substrate was counterbalanced by an increase of the overall crystallinity of the substrate. For higher intensities, a significant thermal degradation is observed and lead to a decrease of the cellulose hydrolysis yield.

4.5. Acknowledgements

Authors are grateful for the financial support of the Walloon Region in the frame of the LIGNOFUEL program (convention n°716721) and TECHNOSE program (convention n°716757). Mr Meyer Frederic and Mrs Doran Lynn are acknowledged for excellent assistance.

4.6. References

1. 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.
2. Avellar, B.K., Glasser, W.G., 1998. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass Bioenergy.* 14, 205-218.
3. Bibin, M. C., Alcides Lopes, L., Ferreira de Souza, S., Sabu, T., Pothan L.A., Kottaisamy, M., 2010. Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibres by steam explosion. *Carbohydr Polym.* 81, 720-725.
4. Chikako, A., Ai A., Chizuru. S., Yoshitoshi N., 2011. Characterization of the steam-exploded spent Shiitake mushroom medium and its efficient conversion to ethanol. *Bioresour. Technol.* In press
5. Chornet, E., Overend, R.P. 1988. Phenomenological Kinetics and Reaction Engineering Aspects of Steam/Aqueous Treatments. *Proceedings of the International Workshop on Steam Explosion Techniques. Fundamentals and Industrial Applications.* 21-58.
6. Chun, S. G., Keat, T. L. 2011. Second-generation biofuel (SGB) in Southeast Asia via lignocellulosic biorefinery : Penny-foolish but pound-wise. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 15(6). 2714-2718.

7. Dowe, N., McMillan, J. 2008. SSF Experimental protocols Lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory. Technical Report NREL/TP-510-42630.

8. Fernandez-Bolanos, J., Felizon, B., Heredia, A., Rodriguez, R., Guillen, R., Jimenez, A., 2001. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour Technol.* 79, 53-61.

9. Galbe, M., Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 108, 41-65.

10. Ioannis, N., Konstantina, T., Stavros, M., 2006. Water retention and drainage in different brands of microcrystalline cellulose: Effect of measuring conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 63, 278-287

11. Jacquet, N., Quiévy, N., Vanderghem, C., Janas, S., Blecker, C., Wathélet, B., Devaux, J. Paquot, M., 2011. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polym Degrad Stab.* 96, 1582-1588.

12. Jacquet, N., Vanderghem, C., Blecker, C., Paquot, M., 2010. La steam explosion : Application en tant que prétraitement et effet sur la matière lignocellulosique. *BASE.* 14(S2), 561-566.

13. Li, H., Chen, H., 2008. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochem.* 43, 1447-1451.

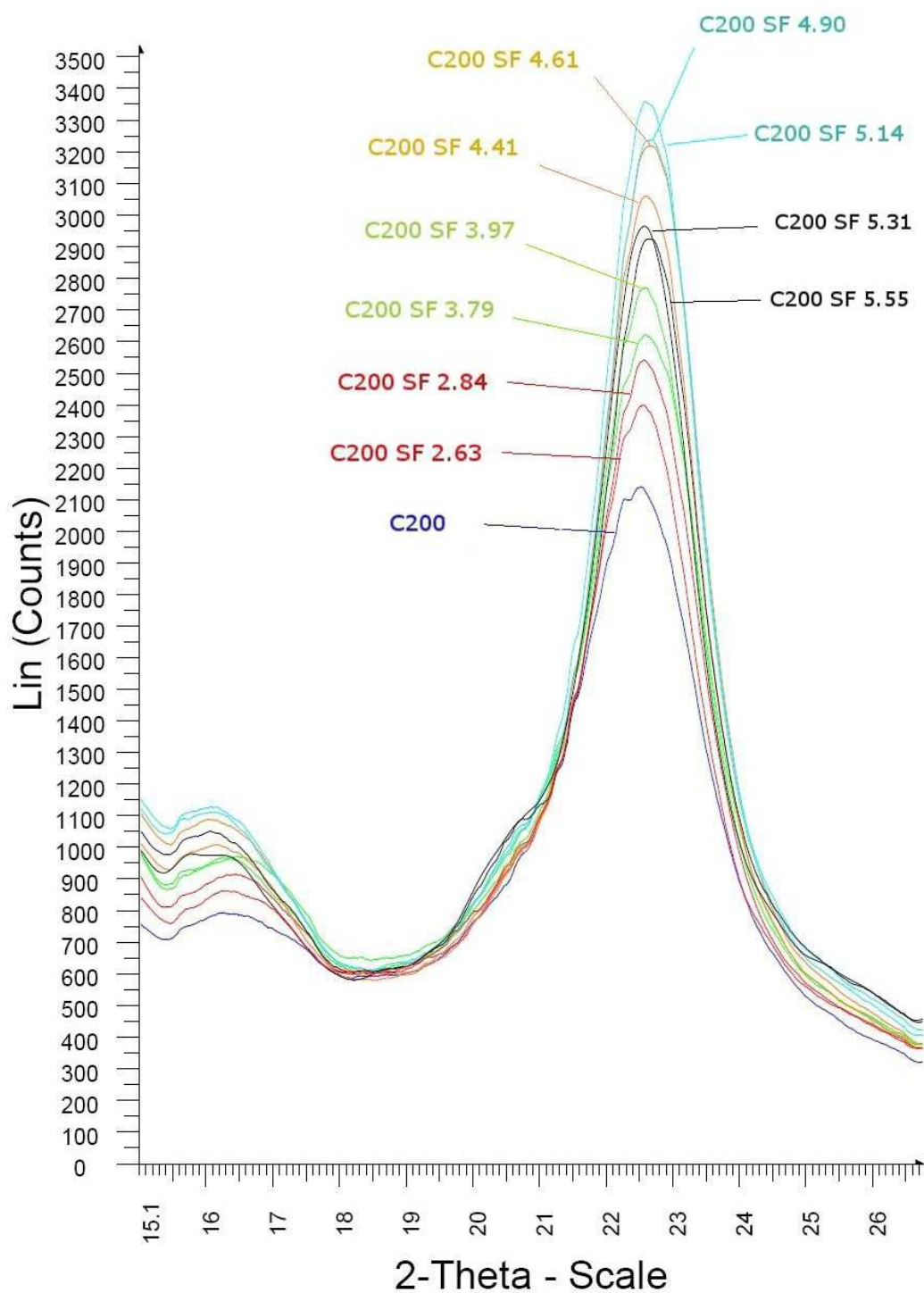
14. Mantanis, G.I., Young, R.A., Rowell, R.M., 1995. Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids. *Cellulose*, 2, 1-22.
15. Martin, R.S., Perez, C., Briones, R., 1995. Simultaneous Production of Ethanol And Kraft Pulp From Pine (*Pinus Radiata*) Using Steam Explosion. *Bioresour. Technol.* 53, 217-223.
16. Martinez, J., Negro, M.J., Saez, F., Manero, J., Saez, R., Martin, C., 1990. Effect of Acid Steam Explosion on Enzymatic Hydrolysis of *O. nervosum* and *C. cardunculus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24, 127-134.
17. Moniruzzaman, M., 1996. Saccharification and Alcohol Fermentation of Steam-Exploded Rice Straw. *Bioresour. Technol.* 55, 111-117.
18. Negro, M.J., Manzanares, P., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2003. Changes in various physical/chemical parameters of *Pinus pinaster* wood after steam explosion pretreatment. *Biomass Bioenergy.* 25, 301-308.
19. Nelson, M., L., O'Connor, R. T., 1964. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *J. Appl. Polym. Sci.*, 8, 1325-1341.
20. Nunes, A. P., Pourquie, J., 1996. Steam Explosion Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Eucalyptus Wood. *Bioresour. Technol.* 57, 107-110.

21. Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J.A., 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philos Trans R Soc Lond A*, 321, 523-536.
22. Paquot, M., Thonart, P., Jacquemin, P., Rassel, A., (1981). Evolution de la rétention d'eau et de la morphologie de la fibre au cours de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. *Holzforschung* 35, 87-93.
23. Quiévy, N., Jacquet, N., Sclavons, M., Deroanne, C., Paquot, M., Devaux, J., 2009. Influence of homogenization and drying on the thermal stability of microfibrillated cellulose. *Polym. Degrad. Stab.* 95, 306-314.
24. Sarkar, N. Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes : An overview. *Renewable Energy*. 37, 19-27.
25. Scheirs, J., Camino, G., Tumiatti, W., 2001. Overview of water evolution during the thermal degradation of cellulose. *Eur. Polym. J.* 37, 933-942.
26. Schultz, T.P., Templeton, M.C., Biermann, C.J., Mc Ginnis, G.D., 1984. Steam Explosion of Mixed Hardwood Chips, Rice Hulls, Corn Stalks, and Sugar Cane Bagasse. *J. Agric. Food. Chem.* 32, 1166-1172.
27. Segal, L, Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1962, An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer, *Tex Res J*, 29, 786-794

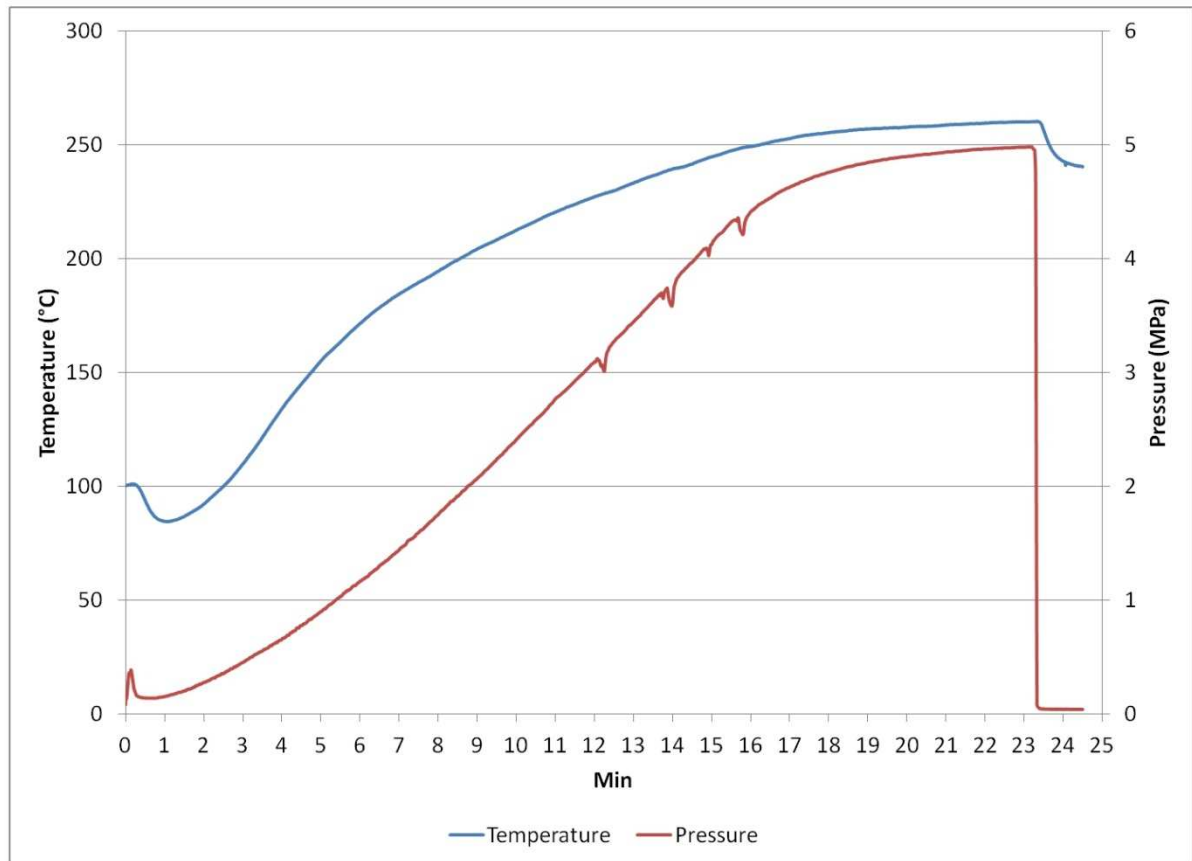
28. Siroka, B., Noisternig, M., Griesser, U.J., Bechtolda, T., 2008. Characterization of cellulosic fibers and fabrics by sorption/desorption. *Carbohydrate Research*. 343, 2194-2199
29. Sorensen, A., Teller, P.J., Hilstrom, T., Ahring, B.K., 2008. Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresour. Technol.* 99, 6602-6607.
30. Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A.B., Ståhl, K., 2005. On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *Cellulose* 12, 563-576.
31. Vanderghem, C., Brostaux, Y., Jacquet, N., Blecker, C., Paquot M., 2012. Optimization of formic/acetic acid delignification of *Miscanthus × giganteus* for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Ind. Crops Prod.* 35, 280-286.
32. Vanderghem, C., Jacquet, N., Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., 2012. Effect of physicochemical characteristics of cellulosic substrates on enzymatic hydrolysis by means of a multi-stage process for cellobiose production. *Appl Biochem Biotechnol*, In press. DOI 10.1007/s12010-011-9535-1
33. Wang, K., Jiang, J.X., Xu, F., Sun, R.C., 2009. Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of *Lespedeza* stalks (*Lespedeza crytobotrya*): Part 1. Characteristics of degraded cellulose. *Polym Degrad Stab.* 94, 1379-1388.
34. Yeh, A. I., Huang, Y.C., Chen, S. H. 2010. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydr. Polym.* 79, 192-199.

35. Zhu, J.Y., Zhuang, X.S. (2012). Conceptual net energy output for biofuel production from lignocellulosic biomass through biorefining. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 583-598.

4.7. Supplementary electronic material



Supplementary electronic material 1. X-Ray profiles of cellulose C200 and steam exploded samples



Supplementary electronic material 2. Pressure and temperature evolution during the whole steam explosion process

CHAPITRE V

INFLUENCE OF HOMOGENIZATION TREATMENT ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ENZYMATIC HYDROLYSIS YIELD OF PURE CELLULOSE FIBERS

Adapted from: Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Sabine Danthine, Christophe Blecker, Michel Paquot. (2012).

Influence of homogenization treatment on physico-chemical properties and enzymatic hydrolysis yield of pure cellulose fibers. *Applied Biochemistry*. Soumis

Après avoir procédé à l'étude de la steam explosion, le travail de recherche s'est ensuite orienté vers la seconde technologie de prétraitement envisagée : l'homogénéisation.

Le présent chapitre reprend les résultats relatifs à l'application de cette technologie sur la cellulose modèle.

L'étude de l'impact de l'homogénéisation sur la cellulose a été menée par différents auteurs (Bhatnagar (2003), Nakagaito (2004), Habibi (2008)) au cours de la dernière décennie. Les résultats de ces études montrent que l'homogénéisation provoque l'effondrement de la structure macroscopique des fibres de cellulose et conduit à l'obtention d'une suspension de microfibrilles de cellulose, entités distinctes qui composent la fibre de base. Ces mêmes auteurs ont également montré que ces suspensions de microfibrilles peuvent s'organiser en un réseau tridimensionnel qui va conférer des propriétés rhéologiques à la suspension.

Cependant, aucune des approches décrites dans la littérature n'a permis d'évaluer le gain éventuel apporté par cette technologie en termes d'amélioration des rendements d'hydrolyse, sujet du présent chapitre.

Dans un premier temps, un modèle de calcul du « degré d'homogénéisation » est présenté. Ce modèle de calcul permet d'estimer plus précisément le nombre de passage appliqué à la suspension de cellulose dans un système de traitement continu.

Les modifications des propriétés chimiques apportées par l'homogénéisation sont ensuite envisagées. Les propriétés suivies sont similaires à celles étudiées lors de l'étude sur la steam explosion (cristallinité et rétention d'eau) et ce, dans le but évident de comparer les deux technologies.

Contrairement à la steam explosion, l'étude de la dégradation thermique de la cellulose en cours d'homogénéisation n'a pas été menée en raison des faibles températures atteintes pendant le prétraitement (60°C). Par contre, l'homogénéisation entraîne des modifications des propriétés rhéologiques du milieu traité, propriétés qui ont été caractérisées.

Enfin, le chapitre V se finalise en présentant l'impact de l'homogénéisation sur les rendements d'hydrolyse enzymatique de la cellulose modèle. Comme pour la steam explosion, des liens ont été établis entre les rendements, les modifications des propriétés physico-chimiques de la cellulose et les propriétés rhéologiques développées par les différents échantillons.

Abstract

The aim of this study is to compare the effect of different homogenization treatments on the physicochemical properties and the hydrolysis yield of a pure bleached cellulose. Results obtained show that homogenization treatments improve the enzymatic hydrolysis yield of the cellulose fibers by 25 to 100 percent, depending of the homogenization treatment applied. Characterization of the samples showed also that homogenization had an impact on some physicochemical properties of the cellulose. For moderate treatments intensities (pressure below 500 bars and degree of homogenization below 25 (Energy input < 32 kWh / kg of cellulose), an increase of the water retention values (WRV) correlated to the increase of the hydrolysis yield were highlighted. Result also showed that the overall crystallinity of the cellulose appeared not to be impacted by the homogenization treatment.

For higher treatment intensities, homogenized cellulose samples developed a stable tridimensional network that contributed to decrease cellulases mobility and slowdown the hydrolysis process.

Keywords

Homogenization, Microcrystalline Cellulose, Enzymatic hydrolysis, Crystallinity, Water retention.

5.1. Introduction

In the recent economic context, there has been increasing concern for the use of cellulose-based products as raw materials to produce second generation biofuels [1-2] or high added values products [3-4]. In this sense, lignocellulosic materials, which are widely composed of polymer materials such as cellulose, hemicelluloses and lignin, appears to be promising [5].

However, the economic feasibility to use lignocellulosic materials depends on the ability to perform a complete fractionation of the biomass. To achieve this goal, materials must be subjected to a pretreatment [6].

A large number of pretreatment processes for the fractionation of biomass are highlighted in recent review articles [7-10]. These pretreatments technologies can be classified into biological, physical, chemical and physico-chemical according to the different forces or energy used in the process [7]. Literature established that physico-chemical pretreatments offer several attractive features such as lower environmental impact, lower capital investment, more potential for energy efficiency, fewer hazardous process chemicals and conditions, possibility of using a large chip size... when compared to other fractionation technologies. Physico-chemical pretreatments include technology such as steam explosion, liquid hot water, ammonia fiber explosion (AFEX), wet oxidation, microwave and ultrasound pretreatments and CO₂ explosion [9]. Steam explosion and SO₂ steam explosion are actually the most widely employed pretreatments for lignocellulosic biomass. These technologies allow the breakdown of lignocellulosic structural components by steam heating, shearing forces due to the expansion of moisture and hydrolysis of glycosidic bonds by the acid formed during the process [11-12]. Liquid hot water is another easy and widely used hydrothermal treatment, with parameters very close of the steam explosion, but does not require rapid decompression or any catalyst or chemicals [13]. The third pretreatment widely used is the AFEX process,

which pretreats biomass with liquid anhydrous ammonia and high pressure [7]. The rapid release of the pressure at the end of the process causes the expansion of the ammonia gas which induces swelling and physical disruption of lignocellulosic materials and a partial decrystallization of cellulose [14]. Wet oxidation, CO₂ explosion, microwave and ultrasound pretreatments are less used in the industry and remains upto now at a pilot scale [15-18]. All theses different studies highlight the positive effect induced by shear stress on the structure opening and hydrolysis yields of the biomass. However, none of them mention the high shear homogenization technology as a potential method to pretreat biomass.

Currently, high-pressure homogenization technology is used to disperse, mix, emulsify, and process various products in various industrial sectors: chemical, pharmaceutical, specialty foods and biotechnology [19]. The homogenization technology consists of a positive-displacement pump to which is attached an homogenizing valve. The pump forces fluids through the homogenizing valve under pressure, then the liquid flows between the valve at high velocity [20]. As the velocity increases, the pressure decreases producing an instantaneous pressure drop and induce simultaneously phenomena of cavitation, shear, turbulence, which are very difficult to rank in order of importance and to quantify, but has sufficient energy to disrupt materials structure [21-23].

Several studies have already shown the impact of homogenization technology on biomass material and mainly on the cellulose fibers structure. Dinant et al. [23] have shown that homogenization treatment, applied on a cellulosic residue of sugar beet pulp parenchyma cells induce the breakdown of the macroscopic fibers structure and lead to an aqueous suspension of either individual or bundles cellulose microfibrils with outstanding rheological properties, with solid-like viscoelastic behaviour and shear-thinning flow behaviour [24].

Similar results were obtained by Bhatnagar (2003), Nakagaito (2004) and Habibi (2008) on cellulosic fraction of various lignocellulosic materials (fibrillated kraft pulp, peel of prickly pear,...) which confirmed that homogenization treatment induce irreversible changes in the cellulose fibers structure and increase their bonding potential by modification of their morphology which could induce a potential increase of the cellulose hydrolysis yield [25-27].

The objective of this study was to evaluate the effect of homogenization treatment on the enzymatic hydrolysis yield of the cellulose fibers. Various treatments intensities were applied on a pure cellulose fiber in order to identify the impact of the process on the physicochemical properties and hydrolysis yield. Links between cellulose hydrolysis yields, crystallinity index and moisture retention were established. In addition, rheological analyses were performed to characterise the viscoelastic properties developed by the homogenized cellulose suspension and their possible influence on the hydrolysis process.

5.2. Material and Methods

5.2.1. Cellulose material

The sample tested in this study was a microcrystalline cellulose purchased from Mikro-technik GmbH (Germany) under the trade name of Alba-fibre C200. This commercial product is bleached cellulose obtained from wood pulp and purified from hemicelluloses and lignin. The average fiber size is around 200 μm in length with a diameter of 30 μm . Its apparent density is between 120-150 g/dm^3 with a moisture content of at least 8%.

5.2.2. Homogenization treatment

10 liters of cellulose fiber suspension, at 2 w/w% concentration in deionized water, was homogenized through a pilot scale Rannie homogenizer Model LAB, 12.51H (APV Inc., Charlotte, United States) in a continuous recycle configuration.

Homogenization treatment was performed with a constant flow rate of 2 l/min and a range of homogenizer conditions including various pressures (250 and 500 MPa) and recycle operations times (60, 120 and 240 min). The valve and seat valve configuration was a standard flat system, usually used in a variety of food, dairy and chemical applications. The high recirculation rate relative to the volume of solution in the feed tank (2 l/min, 10 l solution) provided adequate mixing. Temperature of the product was controlled with an ice cooling system to maintain the product at a constant temperature of 55-60°C. At the end of the process, one part of the homogenized suspension was recovered in 250 ml Duran bottles for the enzymatic hydrolysis step. The other part was lyophilized to achieve x-ray diffraction analyses and to keep the product for further use.

5.2.3. Enzymatic hydrolysis, analysis of cellulose hydrolysis products and determination of hydrolysis yield

Cellulose homogenized suspension was enzymatically hydrolyzed by a cellulase and cellobiase mixture (*Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Celluclast® 1.5 L) and *Aspergillus Niger* (Novozym 188) (Novozymes A/S, Denmark). The method was adapted from a process described by Vanderghem [26]. Both enzymes mixture were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The activities of Celluclast® 1.5 L and Novozym 188 were of 30 FPU/mL and 295 CBU/mL respectively. Applied enzyme loadings were 7.5 FPU/g (Celluclast® 1.5 L) and 37 CBU/g (Novozym 188).

Hydrolysis took place in 250 mL capped Duran bottles incubated in a water bath equipped with a submersible magnetic stirrer (2mag MIXdrive 6, Germany) at 52 °C for 24 h. The pH was adjusted to 4.8 with citrate buffer and a continuous stirring was performed with a stir bar at 400 rpm.

Samples obtained were filtered (0.45 µm). Separation and quantification of hydrolysis products (glucose, cellobiose) were performed with a high-performance anion exchange chromatography using a CarboPac PA100 column set (guard and analytical) coupled with pulsed amperometric detection (HPAECPAD, ICS-3000) (Dionex, Sunnyvale, USA). The solvent A was 100 mM NaOH, solvent B was 600 mM CH₃COONa and 100 mM NaOH, solvent C was 500 mM NaOH and solvent D was distilled water (HPLC grade solvents). The gradient was as follow: 0–8 min 50% A and 50% D, 8–12 min linear gradient up to 100% A, 12–15 min 100% A, 15–25 min linear gradient up to 30% B and 70% A, 25–28 min 30% B and 70% A, 30–40 min 50% B and 50% C (cleaning). The cellulose conversion to glucose and cellobiose were calculated using the following equation (Eq 1.) described in the work of Vanderghem [28].

$$\text{Hydrolysis rate (\%)} = \left(\frac{\text{Glucose produced} + 1.053 \times \text{cellobiose produced}}{\text{Total amount of glucose in the pretreated biomass}} \right) \times 100$$

(Eq 1.)

5.2.4. Optical microscopy

Observations were performed on homogenized suspensions with a NIKON Eclipse E400 microscope (Kanagawa, Japan) equipped with a Basler video camera (Vision Technologies, Ahrensburg, Germany) and mounted with a 20X objectif (Carl Zeiss, Germany). Micrographs were treated with an image processing software LUCIA-G 1500.

5.2.5. X-ray diffraction analyses

The crystalline state of the homogenized samples were determined isothermally using a D8 Advance diffractometer (Bruker, Germany) (λ Cu=1.54178 Å, 40kV, 30mA) equipped with a Vantec (Bruker, Germany) detector, and a TTK450 low-temperature Chamber & TCU 110 Temperature Control Unit (Anton Paar, Graz, Austria) connected to a circulating water bath (Julabo, Germany). The diffraction intensity was measured between the Bragg angles 15° and 27°. Diffrac Plus Evaluation 14.0.0.0 program (Bruker, Germany) was used to normalize and process the results.

5.2.6. Water retention values

Water retention values were determined by the method adapted from Ioannis [27]. Homogenized samples were placed in a filter centrifugation tube (pore diameter: 0,2 µm) and centrifuged at 8000g for 10 min (Beckman Coulter Allegra X-15R Centrifuge). Wet samples obtained were weighed (W_w), dried in an oven for 24 h at 105°C and cooled in a desiccator. The weight of the dried samples was recorded (W_d). The water retention value (WRV) was then calculated by using the following equation (Eq 2.).

$$WRV (\%) = \frac{W_w - W_d}{W_d} \times 100$$

(Eq 2.)

5.2.7. Rheological analysis

A Bohlin CVO120 controlled stress rheometer (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) fitted with a rotary upper cone (diameter : 40 mm, angle : 4%) and a fixed lower plate (diameter : 60 mm), connected to a circulating water bath (Julabo, Germany) was used for this study. Homogenized samples were loaded on the rheometer plate with care to minimize

shearing during the loading and silicon oil was placed on the probe periphery to prevent side effects. The gap closure was fixed at 150 μm .

Oscillatory stress sweep tests were then conducted over the range to 0.1 to 100 Pa with a frequency of 1 Hz at 20°C. Frequency sweep tests were realized at 20°C with a specific shear stress (in the Linear Viscoelasticity Region (LVR), at a value of 50 % of the critical stress (σ_c)) with a range of frequency of 0,01 to 10 Hz.

5.3. Results and Discussion

5.3.1. Multiple-pass homogenization and degree of homogenization

In most product processing systems, homogenization treatment is generally performed in a single-pass process. In the case of cellulose, several studies have shown that cellulose must be homogenized with additional passes to obtain the individual or bundles of cellulose microfibrils [23, 25-29].

In this study, cellulose was treated in continuous, implicating that the product from the homogenizer was recycled during different times. A first theoretical pass number applied in this condition could be easily estimated by the following relation (Eq 3.).

$$T = \frac{V}{D} \times M$$

Where: T = Process time (min)
 V = Volume of the sample (L)
 D = Flow rate (L/min)
 M = Theoretical number of pass

(Eq 3.)

However, the recycle system configuration is not so easy to analyze because there is no certitude that the entire batch has undergone the theoretical number of passes. A certain fraction of the batch does it, but there is some fraction of the batch which have undergone greater or fewer numbers of passes. To take account of this phenomenon, Leviton has developed a mathematical relation (Eq. 4) that allows the calculation of the percentage of the total volume (f), which has undergone P homogenization in continuous multi-pass process for a theoretical number of pass (M) [30].

$$f = \frac{M^P e^{-M}}{P!}$$

(Eq 4.)

Where: f = Fraction of total volume which has received P passes
 M = Theoretical number of pass
 P = Number of passes
 ! = factoriel index

With these both equations, value of f was easily calculated (M = 12, 24 and 48), and the following distributions were established (Fig 1.).

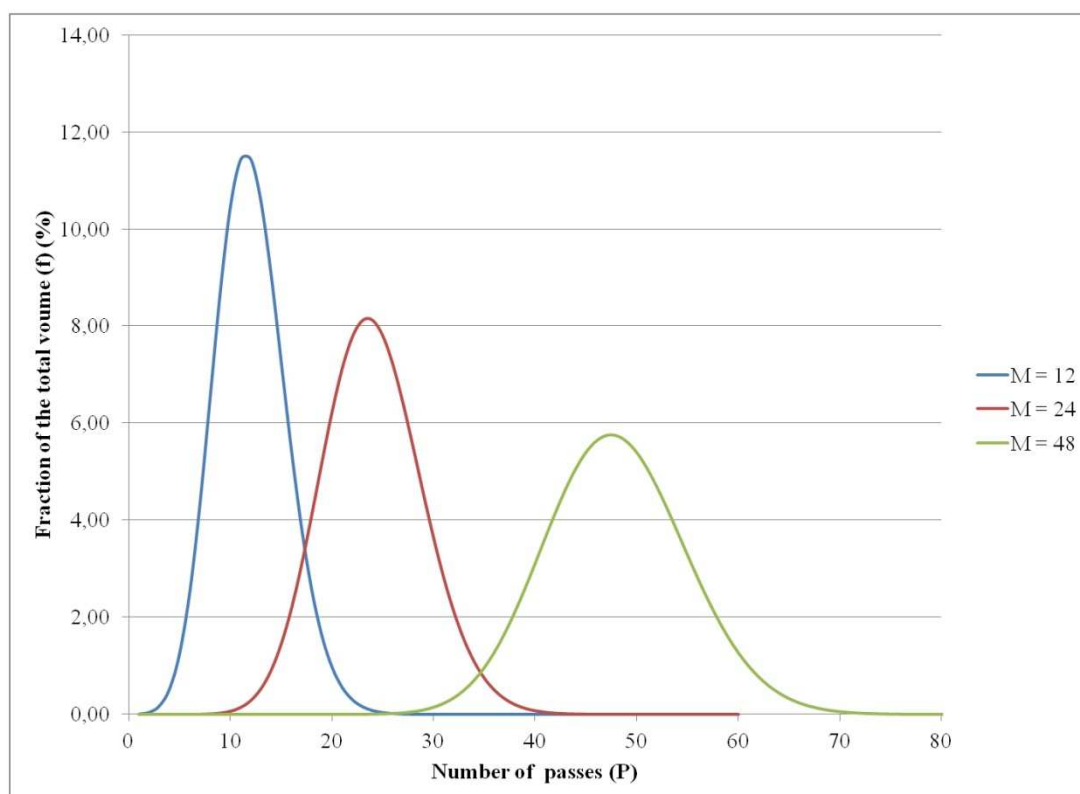


Fig. 1: Percentage of the total volume (f), which has undergone P homogenization for a theoretical number of pass of 12, 24 and 48

From these distributions, it was possible to determine a “degree of homogenization”, which corresponds to the minimum number of passes underwent by 99 % of the cellulose suspension.

The degrees of homogenization of each treatment are presented in Table 1 with the corresponding process pressures (mPa), process time (min) and theoretical number of passes.

Table 1. Pressure, process time, theoretical number of passes, degree of homogenization, and energy input / kg of cellulose for homogenization treatments applied

Samples Name (pressure MPa / homogenisation degree)	Pressure (MPa)	Process Time (min)	Theoretical number of passes (nr. passes)	Degree of homogenization (nr. passes)	Energy Input / Kg cellulose (kWh/kg)
C200 (25/4.2)	25	60	12	4.2	8.0
C200 (25/12.9)	25	120	24	12.9	16.1
C200 (25/32.1)	25	240	48	32.1	32.4
C200 (50/4.2)	50	60	12	4.2	16.1
C200 (50/12.9)	50	120	24	12.9	32.4
C200 (50/32.1)	50	240	48	32.1	64.7

5.3.2. Characterization of homogenized cellulose

Cellulose accessibility by enzymatic complex has a great influence on hydrolysis yield. Literature shows that cellulose accessibility can be mainly characterized by three physico-chemical properties : particle size, crystallinity and water retention [31].

Particle size characterizations of homogenized cellulose were performed by microscopic observations. Size characterization with the granulometer was not adapted because of the important shape factor of cellulose fibers.

Microscopic observations of the particle size of homogenized cellulose with the pressure and the degree of homogenization applied are presented in Fig. 2 and Fig. 3.

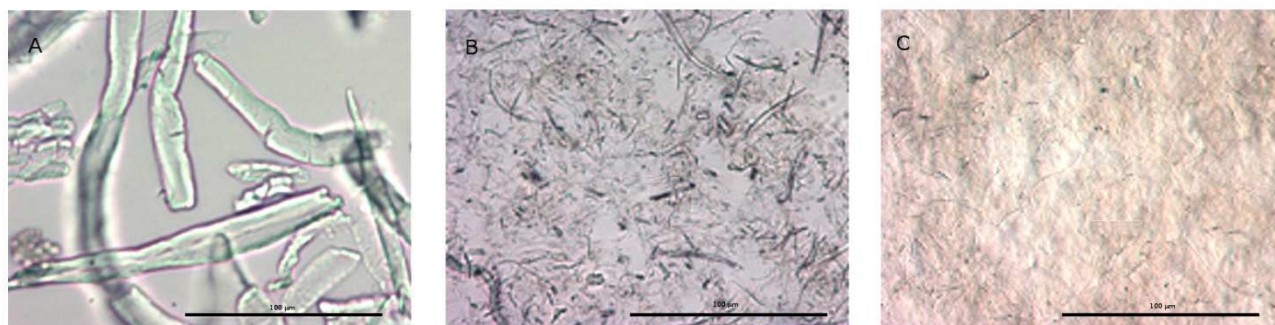


Fig. 2: Microscopic observations of cellulose particle size with pressure. a C200 cellulose, b C200 (25 MPa / 32.1 nr. passes), c C200 (50 MPa / 32.1 nr. passes), *Scale bar 100 µm*

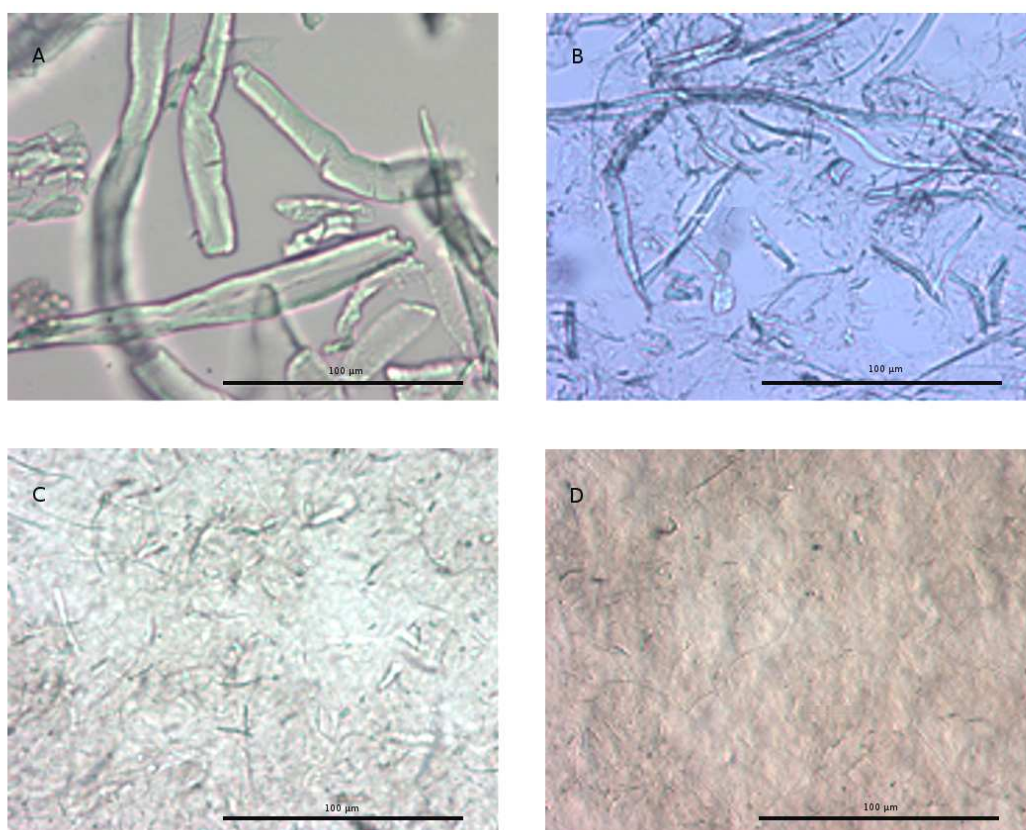


Fig. 3: Microscopic observations of cellulose particles size with the degree of homogenization, a C200 cellulose, b C200 (50 MPa / 4.2 nr. passes), c C200 (50 MPa / 12.9 nr. passes), d C200 (50 MPa / 32.1 nr. passes), *Scale bar 100 µm*

Results show that the shearing treatment has a significant impact on the cellulose fiber structure, and results in obtaining micro-fibrils suspensions. These results agree with other literature datas [23,25]. Increase of the applied pressure and degree of homogenization applied results in a progressive decrease of the fiber size, which suggest that a major surface area will be available for enzymatic attack.

A second factor that may influence the contact between the enzyme and the substrate is the cellulose crystallinity. Literature shows that enzymatic hydrolysis of the very compact and resistant crystalline region is much slower than in the amorphous regions [32,33]. In crystalline region, hydrolysis is dominated only by exo-glucanases activity whereas less compact amorphous regions are believed to be hydrolyzed by endo and exo-glucanases activities [33]. Therefore, a decrease or an increase of the cellulose crystallinity, could lead to modify the hydrolysis yield of the cellulose.

Fig. 4 presents X-ray diffraction pattern of cellulose C200 and homogenized cellulose samples.

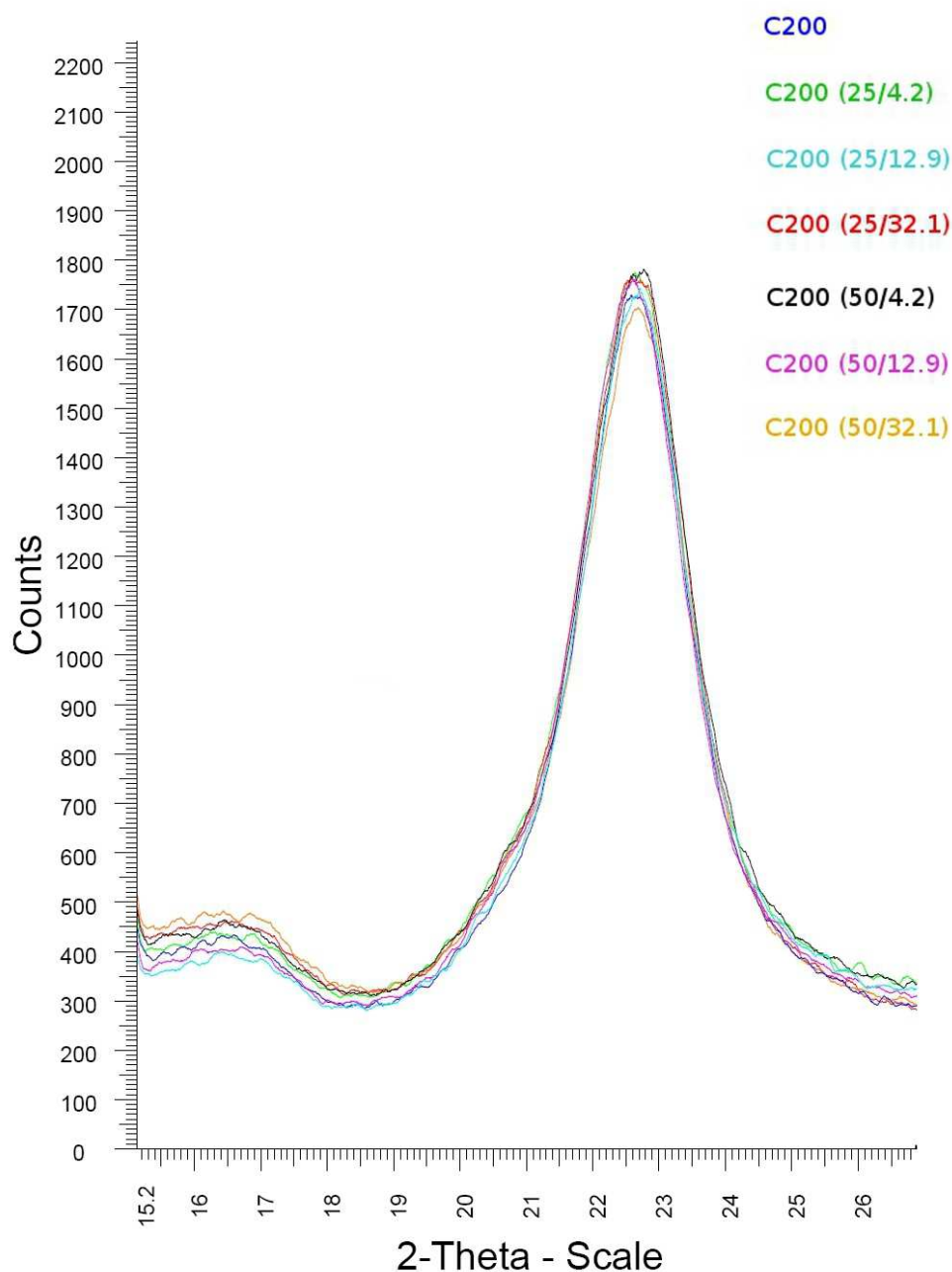


Fig. 4: X-ray diffraction pattern of cellulose C200 and homogenized cellulose

Analysis of the different pattern show many similarities in the overall crystallinity and cellulose I/cellulose II content of cellulose C200 and homogenized cellulose samples.

All samples exhibit high intensities at a scattering angle of 22.7° indicating the presence of cellulose I, which correspond to the crystalline part of the cellulose fiber [34]. The degree of crystallinity of the samples, estimated from the peak height at 22.7° and 18.5° [35,36], was

included in a narrow range from 70 to 74 %. Evolution of the ratio of scattering intensities at 22.7° and 20.4° (correlated to the cellulose I/cellulose II content) of homogenized samples were also very close to the non-treated cellulose, indicating a high constant in the crystallinity of the samples [37]. These results were in accordance with literature [38] which showed that crystallinity of homogenized cellulose obtained from the peel of prickly pear fruits did not appears to be modified by the homogenization treatment.

So, these observations confirm that cellulose crystallinity was not affected by the homogenization treatment and should not influence the cellulose hydrolysis yield.

Water retention is a further important factor affecting cellulose hydrolysis. This property is an element which contributes toward control over the accessibility of the enzymes since, to be hydrolysed by the enzymatic way, cellulose chains must be hydrated. As the fiber swells, intermolecular bonds are broken as a result of the internal stresses produced by swelling. The degree of order within the fiber is reduced and there is an increase in the specific surface available for enzymatic hydrolysis [39].

Water retention values (WRV) of raw C200 cellulose and homogenized cellulose are presented in Fig. 5.

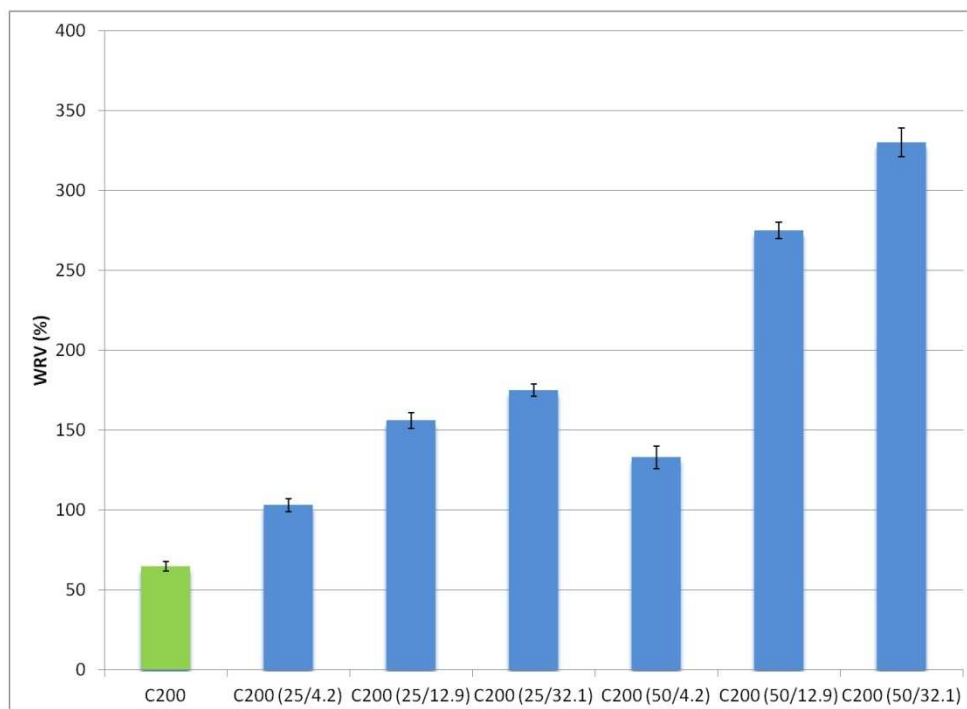


Fig. 5: Water retention values of cellulose C200 and homogenized cellulose (WRV)

Water retention values increased in an appreciable way with the pressure and degree of homogenization applied. Results suggest also that high treatment intensities (pressure: 500 bars and degree of homogenization higher than 12.9) has more significant impact on the increase of WRV (275 % for the C200(50/12.9) and 330 % for the C200(50/32.1)50). These increases of water retention values indicate, in accordance with the microscopic observations realized, an increase of specific surface coupled to a swelling by hydration of the cellulose [33,40].

5.3.3. Rheological characterization of homogenized cellulose

A last factor that may influence the contact between the enzyme and the substrate is linked to rheological properties of cellulose homogenized samples. Literature showed that homogenized cellulose suspensions developed, at the lowest concentration (0.25 % w/w), a

shear-thinning flow behaviour, and could be considered as classical pseudoplastic material [22,41].

Oscillatory stress sweep analysis was performed to characterize the rheological properties of each homogenized suspensions. Analyses show similar profile for all the samples. Fig. 6 shows the effect of oscillatory shear stress on storage modulus (G'), loss modulus (G'') and strain (δ) of an homogenized cellulose sample (C200 50/32.1). The storage modulus profile (G') is constituted of a range of stress where G' is independant of the stress applied. This part of the profile is called the linear viscoelastic region (LVR). In this region, the stress applied is in phase with the resulting strain which means that the tridimensional structure present in the sample is not broken [42]. At the end of the LVR, storage modulus is equal to loss modulus and the stress applied, which is not in phase with the resulting strain ($\delta > 0$), this indicates that the tridimensional structure is disturbed. The stress values corresponding to this point are called the critical stress (σ) [42,43].

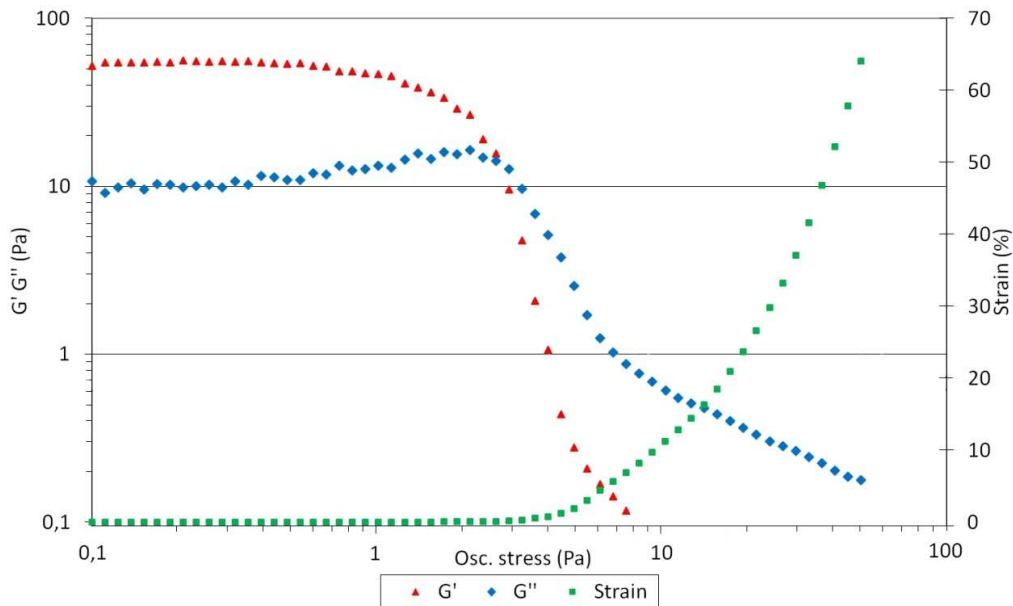


Fig. 6: Storage modulus (G'), loss modulus (G'') and strain (δ) measurement in oscillation stress sweep test (C200 50 Mpa /32.1 nr. passes)

The values of G' in LRV and σ obtained for different homogenized suspensions are summarized in Fig. 7.

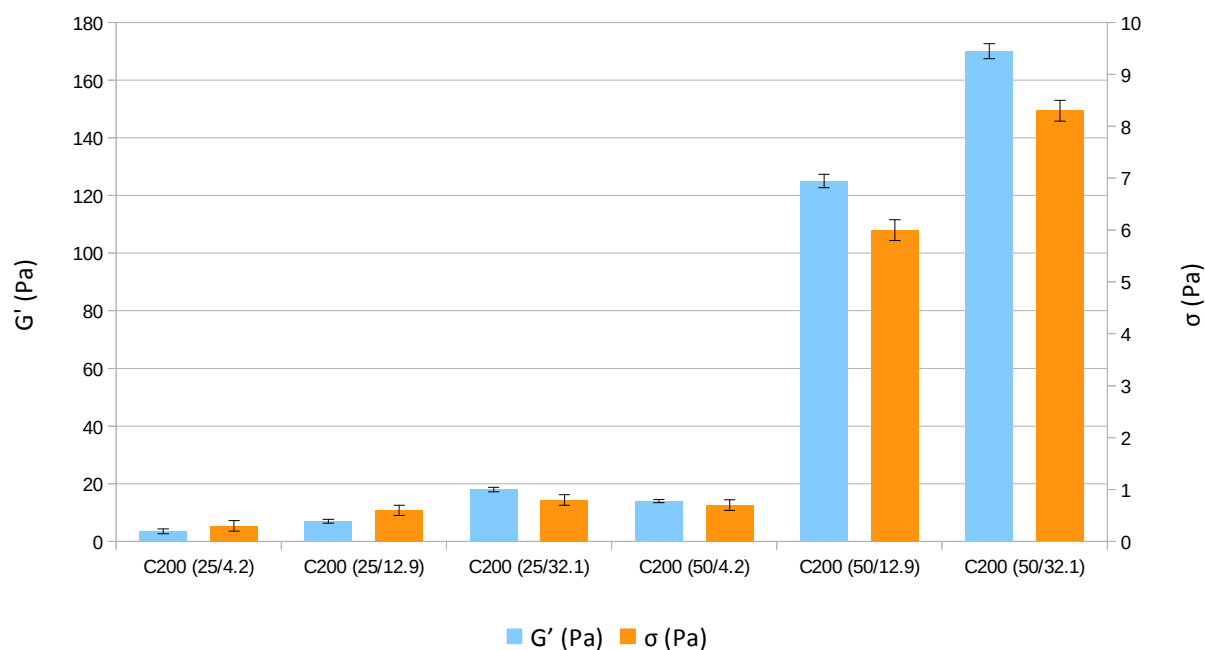


Fig. 7: G' in LRV and σ values of cellulose homogenized suspensions

These results showed that high intensity treatment was required to develop a tridimensional microfibrils network. Samples obtained below these conditions had an extremely weak storage modulus ($G' < 20$ Pa) and a very low stability ($\sigma < 1$ Pa) indicating that shearing treatments were not strong enough to produce a sufficient amount of microfibrils to develop a tridimensional network [44]. For higher intensities, an increase of values of storage modulus at LVR and critical stress were observed. This increase is in agreement with the development of a stable network in the homogenized suspension. These results could be explained by an increase of the amount of microfibrils with the shearing intensity, which allowed the formation of the tridimensional network, with as consequence a strength stability reinforcement of the hydrogel which could affect the hydrolysis step [45,46].

The results of frequency sweep tests confirm this trend. Profiles obtained for high intensities treatment showed a small gradual increase of G' and G'' with the frequency (Fig 8.). This characteristic indicated a large elastic behaviour with a comparative small dissipation of energy which confirms the presence of a tridimensionnal network stabilized by hydrogen bonds established between the surface hydroxyl groups of the cellulose microfibrils [45,46].

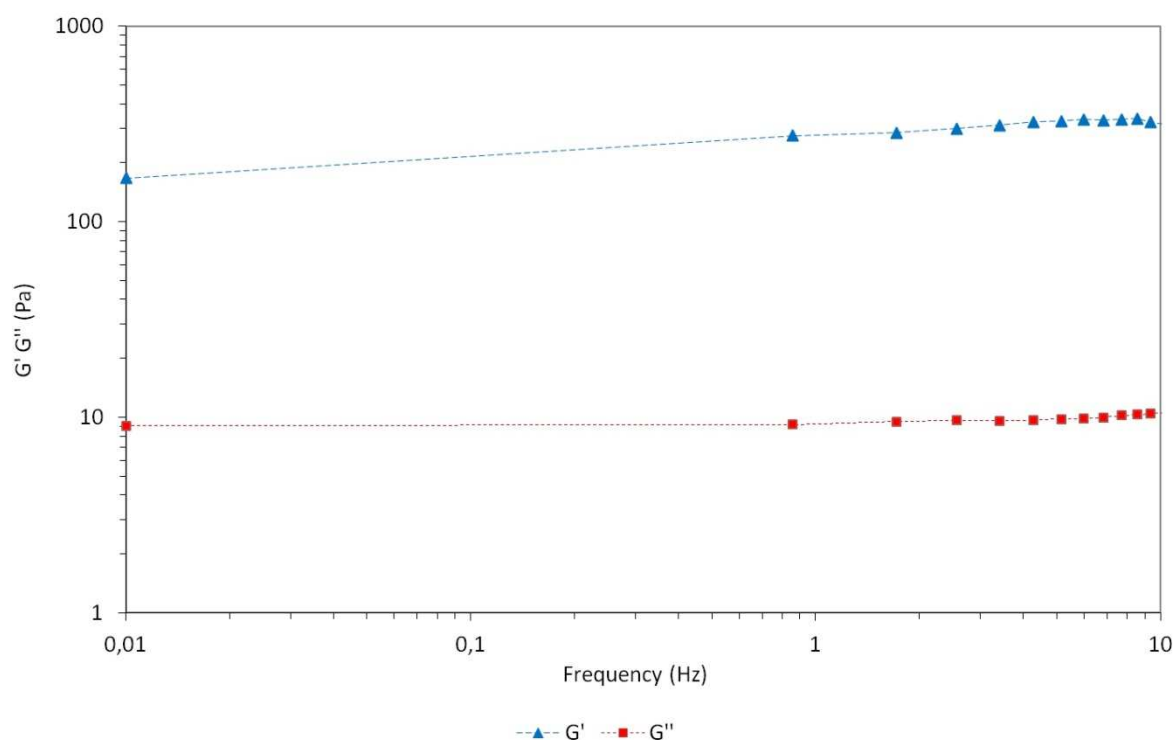


Fig. 8: Storage modulus (G') and loss modulus (G'') in frequency sweep test (C200 50/32.1)

In comparison, profiles of the storage modulus of homogenized cellulose obtained at a pressure below 500 bars with a degree of homogenization lower than 12.9 showed a quick increase of G' and G'' with the frequency (results not shown) indicating an important viscous character of the homogenized suspensions which results mainly of the steric hindrance of the cellulose structure in the sample [45,46].

5.3.4. Effect of homogenization treatment on hydrolysis yield of pure cellulose fiber

Hydrolysis yield of the different cellulose fractions obtained for each homogenization treatment were evaluated by high-performance anion exchange chromatography. Fig. 9 presents the evolution of the hydrolysis yield obtained after 24 hours for different treatment intensities.

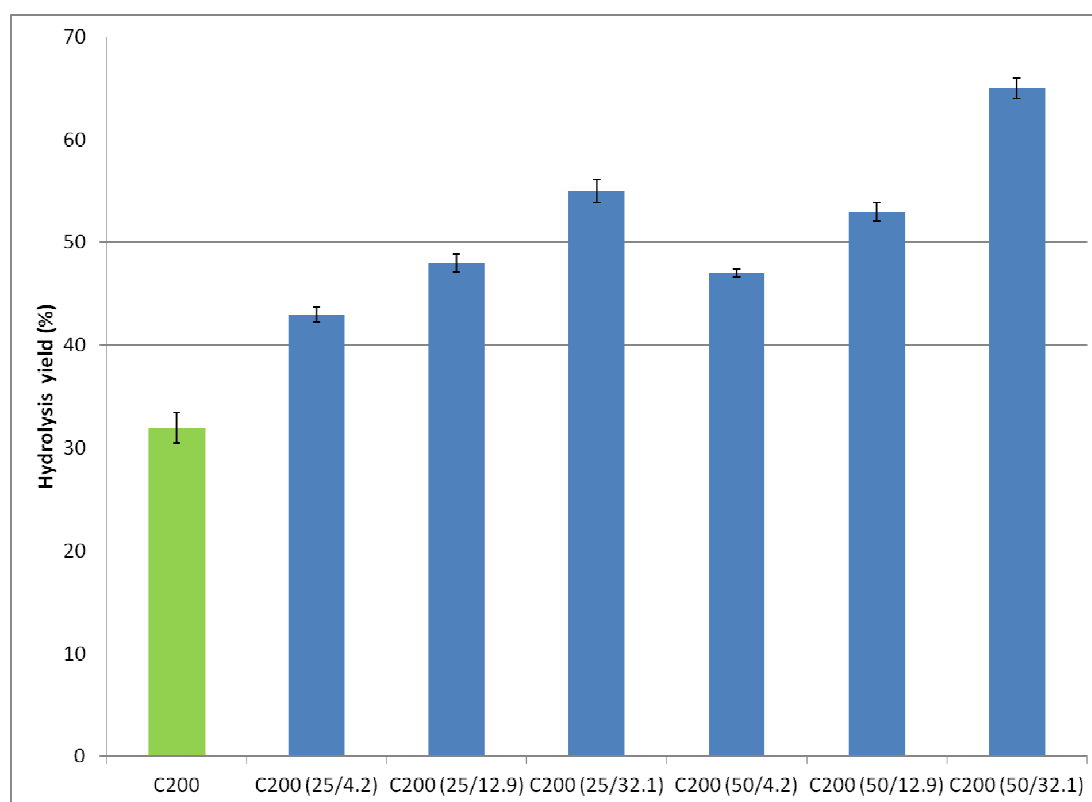


Fig. 9: Hydrolysis yield (24 h) of cellulose C200 and homogenized cellulose samples

Results obtained show that homogenization treatment influences the cellulose hydrolysis yield. The increase of the hydrolysis yield was comprised between 25 (C200(25/4.2)) and 100 percent (C200(50/32.1)) in comparison to the cellulose C200 and depended to the homogenization treatment applied. Results showed also that increasing of the cellulose hydrolysis yield is correlated to the shearing (link to the pressure applied) and the degree of homogenization applied. Comparison of these results with a similar previous study performed on the steam explosion technology, which is commonly used to pretreat the biomass,

confirmed the potential of the homogenization. Steam explosion treatment, applied on the same material with different intensities, did not appear to improve the hydrolysis yield of pure cellulose fiber [47]. In contrast, the important increase of the hydrolysis yield obtained after applying homogenization treatment reflects that accessibility of the cellulose fiber after homogenization is more important compared with those obtained via steam explosion technology and highlights the strong potential of homogenization in the pretreatment of the biomass.

Further, hydrolysis yield values obtained for each homogenized sample could be linked to the physicochemical properties described above.

For homogenized samples obtained with moderate treatment intensities C200 (25 MPa / 4.2 nr. passes), C200 (25 MPa / 12.9 nr. passes), C200 (25 MPa / 32.1 nr. passes) and C200 (50 MPa / 4.2 nr. passes), the increase of hydrolysis yield is mainly correlated to the evolution of the water retention values (Fig 10.).

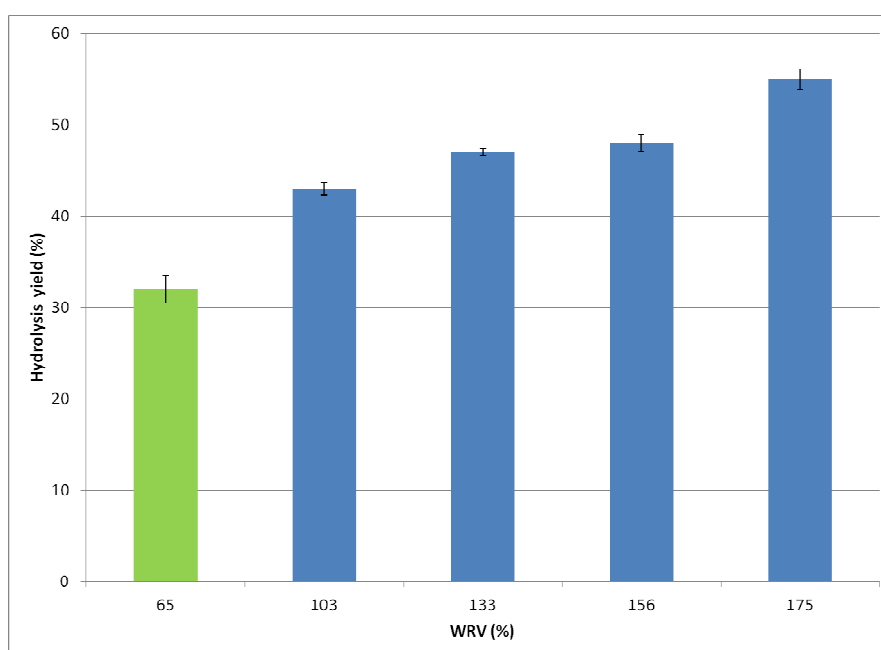


Fig. 10: Evolution of Hydrolysis yield (24 h) of cellulose C200 and homogenized cellulose samples with WRV

Water retention values could be influenced by the particle size and the pore size, which determines a specific surface area that will be accessible to the water, but also by the dimensions of the crystallites and the degree of crystallinity of the substrate [31]. In this case, it was shown that homogenization did not affect the cellulose crystallinity with consequence that water retention depend mainly on the specific surface area developed by the homogenized samples. Moreover, it was shown that homogenization treatments applied with moderate intensities were not strong enough to develop a tridimensional network which should not influence the accessibility to enzymes.

For higher treatment intensities, result showed that the important increase of the WRV observed (274 % for C200(50/12.9) and 330 % for C200(50/32.1) was not correlated to a very important increase of the hydrolysis yield. Result show even a decrease of the hydrolysis C200(50/12.9) with regard to the samples obtained at lower intensities with a lower water retention values C200(25/32.1) which suggest that the tridimensional network obtained at higher intensities affected the hydrolysis process. The stable network developed in cellulose induce a strength reinforcement of the samples structure which lead to a decrease in mobility of the cellulases molecules [45,46]. The physical contact between cellulose and cellulase molecules is a prerequisite for hydrolytic reaction. The decrease of mobility induces a decrease of the interaction between cellulases and cellulose which conduct to a slowdown of the hydrolysis process [48,49].

5.4. Conclusion

This study investigated the influence of different homogenization treatments on physico-chemical properties and hydrolysis yield of pure cellulose fiber.

The main conclusion drawn from this study was that homogenization treatments, applied on a pure cellulose fiber, under the conditions of this study, appears to improve the enzymatic hydrolysis yield and highlights the potential of homogenization as a pretreatment technology. Further, this study showed that homogenization had an impact on the physico-chemical properties of the cellulose fiber.

For moderate treatment, an increase of the water retention values of the cellulose, correlated to the hydrolysis yield was observed. Result also showed that crystalline properties remains similar for all the samples.

For higher treatments intensities, the formation of a stable network in the homogenized samples was highlighted. This network appears to induce a reinforcement of the samples structure which leads to decrease the mobility of cellulases and slowdown the hydrolysis process.

5.5. Acknowledgements

Authors are grateful for the financial support of the Walloon Region in the frame of the NACELL program (convention 031/5575), LIGNOFUEL program (convention n°716721) and TECHNOSE program (convention n°716757). Mr Maniet Guillaume, Mr Frederic Meyer and Mrs Doran Lynn are acknowledged for excellent assistance.

5.6. References

1. Heungjo, A., Wilbert, E. W. and Stephen, W. S. (2011). Biomass Bioenergy. 35, 3763-3774.
2. Sarkar, N., Ghosh, S. K., Bannerjee, S. and Aikat K. (2012). Renewable Energy, 37, 19-27.
3. Franklin, K. R., Hopkinson, A., Webb, N. and White, M. S. (2002) Patent WO/2002/032914. 280.
4. Han, S., Baigude, H., Hattori, K., Yoshida, T. and Uryu, T. (2007). Carbohydrate Polymers, 68(1), 26-34.
5. Wang, K., Jiang, J.X., Xu, F. and Sun, R.C. (2009). Polym Degrad Stab. 94, 1379-1388.
6. Sassner, P., Galbe, M. and Zacchi, G., (2008). Biomass Bioenergy. 32, 422-430.
7. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros M. and Negro M.J. (2010). Bioresour Technol. 101, 4851-4861.
8. Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M. (2008). J. Sci. Ind. Res. 67, 849-864.
9. Galbe, M. and Zacchi, G. (2007). Adv Biochem Eng Biotechnol. 108, 41-65.
10. Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. (2009). Bioresour. Technol. 100, 10-18.

11. Avellar, B.K. and Glasser, W.G. (1998). *Biomass Bioenergy*. 14, 205-218.
12. Jacquet, N., Vanderghem, C., Blecker, C. and Paquot, M. (2010). *BASE*, 14(S2), 561-566.
13. Pérez, J.A., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Sáez, F., Negro, M.J. and Manzanares, P. (2008). *Fuel* 87, 3640–3647.
14. Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R. and Lee, Y.Y. (2005). *Bioresour. Technol.* 96, 1959–1966.
15. Palonen, H., Thomsen, A.B., Tenkanen, M., Schmidt, A.S. and Viikari, L., (2004). *Appl.Biochem. Biotechnol.* 117, 1-17.
16. Schacht, C., Zetzl, C. and Brunner, G. (2008). *J. Supercrit. Fluids* 46, 299-321.
17. Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Ding, Y., Chi, R., Liao, J. and Zhang, Y. (2006). *Biosyst. Eng.* 93, 279-283.
18. Sun, R.C. and Tomkinson, R.C. (2002). *Carbohydr. Polym.* 50 (3), 263-271.
19. Floury, J., Desrumaux, A., Axelos, M., Legrand, J. (2002). *Food Hydrocolloids*. 16(1), 47-53.
20. Pandolfe, W.D. (1999) *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc.

21. Walstra, P. (1983), in Encyclopedia of emulsion technology, Vol. 1 : Formation of emulsion (Becher P.,ed.), Marcel Dekker, pp. 57-127.
22. Siro, I., Plackett, D. (2012) Cellulose, 17(3), 459-494
23. Dinand, E., Chanzy, H., Vignon, R.M. (1999). Food Hydrocolloids 13(3), 275-283.
24. Agoda-Tandjawa, G., Durand, S., Berot, S., Blassel, C., Gaillard, C., Garnier, C., Doublier, J.L. (2010). Carbohydr. Polym. 80, 677-686.
25. Bhatnagar, A., Sain, M.M. (2003). Canadian Intellectual Property Office No. 2437616.
26. Nakagaito, A.N., Yano, H. (2004). Appl. Phys. A-Mater Sci. Process 78, 547-552.
27. Habibi, Y., Mahrouz, M., Vignon, M.R. (2008). Food Chem. 115(2), 423-429.
28. Vanderghem, C., Boquel, P., Blecker, C., & Paquot, M. (2010). Applied Biochemistry and Biotechnology, 160(8), 2300–2307.
29. Ioannis, N., Konstantina, T., Stavros, M. (2006). Eur. J. Pharm. Biopharm. 63, 278-287.
30. Leviton, A., Pallansch, M.J. (1959). J. Dairy Sci. 42 (1), 20-27.
31. Vanderghem, C., Jacquet, N., Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M. (2012). Appl Biochem Biotechnol. 166 (6), 1423-1432.

32. Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V., Vlasenko, E. (1991). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 30, 43-59.
33. Yeh, A. I., Huang, Y.C., Chen, S. H. (2010). *Carbohydr. Polym.* 79, 192-199.
34. Nelson, M., L., O'Connor, R., T. (1964). *J. Appl. Polym. Sci.* 8, 1325-1341.
35. Segal, L, Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M. (1962). *Tex. Res. J.* 29, 786-794.
36. Thygesen, A., Oddershede, J., Lilholt, H., Thomsen, A.B., Ståhl, K. (2005). *Cellulose* 12, 563-576.
37. Bibin, M. C., Alcides Lopes, L., Ferreira de Souza, S., Sabu, T., Pothan L.A., Kottaisamy, M. (2010). *Carbohydr Polym.* 81, 720-725.
38. Habibi, Y., Mahrouz, M., Vignon, M.R. (2009). *Food Chem.* 115, 423-429.
39. Mantanis, G.I., Young, R.A., Rowell ,R.M. (1995). *Cellulose*, 2, 1-22.
40. Paquot, M., Thonart, P., Jacquemin, P., & Rassel, A. (1981). *Holzforschung*, 35, 87-93.
41. Azizi Samir, M.A.S., Alloin, F., Dufresne, A. (2005). *Biomacromolecules*, 6, 612-626.
42. Tabilo-Munizaga, G., Barbosa-Canovas, G.V. (2005). *J. Food Eng.*, 67, 147-156.

43. Guo, Q., Cui, S.W., Wang, Q., Douglas Goff, H., Smith, A. (2008). *Food Hydrocolloids*, 23, 1542-1547.
44. Eichhorna, S.J., Young, R.J., Davies, R.J., Riekel, C. (2003). *Polymer*, 44, 5901-5908.
45. Eriksson, R., Pajari, H., Rosenholm, J.B. (2009). *J. Colloid Interface Sci.*, 332, 104-112.
46. Rudraraju, V.S., Wyandt, C.M. (2004). *Int. J. Pharm.*, 292, 53-61.
47. Jacquet, N., Vanderghem, C., Danthine, S., Quiévy, N., Blecker, C., Devaux, J., Paquot, M. (2012). *Bioresour Technol.*, In press.10.1016/j.biortech.2012.06.073
48. Lee, S. B., Shin, H. S., Ryu, D. D. Y., & Mandels, M. (1982). *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2137–2153.
49. Stone, J. E., Scallan, A. M., Donefer, E., & Ahlgren, E. (1969). *Adv. Chem. Ser.* 95, 219–307.

CHAPITRE VI

IMPROVEMENT OF THE CELLULOSE HYDROLYSIS YIELDS AND HYDROLYSATE CONCENTRATION BY MANAGEMENT OF ENZYMES AND SUBSTRATE INPUT

Adapted from: Nicolas Jacquet, Caroline Vanderghem, Christophe Blecker, Paul Malumba, Frank Delvigne, Michel Paquot. (2012). Improvement of the cellulose hydrolysis yields and hydrolysate concentration by management of enzymes and substrate input. *Cerevisia*. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cervis.2012.10.002>

Le dernier axe stratégique du doctorat s'est focalisé sur la thématique de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose modèle.

Cet axe se justifie suite à l'étude menée sur les prétraitements à l'échelle pilote ; prétraitements à la suite desquels se sont ajoutés des problèmes pratiques notamment au cours des phases d'hydrolyse des échantillons prétraités (rendement par unité d'enzyme insuffisant, concentration des hydrolysats trop faible). Ces problématiques sont actuellement des éléments majeurs qui limitent les potentialités d'hydrolyse enzymatique en termes d'une part de faisabilité économique et d'autre part en termes de transposition industrielle.

Le chapitre VI reprend les résultats d'une étude menée pour répondre à cette problématique. L'étude montre qu'il est possible d'optimiser les rendements d'hydrolyse par unités de substrat ainsi que la concentration des hydrolysats obtenus en gérant les ajouts d'enzyme et de substrat en cours d'hydrolyse. La fin du chapitre aborde également l'évolution de la viscosité des hydrolysats en fonction des différentes quantités de substrat et d'enzymes ajoutés en cours d'hydrolyse.

Abstract

In order to improve the hydrolysis of cellulose fiber and to obtain highly concentrated hydrolysate, two methods based on successive addition of enzyme and substrate were assessed.

The first method, which required only substrate addition, allowed to increase by 50 % the hydrolysate concentration and to decrease by 30 % enzyme units needed.

The second method highlighted the ability to reach very highly concentrated hydrolysate (up to 170 g/l) by simultaneous addition of enzyme and substrate.

In parallel, relationships between some limiting factors and the yields of hydrolysis were investigated. To conclude, viscosity evolution of cellulose suspension during hydrolysis step was investigated in the aim to improve the management of enzyme and substrate addition.

Keywords

Cellulose, Enzymatic hydrolysis, Hydrolysis yields, Concentration, Cellulase.

6.1. Introduction

Over the past decades, a great amount of research interest and effort was focused in the area of lignocellulose bioconversion in many diversified sectors such as bioenergy and biomaterials production (Hahn-Hagerdal et al., 2006). Cellulose, the major part of the lignocellulosic substrate, is a linear polymer composed of D-glucose links together by β -1,4-glycosidic bonds (Knauf and Moniruzzaman, 2004). Saccharification of cellulose leads to individual glucose units, which could be fermented to produce different products such as fuel ethanol (Olsson and Hahn-Hagerdahl, 1996), organic acids (Luo et al., 1997), and other chemicals (Cao et al., 1997.).

In this way, cellulases play a significant role in the process by catalyzing the hydrolysis of cellulose to fermentable sugars (Menon and Rao., 2012). Cellulose enzymatic hydrolysis is generally preferred and show distinct advantages over acid-catalyzed hydrolysis methods (higher hydrolysis yields, mild process conditions, few hazardous and waste disposal problems, low cost utilities which require non expansive corrosion-resistant reactors) (Zhang and Lynd, 2004; Pan et al., 2005; Li and Zhao, 2007; Li et al. 2008) which make it a technology of choice for the future bio-fuels and bio-materials production (Menon and Rao., 2012).

However, literature showed that cellulose enzymatic hydrolysis encounters several problems which could be divided into substrate and enzyme related difficulties (Vanderghem et al. 2012). Substrate related difficulties were essentially linked to the lignocellulosic materials structure which must be submitted to a pretreatment in order to increase the accessibility of the cellulosic fraction (Jacquet et al. 2011). For enzyme, the high cost of cellulase is the critical factor which often hinders large scale application (Chen et al., 2008).

In the past decade, many studies were conducted with the objective to reduce the amounts of enzyme used during the hydrolysis step (Menon and Rao., 2012). These studies shown that a

first way to decrease the amounts of enzymes used was to improve the yield of the enzymatic hydrolysis by optimizing the hydrolysis conditions process, increasing the cellulase activities, enhancing the enzyme complex substrate cocktail composition... (Berlin et al., 2005; Gusakov et al., 2007; Zhou et al., 2009). It has been shown that the yield of enzymatic hydrolysis of cellulose is mainly affected by the initial substrate concentration but also by the concentration of hydrolyzed products such as glucose and cellobiose (Tomme et al., 1995).

The continuous de recovery and recycling of enzyme used was a parallel strategy to reduce the amount of enzyme needed for a process. A method widely investigated to recycle cellulase during the saccharification of lignocellulosic materials was ultrafiltration (Knutsen and Davis, 2004, Vanderghem et al. 2010]. An other recovery method consists on simple solid/liquid separation using a large-pore vacuum filtration unit for recovering active cellulase bound to the solid substrate (Knutsen and Davis, 2004]. Recently, a method was developed by Vanderghem et al. (2010) to enhance the cellobiose production with a process which used the capability of some cellulases to bind their substrate. The approach consisted on a multistage removal of filtrate via a vacuum filtration and re-suspension of the retentate. The remaining solid was further hydrolyzed by enzyme bound to the substrate during the first step of the process, without additional new enzyme loading.

However, despite intensive research over the few past decades, the enzyme hydrolysis step remains a major technico-economical challenge in the way of biomass conversion (Menon and Rao., 2012). The purpose of this study is a part of this challenge and aims to address new methods to improve the hydrolysis of lignocellulosic materials and to obtain highly concentrated hydrolysate. A first method presented in this paper allows to improve the yield of hydrolysate by addition of substrate during hydrolysis step. The second method consists on

a continuous and simultaneous addition of enzyme and substrate during the hydrolysis step in order to obtain high concentration of hydrolysate.

In parallel, relationships between hydrolysis inhibition factors and hydrolysis yields were investigated for each process and the viscosities of the resulting hydrolysates were determined.

6.2. Material and Methods

6.2.1. Cellulose and Cellulase materials

Cellulose fiber used in this study (from Mikro-Technik GmbH & Co., KG, Germany) was obtained from wood pulp and purified from hemicelluloses and lignin. The average fiber size is around 200 μm in length with a diameter of 30 μm and a moisture content of 8%. As presented in Jacquet et al. (2012) the crystalline proportion of this product was 72 %.

Cellulose was enzymatically hydrolyzed by cellulase and cellobiase mixture (*Trichoderma reesei* ATCC 26921, Celluclast® 1.5 L, 30 FPU/ml and *Aspergillus Niger*, Novozym 188, 295 CBU/ml) purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

6.2.2. Cellulose Hydrolysis

Hydrolysis took place in 250 ml capped Duran bottles incubated in a water bath equipped with a submersible magnetic stirrer (2mag MIXdrive 6, Germany, 400 rpm) at 52 °C. Cellulose (100 g/l) was suspended in citrate buffer (0.05 M, pH 4.8) with a first applied enzyme loading (25 FPU, Celluclast® 1.5 L, and 123 CBU, Novozym 188) for 2 hours. 100 g/l was the maximal cellulose concentration value that could be achieved at the beginning of hydrolysis to maintain an homogeneous agitation. Novozym 188 addition was performed to limit cellobiose accumulation in the hydrolysate and enhanced the glucose production.

After this step, continuous additions of substrate and enzyme were performed every 2 hours.

In the first process (process 1), successive additions of 40 g/l of cellulose were made in the first times of process and reduced to 20 g/l at the end of the hydrolysis, consecutively to the high viscosity developed in the hydrolysate.

In a second process (process 2), 60 g/l of cellulose was added in a first time. The amount added was reduced to 40 g/l and then to 20 g/l at the end of the hydrolysis. The substrate addition was coupled to enzyme loading to maintain a constant ratio enzyme / substrate added (1 FPU/g (Celluclast® 1.5 L) and 4,9 CBU/g (Novozym 188)).

To finish, a continuous hydrolysis (cellulose 100 g/l, 25 FPU, Celluclast® 1.5 L, and 123 CBU, Novozym 188) was conducted over a 24 hours period to be used as reference.

Table 1 summarizes the evolution of substrate concentration added and enzyme addition during hydrolysis for each process.

Table 1: Evolution of cumulative substrate and enzyme amount added in fraction mixture

Time (h)	Process 1					Process 2				
	Cumulative added substrate (g/l)	Enzyme		Enzyme/Substrate		Substrate (g/l)	Enzyme		Enzyme/Substrate	
		Celluclast® 1.5 L (FPU)	Novozym 188 (CBU)	Celluclast® 1.5 L (FPU)/g	Novozym 188 (CBU)/g		Celluclast® 1.5 L (FPU)	Novozym 188 (CBU)	Celluclast® 1.5 L (FPU)/g	Novozym 188 (CBU)/g
0	100	25	123	1	4.92	100	25	123	1	4.92
2	140	25	123	0.72	3.52	160	40	196.8	1	4.92
4	180	25	123	0.56	2.74	220	55	270.6	1	4.92
6	220	25	123	0.45	2.23	280	70	344.4	1	4.92
8	240	25	123	0.42	2.05	340	85	418.2	1	4.92
10	260	25	123	0.38	1.89	400	100	492	1	4.92
12	260	25	123	0.38	1.89	460	115	565.8	1	4.92
14	260	25	123	0.38	1.89	520	130	639.6	1	4.92
16	260	25	123	0.38	1.89	560	140	688.8	1	4.92
18	260	25	123	0.38	1.89	580	145	713.4	1	4.92
20	260	25	123	0.38	1.89	600	150	738	1	4.92
22	260	25	123	0.38	1.89	600	150	738	1	4.92
24	260	25	123	0.38	1.89	600	150	738	1	4.92

6.2.3. Inhibition by hydrolysis products

Hydrolysis product inhibition test was performed in 250 ml capped Duran bottles. Cellulose (100g/l) was incubated in citrate buffer (0.05 M, pH 4.8) at 52 °C. Stirring was continuously performed with a stir bar at 400 rpm. Prior to enzyme loading (25 FPU (Celluclast® 1.5 L), 123 CBU (Novozym 188)), various amounts of D-Glucose (Sigma Aldrich) were added to samples in order to reach the concentration 1, 5, 10, 50, 100 and 200 gram glucose/ per liter. A continuous hydrolysis was then conducted over a 24 hours period.

6.2.4. Analysis of cellulose hydrolysate products and determination of hydrolysis yield

Samples obtained at the end of the hydrolysis were filtered (0.45 µm). Separation and quantification of hydrolysis products (glucose, cellobiose) were performed using a high-performance anion exchange chromatography mounted with a CarboPac PA100 column set (guard and analytical) coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD, ICS-3000) (Dionex, Sunnyvale, USA) (solvent A: 100 mM NaOH; solvent B: 600 mM CH₃COONa and 100 mM NaOH; solvent C : 500 mM NaOH; solvent D : distilled water) as presented by Vanderghem et al. (2012).

The cellulose conversion to glucose and cellobiose were calculated using the following equation (Eq 1.) described by Vanderghem et al. (2010).

$$\text{Hydrolysis yield (\%)} = \left(\frac{\text{Glucose produced} + 1.053 \times \text{cellobiose produced}}{\text{Total amount of glucose in the pretreated biomass}} \right) \times 100$$

(Eq 1.)

6.2.5. Viscosity measurement during hydrolysis step

Samples used for viscosity measurements were prepared in 250 ml capped Duran. Cellulose (100g/l) was incubated in citrate buffer (0.05 M, pH 4.8) at 52 °C. Stirring was continuously performed with a stir bar at 400 rpm. Four additions of cellulose (50 g/l) and enzyme (1 FPU/g (Celluclast® 1.5 L) and 4,9 CBU/g (Novozym 188)) were performed every 2 hours. Hydrolysate used for measurements has been withdrawn just before enzyme and substrate addition. A Bohlin CVO120 controlled stress rheometer (Malvern, Worcestershire, United Kingdom) fitted with a rotary upper cone (diameter : 40 mm, angle : 4%) and a fixed lower plate (diameter : 60 mm), connected to a circulating water bath (Julabo, Germany) was used for this study. Samples were loaded on the rheometer plate and silicon oil was placed on the probe periphery to prevent side effects. The gap closure was fixed at 150 µm. Viscosity measurement were then conducted over a range of shearing rate to 0.1 and 1 Pa.s at a constant temperature of 20°C.

6.3. Results and Discussion

6.3.1. Management of substrate and substrate/enzyme input

The main purpose of these experiments was to upgrade the production of hydrolysis products with a minimum of enzyme loading and to obtain highly concentrated hydrolysate.

Time courses of hydrolysis product and total substrate added during enzymatic reaction for the various processes are presented in Fig. 1 and 2. Concentration of hydrolysis product was established on basis of glucose concentration (which represents over 98% of total hydrolysis products) and cellobiose concentration (less than 2% of the hydrolysis products).

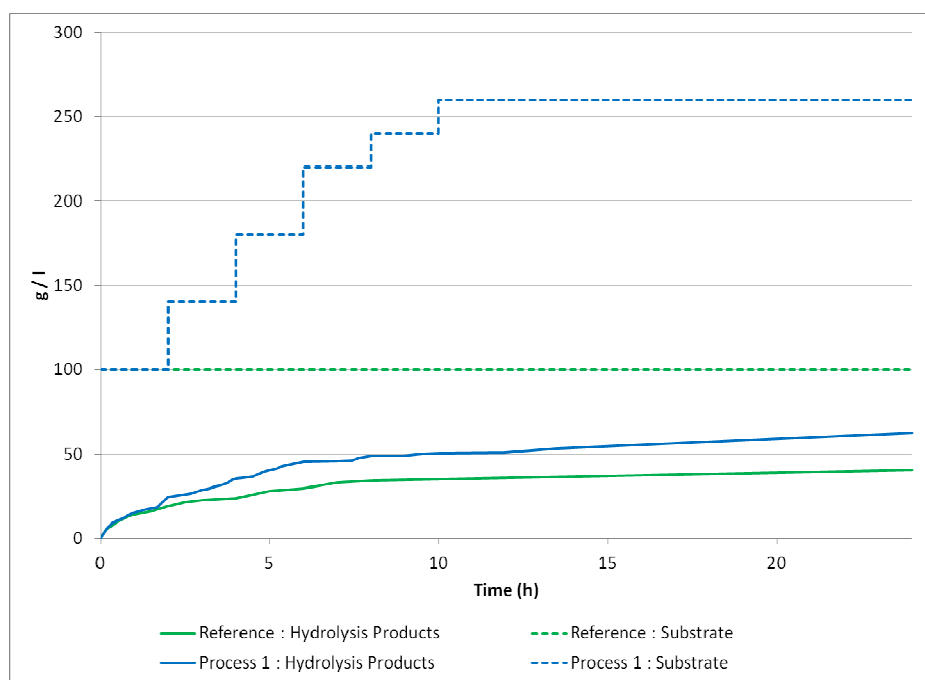


Fig. 1: Time course of hydrolysis products and total substrate added during enzymatic reaction (process 1)

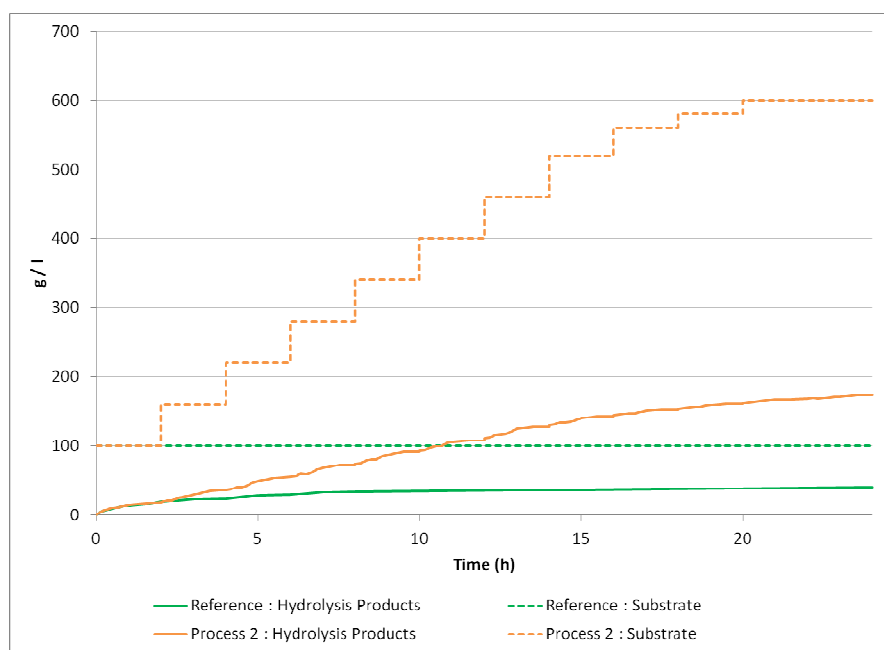


Fig. 2: Time course of hydrolysis products and substrate added during enzymatic reaction (process 2)

Fig 1 concerns the influence of an increase of substrate during the hydrolysis step and Fig 2. is related to the influence of the increase of both substrate and enzymes.

Similar conditions of hydrolysis during the two first hours lead to a constant increase of the concentration of hydrolyzed products for the reference, process 1 and process 2.

After this time, significant differences were highlights. For reference test, where cellulose concentration remained constant (100 g/l) during whole hydrolysis process with no more enzyme addition, time courses showed an important decrease of production rate after the two first hours (9,5 g/lh at 2-h, 6 g/lh at 4-h, 4,8 g/lh at 6-h and 4,2 g/l at 8-h) and reached a final concentration of 40 g/l at the end of the process.

In contrast, profile of process 1, which received only substrate input during hydrolysis, showed a regular increase of hydrolyzed product during the first five hours, time whereas a concentration of 50 g/l was reached. After this time, an important decrease of production rate was observed and lead to a final concentration of 62 g/l.

Finally, process 2 has the most significant difference. Simultaneous input of enzyme and substrate leads to a continuous increase of hydrolysis products concentration during the first fifteen hours. At this time, a value of 130-140 g/l was reached. A slight decrease of production rate was then observed. At the end of 24 hours, process 2 lead to very high concentration of hydrolyzed products with a final concentration of 173 g/l.

The Figure 3, 4 and 5 presents the concentration of hydrolyzed product at the end of processes, the units of enzyme used by amounts of hydrolysis product and hydrolysis yield obtained after 24 hours.

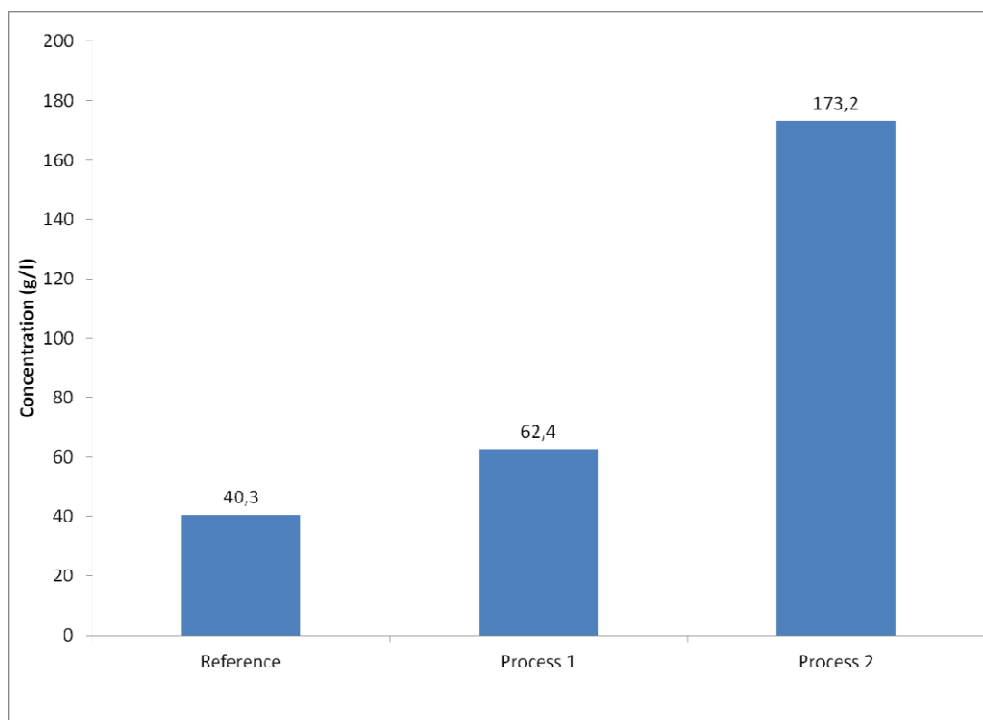


Fig. 3: Hydrolysate concentration obtain for references, process 1 and 2 after 24 hours

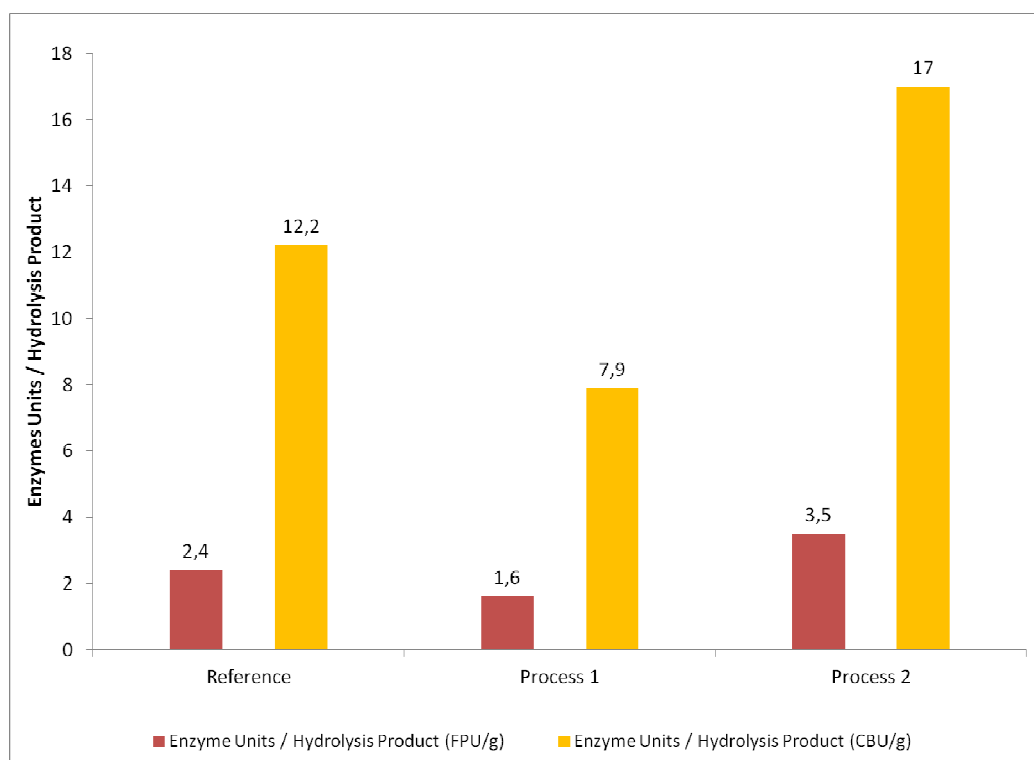


Fig. 4: Units of enzyme used by gram of hydrolysis product obtain for references, process 1 and 2 after 24 hours

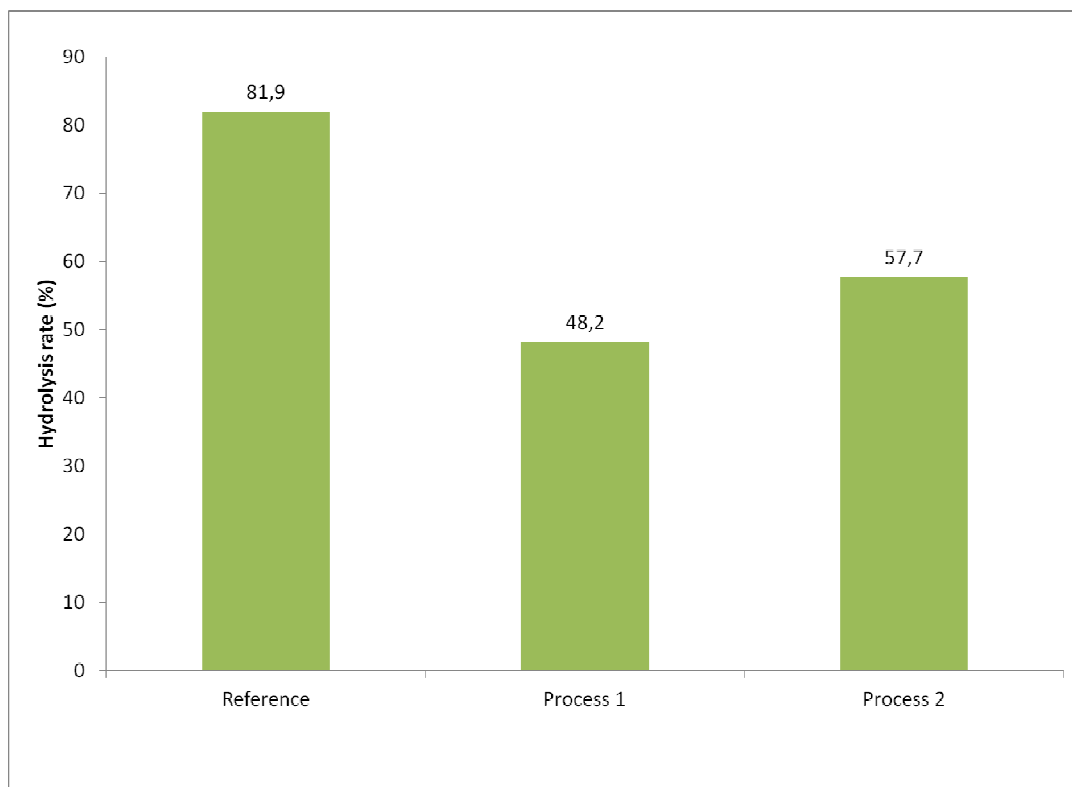


Fig. 5: Hydrolysis yield obtain for references, process 1 and 2 after 24 hours

It can be seen that the highest hydrolysate concentration was obtained for process 2. Moreover, ratio enzyme unit/gram of hydrolysed product was higher than in reference and process 1. However, For process 1 and 2, results showed also that hydrolysis yield was lower than in reference. It should be noted that last addition of enzymes and substrate was performed late in the process 2 (20 hours). An increase of hydrolysis time (higher than 24 hours) should contribute to increase the efficiency of process 2 with an increase of the hydrolysis yield and a better enzyme units / hydrolysis product ratio.

The best ratio enzyme units / hydrolysis product was obtained with the process 1, which presents also a better hydrolysate concentration than reference, nevertheless the lowest hydrolysis yield observed because of a partial lower conversion of the total amount of substrate used during the hydrolysis step.

6.3.2. Influence of limiting factors

To explain the various hydrolysis behaviors observed during previous hydrolysis process, parameters which limited the hydrolysis process were investigated.

Literature identified various factors which limited the enzymatic hydrolysis: thermal inactivation, mechanical inactivation, adsorption of cellulase on the substrate, decrease of the accessibility of the substrate, inhibition by hydrolysis product, etc. (Gan et al. 2003).

For this study, inhibition of the hydrolysis process by thermal and mechanical activation still limited as all hydrolysis experiments were performed at 52°C. Indeed, measuring the inactivation of a cellulase complex of *Trichoderma reesei* after a thermal pretreatment performed during 5 h in the range from 37 to 80°C, Andreaus et al. (1999) shown that cellulase activity was slightly reduced between 37 and 55°C. An important decrease of activity is observed for temperature higher than 60°C.

Regarding mechanical inactivation, Ganesh et al. (2000) found that fluid agitation shear stress induce a decrease of the cellulase complex activity. The study, performed in a cylindrical vessel wherein agitation was provided by means of a straight six bladed turbine impeller of 15 mm diameter, showed that agitation increase (from 400 to 2000 rpm) enhanced the desactivation of cellulase. Below 400 rpm, activity of enzyme was not affected.

In the case of our study, it therefore appears that enzymatic hydrolysis could be mainly limited by three main factors: inhibition by hydrolysis product, cellulase adsorption, substrate accessibility.

Further, suspension viscosity is also an additional factor which affect the homogeneous agitation of the suspension and thereby, the technical feasibility of the hydrolysis process.

It is well known that cellobiose, glucose, or combination of both products inhibit cellulose activities. Despite numerous studies on the subject, inhibition mechanism by hydrolysis product is still unclear. Some patterns suggested that competitive inhibition was dominant (Gregg and Saddler. 1996). Some authors argued that non-competitive inhibition was observed (Holtzapple et al. 1984), while other studies reported a combination of both inhibitions (Gusakov and Sinitsyn. 1992).

In the condition of this study, a first observation which affect the hydrolysis inhibition concern the cellobiose production. Results showed that cellobiose amount obtained at the end of hydrolysis, are very low (below 5 % of the total amount of hydrolysis product) (results not shown). This low amount of cellobiose is consecutive to the important cellobiase units present in the hydrolysate. Kastel'yanos et al. (1995) found that cellobiose inhibited mainly endoglucanase and cellobiase whereas glucose inhibited mainly cellobiase activity. This low amount of cellobiose should not impact the production rate and limited the inhibition phenomenon to the glucose inhibition.

Figure 6 presents the impact of various concentrations of glucose on cellulose hydrolysis yield.

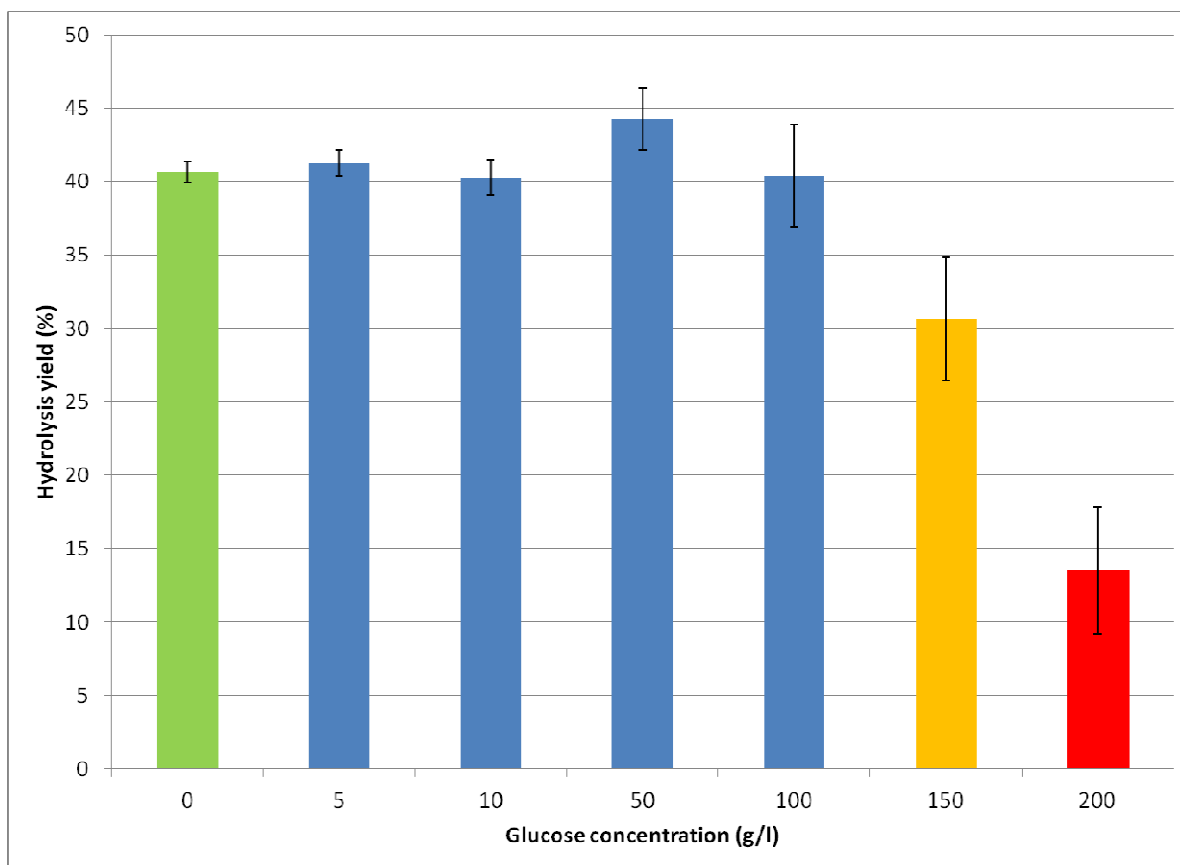


Fig. 6: Cellulose hydrolysis yield with various initial concentrations in glucose

When initial glucose concentration was below 100 g/l, results showed that hydrolysis yield of standard cellulose and hydrolyzed samples were in a range of 40 to 44 %. For higher glucose concentration, a decrease of the hydrolysis yield was observed (30 % for 150 g/l and 13 % for 200 g/l).

A conclusion drawn from these results is that glucose did not appear to decrease the hydrolysis properties of pure cellulose fibers when the glucose concentration is below 100 g/l. For higher concentration, results showed an important decrease of hydrolysis yield.

This result could be linked to the time courses profiles obtained for the process 2, where the hydrolysis yield seems to decrease when high concentrations of glucose were accumulated in the suspension. Further, the continuous addition of enzyme and substrate performed during

process 2 should limited the inhibition induced by cellulase adsorption and substrate accessibility.

For process 1 and reference, concentration reached at the end of the hydrolysis was below 100 g/l, which means that inhibition by hydrolysis product still limited. For these processes cellulase adsorption and the substrate accessibility were other factors which could explain the decrease of production rate.

Several studies have shown that crystallinity is a main factor which affect the cellulose accessibility during enzymatic attack (Sinitsyn et al. 1991; Yeh et al. 2010). Crystalline region of cellulose are very compact, resistant and present a fairly small specific surface area whereas amorphous cellulose have a large surface area accessible to enzyme (Sinitsyn et al. 1991). Further, hydrolysis of crystalline region is dominated only by exo-glucanases activity whereas less compact amorphous regions are believed to be hydrolyzed by endo and exo-glucanases activities (Yeh et al. 2010).

Literature relates also that cellulose crystallinity could be modified during the hydrolysis step. Vanderghem et al. (2012) showed that crystallinity of the paper pulp slightly increased after a multistage hydrolysis. This modification of the cellulose crystallinity during the hydrolysis step impacts cellulose accessibility and conducted to decrease the hydrolysis yield.

For reference hydrolysis, results obtained suggest the hydrolysis step is limited in a first time by the cellulose accessibility. The decrease of production rate observed after the two first hours coupled to the high crystallinity index of cellulose C200 (70 %) suggested that the more accessible cellulose, represented by the amorphous region, was preferentially attacked. After this delay, hypothesis was that residual cellulose, composed by crystalline regions, was very compact and resistant to enzymatic hydrolysis (Sinitsyn et al. 1991).

For process 1 continuous addition of substrate limited the impact of the substrate accessibility and lead to maintain the production rate at a constant level during five hours. After this time,

the further decrease of production rate was not induced by hydrolysis product or substrate accessibility. Inhibition observed at this time was mainly correlated to cellulase adsorption.

6.3.3. Viscosity evolution of hydrolysate during hydrolysis step

For highly concentrated suspensions, viscosity developed by cellulose is an important factor which could affect agitation and limit the enzyme diffusion. In this context, we investigated the evolution of viscosity properties of hydrolysate during the hydrolysis step.

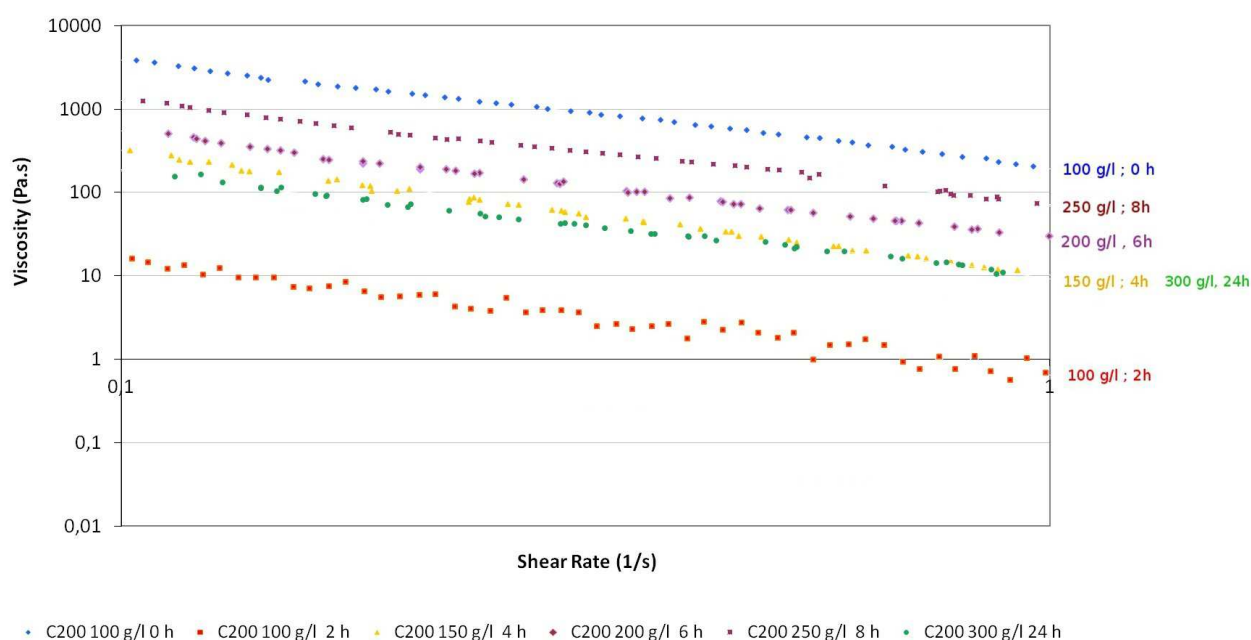


Fig. 7: Viscosity measurement of concentrated hydrolysate during hydrolysis

Figure 7 shows that enzymatic hydrolysis has a significant influence on the evolution of the viscosity of hydrolysate. Before hydrolysis, initial cellulose suspension (concentration: 100 g/l) presented a very high viscosity (4000 Pa.s at 0.1 s^{-1}) which induce difficulties to perform homogeneous agitation and therefore, limited the initial concentration of cellulose in the suspension.

After the first 2 hours, the hydrolysis of cellulose induced a significant decrease of the viscosity of the suspension (15 Pa at $0,1 \text{ s}^{-1}$) and allow the possibility of adding new substrate material to increase the concentration of hydrolysate. Values obtained after 4, 6 and 8 hours of hydrolysis, with addition of new substrate material showed an increase of hydrolysates viscosity with the concentration (400 Pa.s at $0,1 \text{ s}^{-1}$ for 150 g/l, 750 Pa.s at s^{-1} for 200 g/l and 1200 Pa.s at s^{-1} for 250 g/l). After 24 hours of hydrolysis without further addition of substrate after 8 hours, viscosity of the hydrolysate was stabilized at a moderate value of 300 Pa.s at $0,1 \text{ s}^{-1}$ for a final concentration in substrate of 300 g/l which should allow an easy used of the concentrated hydrolysate during the various downstream processes.

6.4. Conclusion

This study has been focused on two processes for the improvement of cellulose hydrolysis.

The first process, based on a continuous addition of substrate during hydrolysis, allow to increase by 50 % the concentration hydrolyzed products and to reduce significantly enzymes units needed. The second method, which consisted in a continuous and simultaneous addition of enzyme and substrate during the hydrolysis step lead to very highly concentrated hydrolysates (170 g/l). For all these processes, it has been shown that various limiting factors could decrease the hydrolysis yield and affect the rheological properties of hydrolysate. For the first process, cellulase adsorption seems the main limiting factor whereas substrate accessibility seems to be predominant in standard hydrolysis. For the second process, inhibition by hydrolysis product would contribute to decrease the production rate at the end of hydrolysis. It was also observed that the viscosity is a critical parameter which could limits the feasibility of processes that would aim to increase the concentration of hydrolyzed products by successive addition of new substrate material.

6.5. Acknowledgements

Authors are grateful for the financial support of the Walloon Region in the frame of the LIGNOFUEL program (convention n°716721) and TECHNOSE program (convention n°716757). Mr Frederic Meyer and Me Doran Lynn are acknowledged for excellent assistance.

6.6. References

Andreas, J., Azevedo, H., Cavaco-Paulo, A., 1999. Effects of temperature on the cellulose binding ability of cellulase enzymes. J. Mol. Catal. B : Enzym. (7), 233-239.

Berlin, A., Gilkes, N., Kurabi, A., Bura, R., Tu, M.B., Kilburn, D., 2005. Weak lignin binding enzymes - a novel approach to improve the activity of cellulases for hydrolysis of lignocellulosics. Appl. Biochem. Biotechnol. (121), 163-170.

Cao, N., Xia, Y., Gong, C., Tsao, G., 1997. Production of 2,3-butanediol from pretreated corn cob by *Klebsiella oxytoca* in the presence of fungal cellulase. Appl. Biochem. Biotechnol. (63-5), 129-139.

Chen, M., Zhao, J., Xia, L., 2008. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. Carbohydr. Polym. (71), 411-415.

Gan, Q., Allen, S.J., Taylor, G., 2003. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose : an overview, an experimental study and mathematical modeling. Process Biochemistry (38), 1003-1018.

Ganesh, K., Joshi, J.B., Sawant, S.B., 2000. Cellulase deactivation in a stirred reactor. Biochem. Eng. J. (4) 137-141.

Gregg, D.J., Saddler, J.N., 1996. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol. Bioeng.* (51) 375-383.

Gusakov A.V., Salanovich T.N., Antonov A.I., Ustinov B.B., Okunev, O.N., Burlingame, R., 2007. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotech. Bioeng.* (97), 1028-1038.

Gusakov, A.V., Sinitsyn, A.P., 1992. A theoretical analysis of cellulose product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and b-glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. Bioeng.* (40). 663-671.

Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M., Liden, G., & Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol, the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* (24), 549-556.

Holtzapple, M.T., Caram, H.S., Humphrey, A.E., (1984). Determining the inhibition constants of the HCH-1 model of cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* (26), 753-757.

Jacquet, N., Quiévy, N., Vanderghem, C., Janas, S., Blecker, C., Wathelet, B., Devaux, J. Paquot, M., 2011. Influence of steam explosion on the thermal stability of cellulose fibres. *Polym Degrad Stab.* 96, 1582-1588.

Jacquet, N., Vanderghem, C., Danthine, S., Quiévy, N., Blecker, C., Devaux J., Paquot, M., 2012. Influence of steam explosion on physico-chemical properties and hydrolysis yield of pure cellulose fibers. *Bioresour. Technol.* (121-10), 221-227.

Kastel'yanos, O., Sinitsyn, A.P., Vlasenko, E.Y., (1995). Effects of various factors on the kinetics of cellulose hydrolysis by an enzyme preparation from *Penicillium verruculosum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (31), 425-430.

Knauf, M., Moniruzzaman, M., 2004. Lignocellulosic biomass processing : a perspective. *Int .Sugar J.* (106), 147-150.

Knutsen, J., Davis, R., 2004. Cellulase retention and sugar removal by membrane ultrafiltration during lignocellulosic biomass hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (113-16), 585-599.

Li, C., Wang, Q., Zhao, Z. 2008. Acid in ionic liquid : An efficient system for hydrolysis of lignocellulose. *Green Chemistry* (10), 177-182.

Li, C., Zhao, Z., 2007. Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in ionic liquid. *Advanced Synthesis & Catalysis* (349), 1847-1850.

Luo, J., Xia, L., Lin, J., Cen, P., 1997. Kinetics of simultaneous saccharification and lactic acid fermentation processes. *Biotechnol. Progr.* (13), 762-767.

Menon, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose : Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* (38), 522-550.

Olsson, L., & Hahn-Hagerdahl, B., 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* (18), 312-331.

Pan, X., Arato, C., Gilkes, N., Gregg, D., Mabee, W., Pye, K., et al., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.* (90), 473–481.

Tomme, P., Warren, R., Gilkes, N., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria *and* fungi. *Advances in Microbial Physiology* (37), 1-81.

Sinitsyn, A. P., Gusakov, A. V., Vlasenko, E. (1991). Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 30, 43-59.

Vanderghem, C., Boquel, P., Blecker, C., Paquot, M., 2010. A multistage process to enhance cellobiose production from cellulosic materials. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (160-8), 2300-2307.

Vanderghem, C., Jacquet, N., Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., 2012. Effect of physicochemical characteristics of cellulosic substrates on enzymatic hydrolysis by means of a multi-stage process for cellobiose production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, In press. DOI 10.1007/s12010-011-9535-1

Yeh, A. I., Huang, Y. C., Chen, S. H. (2010). Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Carbohydr. Polym.*, (79-1), 192-199.

Zhang, H.Y.P, Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. *Biotech. Bioeng.* (88), 797-824.

Zhou, J., Wang, Y.H., Chua, J., Luo, L.Z., Zhuang, Y., P., Zhang, S.L., 2009. Optimization of cellulase mixture for efficient hydrolysis of steam-exploded corn stover by statistically designed experiments. *Bioresour. Technol.* (100), 819-825.

CHAPITRE VII

DISCUSSION GENERALE

7.1. Introduction

La cellulose modèle a permis de mettre spécifiquement en évidence l'impact des différents prétraitements sur la structure, les propriétés physico-chimiques et les propriétés de dégradation de la cellulose ainsi que sur ses perspectives d'hydrolyse, que ce soit en terme d'amélioration des rendements, d'optimisation de la concentration des hydrolysats ou de l'identification des facteurs qui limitent l'hydrolyse.

Bien que les chapitres ci-dessus permettent d'apporter des réponses claires aux questions en ligne avec les objectifs de thèse, certains points du travail nécessitent cependant une discussion plus poussée notamment en ce qui concerne les relations « types de procédés / structure et propriétés physico-chimiques de la cellulose / perspectives d'application des procédés ».

La discussion suivante va donc compléter les différents thèmes abordés dans les chapitres ci-dessus.

La première partie de la discussion sera axée sur la technologie de steam explosion et plus particulièrement sur les limites du modèle établi pour calculer le facteur de sévérité ainsi que les améliorations éventuelles à lui apporter.

Une discussion relative à l'évolution de la cristallinité pendant les différents prétraitements (steam explosion et homogénéisation) sera ensuite abordée.

Le choix de la discussion s'est ensuite orienté vers des considérations plus techniques, notamment en ce qui concerne l'identification des potentialités d'optimisation des process 1 et 2 décrits au chapitre VI.

Enfin, des considérations technico-économiques relatives à la technologie d'homogénéisation feront l'objet d'une discussion pour rendre compte de la rentabilité éventuelle de ce procédé comme technologie de prétraitement de la biomasse.

7.2. La steam explosion : modèle de calcul du facteur de sévérité et facteurs limitants

Le premier point de discussion abordé concerne la steam explosion. Dans ce contexte, les résultats relatifs aux rendements d'hydrolyse enzymatique obtenus après l'application du prétraitement ont été particulièrement inattendus. En effet, il a été montré que la steam explosion n'améliorait pas les rendements d'hydrolyse de la cellulose modèle. Pour les prétraitements dont l'intensité est élevée (facteur de sévérité > 5.2), les résultats indiquent de surcroît une diminution importante des rendements d'hydrolyse enzymatique liée à la dégradation thermique de la cellulose. A l'opposé, la littérature montre de manière très détaillée [Nunes and Pourquié (1996), Moniruzzaman et al. (1996), Fernandez-Bolanos et al. (2001), Negro et al. (2003), Sorensen et al. (2008), Chikako et al. (2011)] que les rendements d'hydrolyse de la cellulose d'une multitude de **substrats lignocellulosiques** de composition variable sont améliorés par le prétraitement.

Une première hypothèse émise pour expliquer ces différences de comportement est liée à l'extraction par le prétraitement, pour les matériaux lignocellulosiques complexes, de la fraction hémicellulosique et d'une partie de la lignine. Ces extractions induisent une augmentation de la proportion en cellulose dans le substrat, couplée à un accroissement de son accessibilité, avec pour conséquence une hausse des rendements d'hydrolyse de la cellulose. Le constat inverse est observé pour la cellulose modèle, où les hémicelluloses et la lignine ont été préalablement extraites par des différents traitements chimiques antérieurs.

Bien que cette première hypothèse paraisse parfaitement plausible, un second facteur doit cependant être envisagé pour expliquer les différences de rendement observées entre les matériaux lignocellulosiques complexes et la cellulose modèle. Ce second facteur est lié à la libération d'acide organique pendant le prétraitement qui résulte de l'hydrolyse des groupements acétyles et méthylglucuroniques contenus dans les xylanes et dans certaines fractions galactomannanes des hémicelluloses [Sun et al. 2005]. Les acides organiques ainsi

libérés, dont les quantités dépendent de la composition du substrat, contribuent à augmenter l'acidité du milieu. Dans le cas de l'utilisation de cellulose modèle, la fraction hémicellulosique résiduelle est très faible ($< 5\%$), ce qui implique une libération d'acide limitée.

La modification de l'acidité du milieu, induite par les matériaux lignocellulosiques en cours du prétraitement, pourrait donc expliquer les différences de rendement d'hydrolyse observées entre les substrats complexes et la cellulose modèle. Pour les substrats complexes, l'augmentation de l'acidité contribue à catalyser l'hydrolyse de la fraction hémicellulosique mais pourrait également modifier la structure de la fibre de cellulose et favoriser son hydrolyse.

Dans cette optique, les recherches menées par Zhang et al. (2011) ont montré que l'application d'un prétraitement à l'acide sulfurique dilué (concentration : $0,1\%$, température 140°C , durée : 5 min) conduit à une amélioration de rendements d'hydrolyse de la cellulose par voie enzymatique de l'ordre de 21% , pour des rendements d'extraction en hémicellulose faible ($7,5\%$).

Une hypothèse avancée par l'auteur pour expliquer l'augmentation des rendements d'hydrolyse de la cellulose est que l'acide dilué à haute température induit une ouverture de la structure de la fibre de cellulose. Cette ouverture serait consécutive à une hydrolyse partielle des zones amorphes qui conduirait d'une part à augmenter la surface spécifique et d'autre part à fragiliser la structure de la cellulose, ce qui permettrait, dans le cadre d'un prétraitement de steam explosion, un meilleur éclatement de la structure lors de la chute brutale de pression (Zhang et al. 2011).

Enfin, la présence d'acide pourrait également avoir un effet catalyseur sur les réactions de dégradation thermique de la cellulose et conduire, dans des conditions moins drastiques, à une formation importante de produit de dégradation.

Pour vérifier ces hypothèses, une première perspective de la thèse consisterait à évaluer l'impact de différents traitements de steam explosion sur les rendements d'hydrolyse enzymatique d'une cellulose modèle, en présence d'une acidité comparable à celles développées par les matériaux lignocellulosiques complexes en cours de traitement. Les conclusions de cette étude pourraient différer de celle du présent travail en terme de rendements d'hydrolyse, de dégradation thermique et de modification des propriétés physico-chimiques de matériaux.

Il ressort donc de ces discussions que le type de substrat prétraité serait un paramètre à part entière qui va contribuer, tout comme les paramètres température / temps de rétention, à définir l'intensité du prétraitement par la libération plus ou moins importante d'acide.

Pour rendre compte de l'intensité du prétraitement, le modèle de calcul du facteur de sévérité devra donc être adapté pour intégrer les composantes liées aux substrats.

Bien que ce modèle de calcul soit actuellement inexistant, certains auteurs ont essayé d'intégrer la composante liée au pH du milieu au modèle simplifié (Eq. 1) développé par Chornet et Overend (1988).

$$S = \text{Log}_{10}[t. \exp(\frac{T-100}{14,75})]$$

(Eq 1.)

Où S = Facteur de sévérité

T = Température (°C)

t = Temps de rétention (min)

Un premier modèle adapté a été suggéré par Chum et al. (1990). Ce modèle de calcul a été établi sur base d'une corrélation basée sur la solubilisation des xylanes pendant le prétraitement de steam explosion consécutif des ajouts d'acide sulfurique en cours de prétraitement (Eq 2.).

$$S' = \text{Log}_{10}[C^n \cdot t \cdot \exp(\frac{T-100}{14,75})]$$

(Eq 2.)

Où S' = Facteur de sévérité adapté

C = Concentration en acide sulfurique (M)

n = Constante empirique dont la valeur est établie à 0,849 pour l'acide sulfurique

Ce premier modèle adapté, qui intègre la composante liée à l'acidité dans le calcul du facteur de sévérité, a cependant été développé dans le but unique de rendre compte de l'impact d'un ajout spécifique d'acide sulfurique, à des concentrations bien plus importantes (de 0,1 à 1 N) que celles libérées par la biomasse, en cours de prétraitement. Ce modèle ne peut donc être utilisé directement pour rendre compte de l'acidité libérée par la biomasse. Une amélioration du modèle consisterait à redéfinir le coefficient arbitraire (0,849) pour les acides acétique et uroniques dans des gammes de concentrations comparables à celles libérées par la biomasse.

Un second modèle plus large a été développé par Abatzoglou et al. (1992). Dans ce modèle, l'effet catalyseur de l'acide est établi sur base de la concentration en proton du milieu à la fin du prétraitement et détermine une équation qui intègre le pH de la solution au modèle.

$$S'' = \text{Log}_{10}(t \cdot \exp(\frac{T-100}{14,75}) \cdot [H^+]) = S - \text{pH}$$

(Eq. 3)

Où S'' = Facteur de sévérité adapté

S = Facteur de sévérité simplifié

$[H^+]$ = Concentration en proton (M)

Ce second modèle de calcul intègre donc mieux la composante liée à l'acidité développée par les substrats lignocellulosiques (Yang and Wyman, 2004). Chum et al. (1992) ont cependant montré que ce nouveau modèle est mieux adapté aux faibles valeurs de pH.

Lorsque le pH atteint des valeurs plus élevées, la différence des valeurs des facteurs de sévérité calculées n'est plus corrélée aux rendements d'hydrolyse de la cellulose, de solubilisation des hémicelluloses ou à l'extraction des lignines.

Lorsque le pH est augmenté à une valeur supérieure à 7, notamment à la suite d'un ajout d'ammoniac, de soude, ou de carbonate de sodium, l'effet de gonflement de la cellulose occasionné par la présence d'alcali, qui améliore les propriétés d'hydrolyse de la cellulose, (Holtzapple, 1991), n'est pas pris en compte dans le modèle de calcul.

Dans ce dernier cas de figure, Yang and Wyman (2004) proposent une variante au modèle (Eq. 4), qui prend comme hypothèse que des concentrations similaires en proton ou en hydroxyle ont des impacts similaires sur l'intensité du prétraitement et à posteriori sur les rendements d'hydrolyse des substrats.

$$S''' = S + |\text{pH} - 7|$$

(Eq.4)

Où $S''' =$ Facteur de sévérité adapté

$S =$ Facteur de sévérité simplifié

Pour identifier clairement les avantages et inconvénients de ces modèles, les différents facteurs de sévérité ont été calculés (Eq. 1, 2, 3 et 4) pour différents scénarios de prétraitement (Tableau 1.)

Tableau 1. Calcul du facteur de sévérité initial et des différents facteurs de sévérité adaptés pour différents types de prétraitement

Température (°C)	Temps (min)	pH	S (Eq 1.)	S' (Eq 2.)	S'' (Eq 3.)	S''' (Eq 4.)
180	2	1	2,65	1,55	1,65	8,65
200	2	2	3,24	1,29	1,25	8,24
220	2	13	3,83	-7,45	-9,16	9,83
240	2	4	4,2	0,77	0,42	7,72
240	5	4	4,82	1,16	0,82	7,82

La comparaison des valeurs des différents facteurs de sévérité montre que le modèle initial, qui tient compte uniquement des paramètres temps/température, est totalement insuffisant pour décrire l'intensité du traitement, dans le cas où le pH du milieu serait modifié en cours de prétraitement.

Dans le cas où une acidité importante (pH 1 ou 2) serait développée, le tableau montre que les facteurs S' et S'' donnent des valeurs d'intensité comparables, bien adaptées pour décrire

l'intensité du prétraitement. Pour des acidités plus réduites (pH 4), les valeurs obtenues ont cependant tendance à minimiser l'influence des paramètres temps, température au profit du pH.

Pour les pH alcalins, le tableau confirme que ces deux facteurs ne conviennent absolument pas. Selon le modèle, l'ajout de composés alcalins conduirait à une diminution significative de l'intensité du prétraitement alors que la littérature (Holtzapfel, 1991) montre que les composés alcalins, améliorent significativement l'accessibilité de matériaux lignocellulosiques.

Le dernier modèle développé (S''') intègre mieux la composante liée aux composés alcalins. Les valeurs calculées montrent que ce dernier modèle donne une estimation plus équitable de l'intensité du prétraitement, même à des pH très différents. Ce modèle semble donc le mieux adapté pour définir l'intensité d'un prétraitement de steam explosion en tenant compte du pH du milieu de réaction (Pedersen and Meyer, 2010).

Pour finaliser la discussion sur les modèles de calcul du facteur de sévérité, il est important de noter que l'acidité n'est pas le seul paramètre lié au substrat qui peut influencer l'intensité du prétraitement. D'autres paramètres, tels que la cristallinité de la cellulose qui compose le substrat, ces propriétés d'adsorption et de rétention d'eau pourront également freiner la diffusion de la vapeur. En effet, l'eau pénétrera d'une part, d'une manière beaucoup plus difficile dans les zones cristallines. D'autre part, les quantités de vapeur nécessaires pour « mouiller » l'ensemble du substrat seront plus importantes pour un matériau dont les propriétés d'adsorption et de rétention d'eau sont plus élevées. La granulométrie du substrat jouera également un rôle important au niveau de la diffusion de la vapeur au sein du matériau. Tous ces facteurs pourraient donc induire un allongement du temps de rétention, nécessaire pour que la vapeur puisse pénétrer l'ensemble du matériau, pour obtenir un prétraitement de même intensité.

Une nouvelle perspective du travail consisterait donc à améliorer les modèles de calcul actuellement développés en y intégrant des coefficients correctifs qui permettraient de rendre compte des différents paramètres propres au substrat, autres que l'acidité (Ex : Eq 5.). Dans cette optique, nous proposons un modèle de calcul qui pourrait permettre d'intégrer les différents paramètres liés au substrat.

$$S''' = \text{Log}_{10}[G.W.C^K .t. \exp(\frac{T-100}{14,75})] - |\text{pH} - 7|$$

(Eq.5)

Où S'''' = Facteur de sévérité adapté

C = Concentration en cellulose (M)

K = Constante empirique relatif à la cristallinité de la cellulose

W = Facteur correctif lié aux propriétés de rétention d'eau

G = Facteur correctif lié à la granulométrie des échantillons

Les valeurs des différents coefficients correctifs devront être déterminées d'une manière identique à la méthode développée par Yang and Wyman (2004) qui se base sur une amélioration des rendements d'hydrolyse de la cellulose (applicable à la cellulose modèle) mais qui devrait également être corrélés à la solubilisation des hémicelluloses et à l'extraction des lignines pour les matériaux lignocellulosiques complexes.

Enfin, un dernier point de discussion, relatif au modèle qui intègre l'influence de la montée en température dans le calcul du facteur de sévérité, concerne la validité de l'hypothèse d'une croissance linéaire de la température sur un incrément de pression réduit. Pour vérifier cette hypothèse, une courbe d'évolution de la pression en fonction de la température a été établie pour un essai mené à 50 bars avec un temps de rétention de 5 minutes (Figure 1).

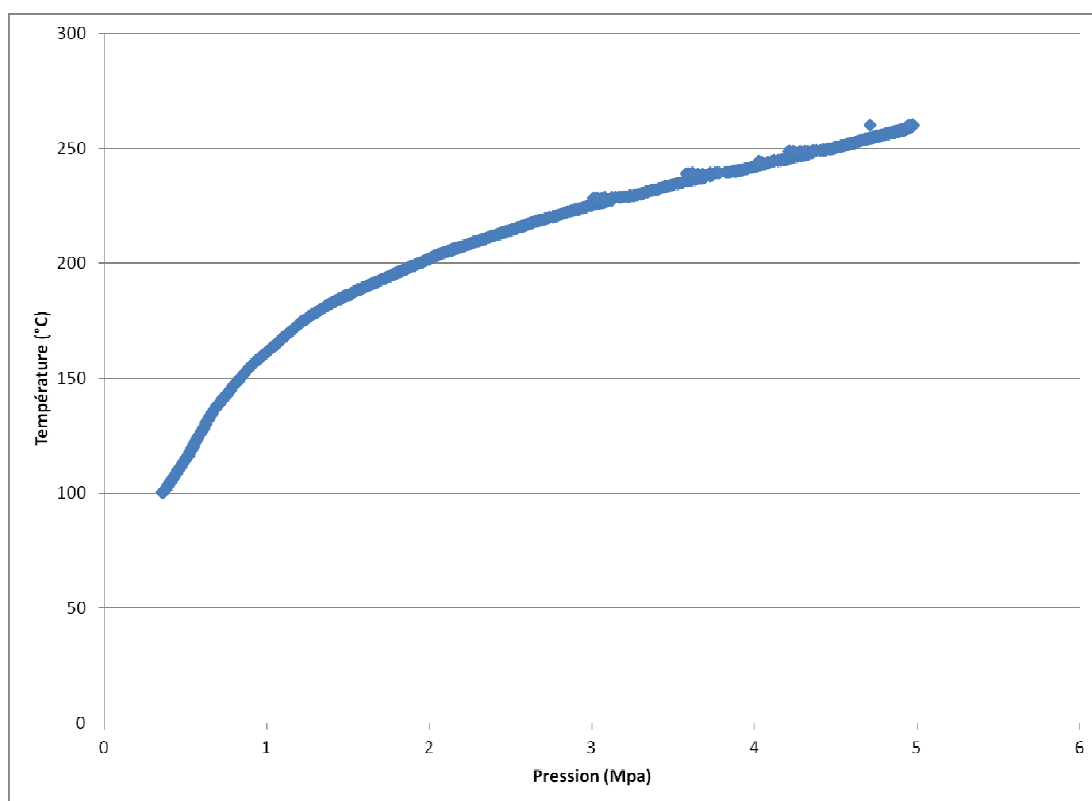


Fig. 1 : Courbe d'évolution de la pression en fonction de la température : Essai 50 bars, temps de rétention : 5 minutes

L'analyse de la courbe montre que la croissance température/pression n'est pas linéaire sur l'ensemble de l'essai. Pour vérifier l'hypothèse d'une croissance linéaire de la température sur un incrément de pression réduit, trois zones du graphique ont été ciblées.

La première zone est située dans une gamme de pression comprise entre 0,5 et 0,6 MPa où une croissance importante de la température est observée pour une faible augmentation de la pression. La seconde est située dans une gamme de pression comprise entre 1,4 et 1,5 Mpa. Enfin, la troisième zone correspond à une gamme de pression comprise entre 2,5 et 2,6 MPa où une importante croissance de la pression est observée pour une faible augmentation de la température.

Les figures 2, 3 et 4 reprennent les courbes d'évolution température/pression pour un incrément de pression de 0,1 MPa dans chacune des zones de pression ciblées.

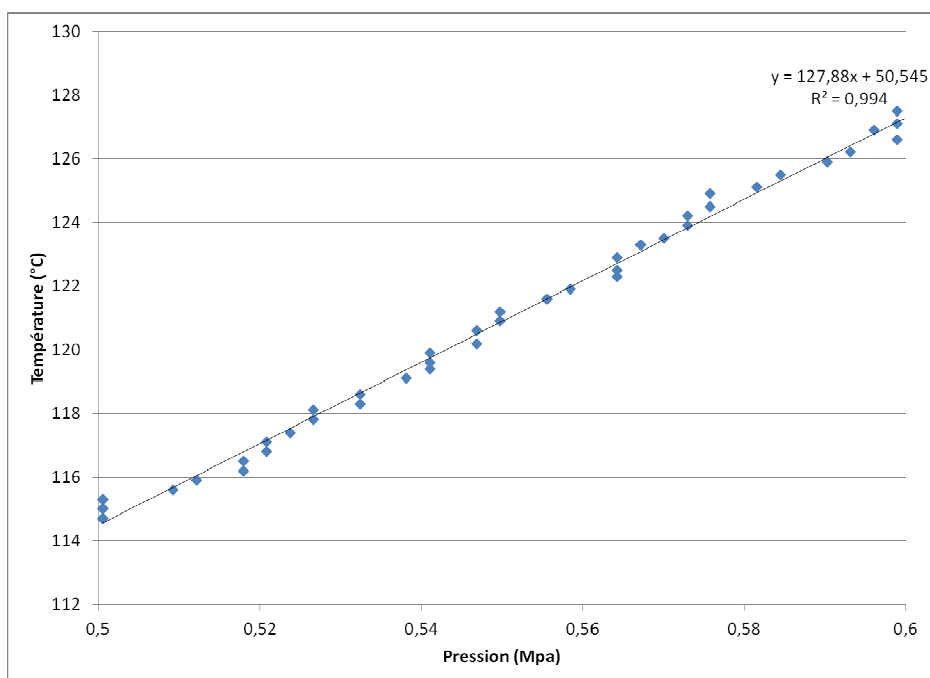


Fig. 2 : Evolution de la température dans la zone de pression comprise entre 0,5 et 0,6 MPa :

Essai 50 bars : temps de rétention : 5 minutes

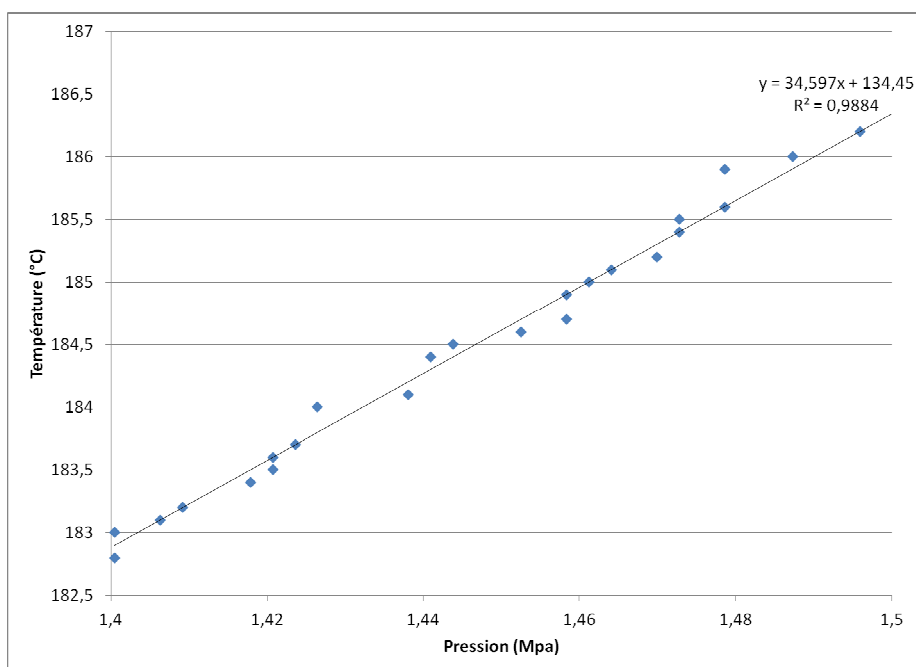


Fig. 3 : Evolution de la température dans la zone de pression comprise entre 1,4 et 1,5 MPa :

Essai 50 bars : temps de rétention : 5 minutes

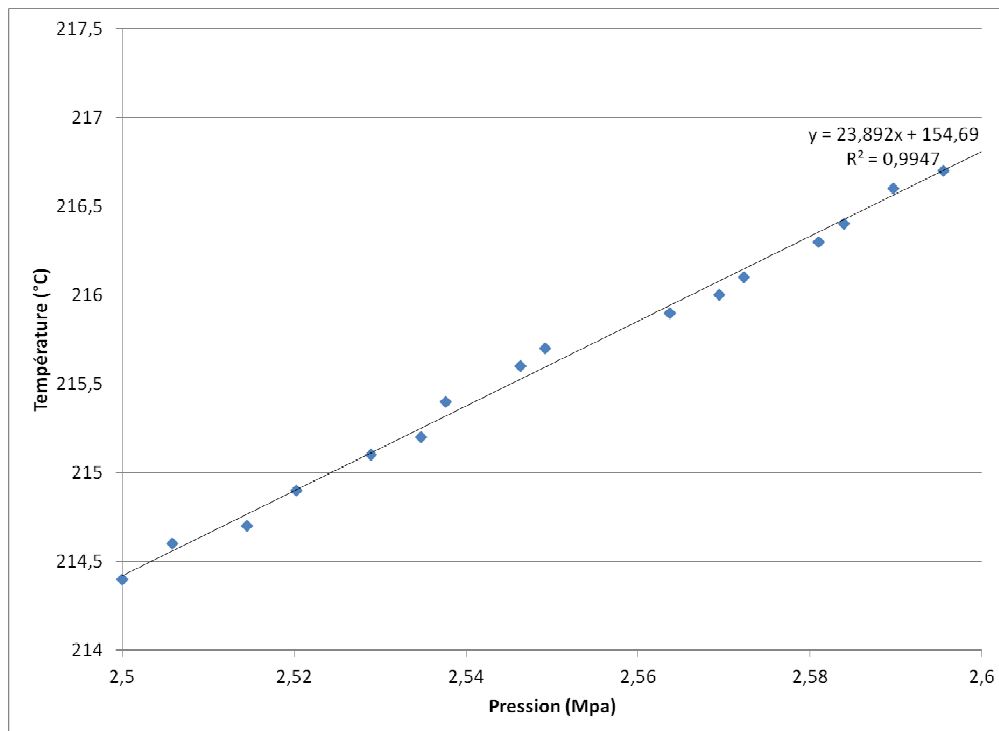


Fig. 4 : Evolution de la température dans la zone de pression comprise entre 2,5 et 2,6 MPa :

Essai 50 bars : temps de rétention : 5 minutes

Dans nos conditions expérimentales, l'analyse des différentes courbes montrent que les coefficients de corrélation des droites de régression sont très proches de 1, ce qui valide l'hypothèse que la croissance en température peut être considérée comme linéaire par rapport à la croissance de la pression pour des incréments de pression de 0,1 MPa. Dans le cas de notre modèle, l'incrément de pression utilisé est de 0,005 MPa, ce qui confirme l'hypothèse de travail.

7.3. Evolution de la cristallinité de la cellulose modèle consécutive aux prétraitements d'homogénéisation et de steam explosion

Un second point de discussion important à soulever concerne l'évolution de la cristallinité de la cellulose modèle lors de l'application des différents prétraitements (steam explosion et homogénéisation).

Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la cristallinité de la cellulose pour les prétraitements de steam explosion (pour des facteurs de sévérité inférieurs à 5.2). A l'inverse, la cristallinité de la cellulose n'a pas évolué à la suite de l'application du prétraitement d'homogénéisation.

Une explication de ces phénomènes peut être avancée en se référant à la structure macromoléculaire de la fibre de cellulose. La littérature montre en effet que la fibre cellulose est constituée d'une agglomération de microfibrilles qui s'organisent en faisceaux. Ces microfibrilles constituent des entités distinctes qui sont perçues comme un corps cristallin, composées de cellulose hautement organisée (fibrilles de cellulose). Ces microfibrilles sont reliées entre elles par un cortex paracristallin (ou amorphe) de moindre résistance [Paquot. 1980].

Le schéma repris à la figure 5 présente les hypothèses d'évolution de la structure de la fibre de cellulose après l'application des deux types de prétraitements (steam explosion et homogénéisation).

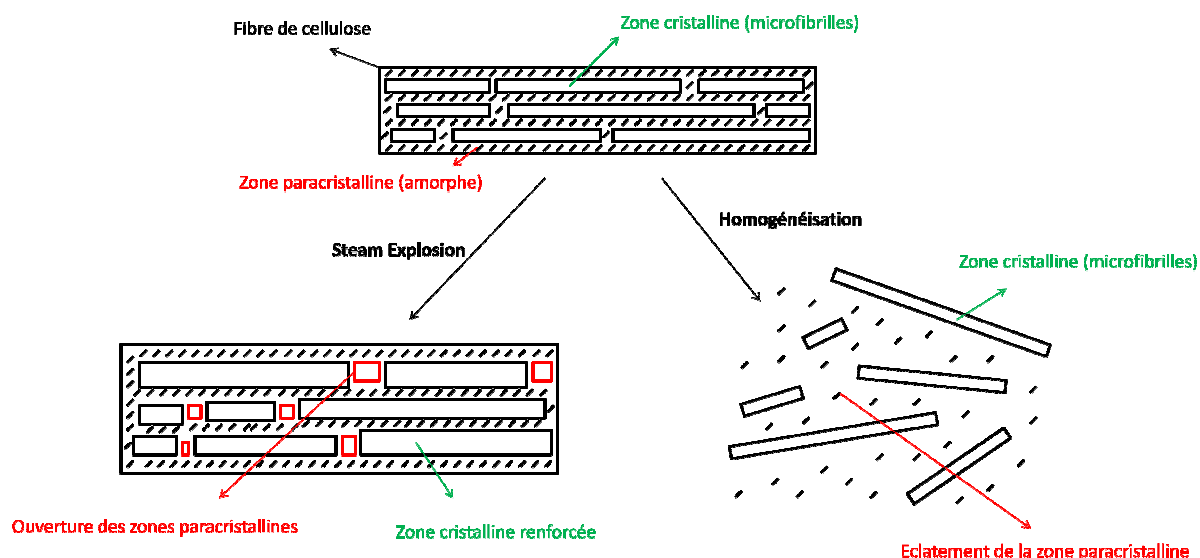


Fig 5. Représentation schématique de l'évolution hypothétique de la structure de la fibre de cellulose après l'application des prétraitements de steam explosion et d'homogénéisation.

Dans le cas de la steam explosion, les résultats obtenus au chapitre IV ont montré une augmentation des propriétés de rétention d'eau de la fibre de cellulose. L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène induirait que le prétraitement de steam explosion provoque une ouverture de la structure de la fibre de cellulose au niveau des zones de moindre résistance mécanique (zones paracristallines). Cette ouverture de la structure paracristalline induirait une augmentation de la surface spécifique du matériau dont résulterait l'augmentation des propriétés de rétention d'eau.

En parallèle, la présence d'une proportion de zone cristalline plus importante peut être expliquée par l'hypothèse suivante. La présence d'eau liquide à haute température à l'intérieur de la structure du matériau provoquerait la fusion des zones paracristallines. Cette fusion pourrait induire soit une extraction spécifique de la cellulose paracristalline, soit un réarrangement cristallin des molécules de cellulose sur les parties cristallines existantes qui se déroulerait au cours de la phase de détente.

En ce qui concerne l'homogénéisation, les résultats présentés au chapitre V ont clairement montré que le prétraitement permet d'éclater la structure de la fibre de cellulose pour obtenir des microfibrilles individualisées. Ce résultat traduit la potentialité de la technologie à briser les liens existants entre les microfibrilles (composés par une fraction cellulosique amorphe). Cependant, les résultats n'ont pas montré l'apparition, dans les suspensions de cellulose homogénéisées, de sous-structures constitutives des microfibrilles (fibrilles de cellulose), ce qui indique que l'homogénéisation, bien que possédant les capacités d'individualiser les microfibrilles de cellulose, n'a cependant pas les potentialités d'éclater la structure même de la microfibrille, constituée majoritairement par des zones cristallines beaucoup plus compactes et plus résistantes. Les zones cristallines seraient donc préservées au cours de l'application du prétraitement, ce qui pourrait expliquer la constance des taux de cristallinité de la cellulose avant et après le prétraitement d'homogénéisation.

7.4. Identification des paramètres permettant d'optimiser les procédés de montée en concentration (process 1 et 2) décrits au chapitre VI

Un autre point de notre discussion est consacré aux différents procédés d'hydrolyse de la cellulose modèle décrit au Chapitre VI qui permettaient d'obtenir des hydrolysats très concentrés par une gestion adéquate des apports en enzyme et en substrat en cours d'hydrolyse.

Deux procédés ont été définis dans cette optique (process 1 et 2). Le premier procédé était axé uniquement sur l'ajout de substrat en cours d'hydrolyse. Le second process combinait l'ajout d'enzyme et l'ajout de substrat et permettait d'atteindre des concentrations en glucose très élevées. Un procédé d'hydrolyse de référence a également été défini comme base de comparaison.

Les résultats obtenus ont montré que chacun des procédés présentait des avantages et des inconvénients. En ce qui concerne la concentration des hydrolysats, le procédé 2 présente un très net avantage en dépit d'un ratio unités d'enzyme/gramme de glucose, produit moins performant.

A l'inverse le procédé 1, présente le meilleur rapport unités d'enzyme/gramme de glucose. Les rendements d'hydrolyse de ce procédé sont par contre limités.

Enfin, le procédé de référence possède les meilleurs rendements d'hydrolyse pour des concentrations finales en glucose réduites.

Bien que très différents en termes de résultats, aucun de ces procédés n'est actuellement optimal.

Pour mieux évaluer les potentialités des différents process et identifier les pistes conduisant à une amélioration de process, l'évolution de la concentration en hydrolysats (établi sur base des quantités de glucose ($> 98\%$) et de cellobiose formées ($< 2\%$)), les unités d'enzyme utilisées par gramme de glucose produit et les taux d'hydrolyse ont été déterminés pour chaque prélèvement réalisé en cours de process (toutes les 2 heures).

Les figures 6, 7, 8 reprennent une comparaison des différents procédés pour chacun de ces différents paramètres. Ces différentes figures permettent de cibler les améliorations à apporter aux différents procédés proposés en vue d'optimiser leurs coûts ainsi que leur rendement.

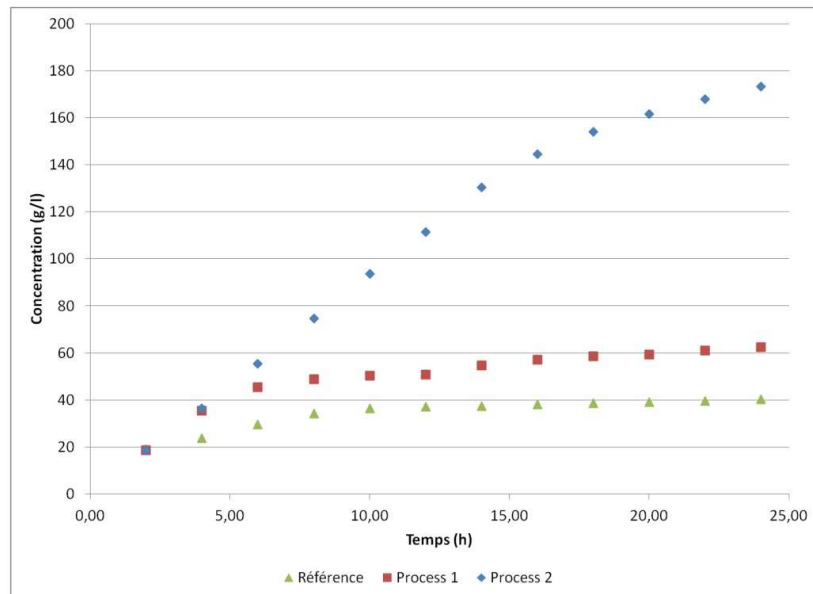


Fig. 6 : Evolution de la concentration en glucose pour les process 1, process 2 et la référence

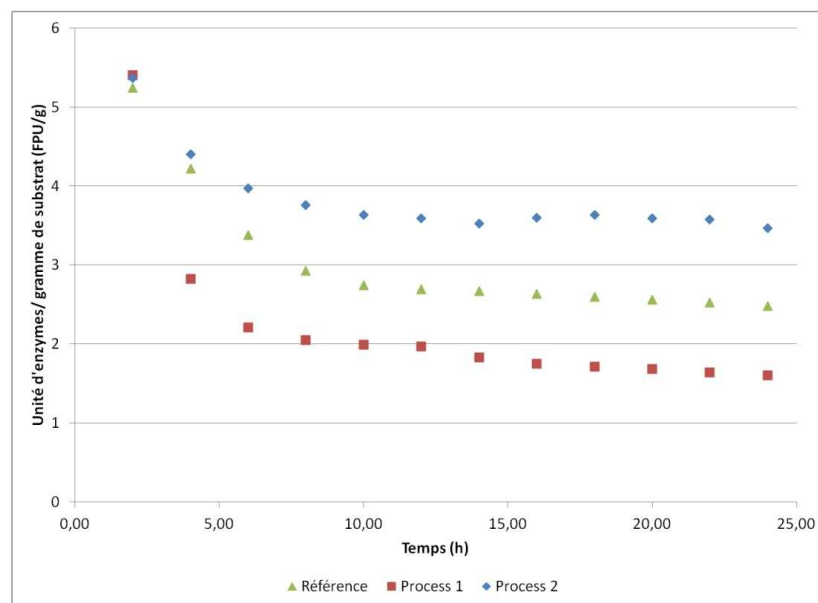


Fig. 7 : Evolution du nombre unités d'enzymes par gramme de glucose pour les process 1, process 2 et la référence

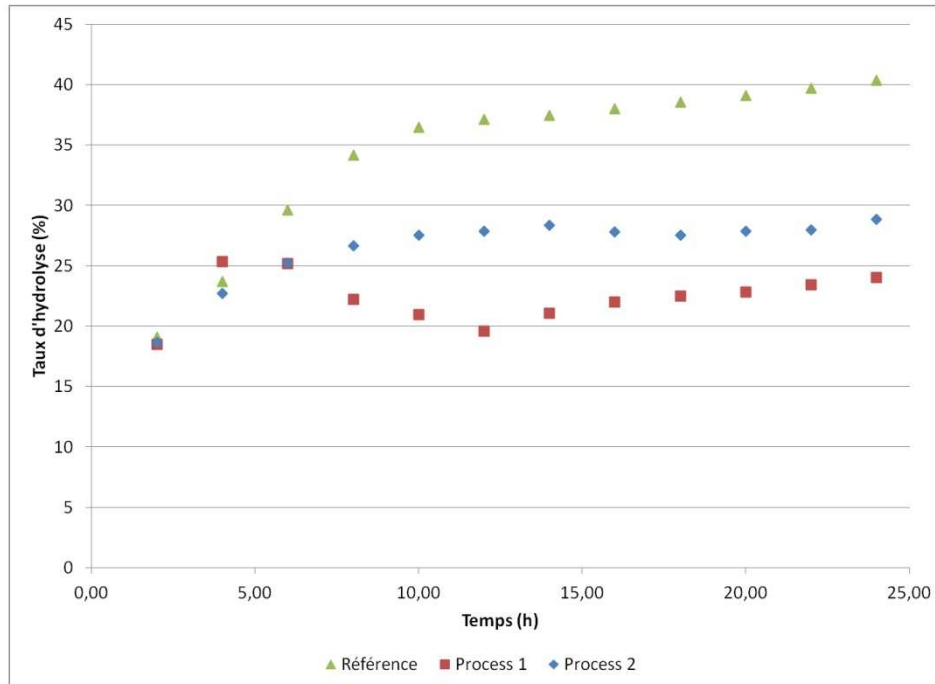


Fig. 8 : Evolution des taux d’hydrolyse pour les process 1, process 2 et la référence

La première observation réalisée concerne le process 2. Les résultats décrits au chapitre VI ont en effet montré que le process 2 était le plus intéressant en termes d’obtention d’hydrolysats concentrés. Pour rappel, trois facteurs importants peuvent limiter les opérations d’hydrolyse : la cristallinité de la cellulose, l’adsorption des enzymes et l’inhibition par les produits d’hydrolyse. Dans le cadre du process 2, les ajouts successifs d’enzyme et de substrats limitent l’impact des deux premiers facteurs. L’inhibition par les produits d’hydrolyse apparaît donc comme étant le facteur limitatif du procédé, à haute concentration. L’évolution du nombre d’unités d’enzymes utilisé par gramme de produit d’hydrolyse confirme ces résultats pour le process 2. La figure 7 montre en effet une diminution continue du nombre d’unités d’enzyme pendant les premières heures d’hydrolyse. Cette diminution se poursuit jusqu’au moment où la concentration en glucose atteint des valeurs proches de l’inhibition par les produits d’hydrolyse (130-140 g/l). La figure montre ensuite une légère augmentation du nombre d’unités d’enzyme.

Une fois les ajouts d'enzyme et de substrat terminés, une légère diminution est à nouveau observée.

Une amélioration possible du procédé pourrait donc consister à limiter les ajouts d'enzyme sur une période où la gamme de concentration en glucose serait inférieure à la valeur inhibitrice. Dans nos conditions expérimentales, la concentration atteinte à ce moment avoisinerait les 130 g/l et l'inhibition par les produits d'hydrolyse serait limitée.

Le profil d'évolution du nombre d'unités d'enzyme pourrait dès lors suivre une tendance similaire au process 1. Pour le process 1, le profil montre une stabilisation vers 10 heures d'hydrolyse (ce qui correspond au dernier ajout en substrat), suivie d'une diminution significative du nombre d'unités d'enzyme. La concentration en glucose des hydrolysats issus du process 1 étant trop faible pour inhiber les réactions enzymatiques, cette dernière peut se poursuivre et contribuer à la diminution significative du nombre d'unités.

Le même constat peut être appliqué au process 2. L'arrêt des ajouts d'enzyme et de substrat à une concentration de 120 à 130 g/l en glucose (concentration à laquelle l'inhibition par les produits d'hydrolyse est limité) permettrait la poursuite de l'hydrolyse et contribuerait à diminuer le nombre d'unités d'enzyme.

La figure 8 montre également qu'un constat similaire peut être établi pour les taux d'hydrolyse. Une croissance continue est observée durant les premières heures d'hydrolyse. L'inhibition par le glucose induit ensuite une diminution des taux d'hydrolyse. Une fois les ajouts terminés, une nouvelle croissance est ensuite observée. L'arrêt des ajouts d'enzyme et de substrat avant le seuil d'inhibition en glucose pourrait donc contribuer à augmenter significativement les taux d'hydrolyse.

Enfin, une amélioration simple pour le process 2 consisterait à stopper l'hydrolyse lorsque la concentration en glucose atteint le seuil d'inhibition. Cette opération se justifie par le fait que

les quantités de glucose produites ultérieurement sont minimales par rapport aux ajouts d'enzyme et de substrat. Bien que l'arrêt du procédé limite à ce moment la concentration en produit d'hydrolyse atteinte (à une valeur correspondant à la limite d'inhibition par les produits d'hydrolyse (130 - 140 g/l)), l'économie d'échelle réalisée en réduisant les durées d'hydrolyse pourrait contribuer à augmenter fortement la rentabilité du procédé.

Le même constat ne peut cependant être établi pour le process 1 où une chute très importante des taux d'hydrolyse est observée pendant les 10 premières heures, pour atteindre un seuil minimal au moment du dernier ajout de substrat (20 %). Arrêter le process à ce moment reviendrait à limiter très fortement les taux d'hydrolyse qui contribueraient à augmenter le résidu d'hydrolyse.

7.5. Evaluation technico-économique des potentialités d'utilisation de l'homogénéisation comme technologie de prétraitement

Contrairement à la steam explosion, les traitements d'homogénéisation apportent une très nette amélioration des rendements d'hydrolyse de la cellulose modèle.

Les résultats obtenus montrent en effet une hausse des rendements de 35 à 100 %, selon l'intensité du prétraitement appliqué.

L'homogénéisation permet de plus de traiter les substrats à basse température (<90°C), ce qui limite les dégradations thermiques. Les conditions opératoires requises pour parvenir à de telles améliorations des rendements vont cependant limiter la rentabilité économique du procédé en raison, d'une part, de la très faible concentration en substrat des suspensions traitées (de l'ordre de 1%), et d'autre part, du nombre important de passage requis.

Pour déterminer la rentabilité de l'homogénéisation comme technologie de prétraitement de la biomasse, une estimation des coûts d'utilisation de la technique a été réalisée sur base des

coûts de fonctionnement d'une installation pilote (homogénéisateur : APV : Rannie LAB Model 12.51 H) présente dans nos laboratoires.

Pour réaliser cette estimation, les consommations en électricité de l'installation ont été déterminées sur base de la puissance moyenne délivrée par le moteur électrique en fonction de la pression appliquée ainsi que du débit dans l'installation. Cette estimation a été réalisée à partir de l'abaque fourni par le constructeur (Figure 9).

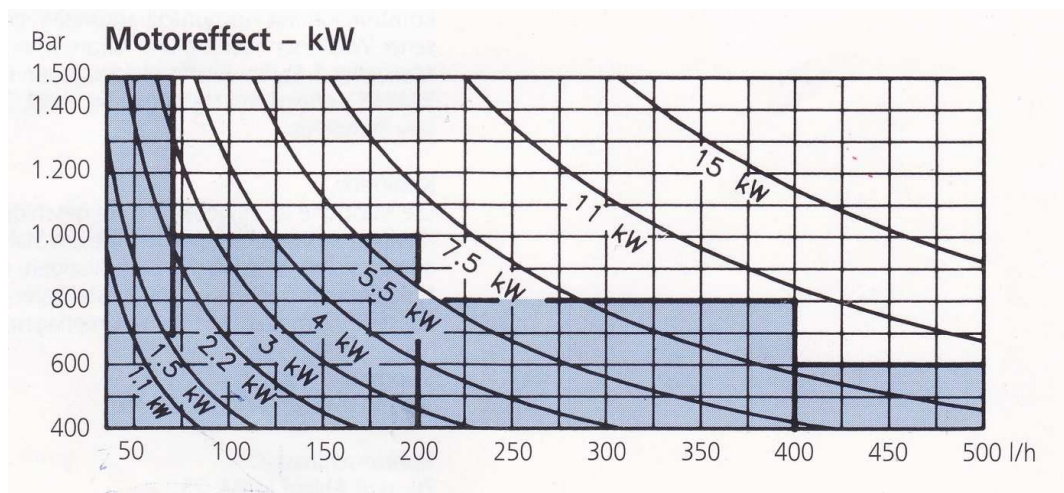


Fig. 9 : Puissance effective (kW) délivrée par l'installation d'homogénéisation pilote en fonction de la pression et du débit appliqués

Dans le cadre de notre étude, les pressions appliquées ont été fixées à 250 et 500 bars pour un débit nominal de 120 l/h. La puissance moyenne du moteur délivrée dans ces conditions est de 1.8 kW pour une pression de 500 bars. La pression de 250 bars n'est pas reprise telle quelle dans l'abaque. Une extrapolation des courbes conduit cependant à une puissance de 1,2 kW.

Une seconde estimation des quantités d'énergie transmises peut être établie sur base de la puissance transmise à la suspension lors de la détente brutale.

Cette puissance peut-être assimilée à la puissance hydraulique potentielle transmise par une chute d'eau d'une hauteur correspondante aux différentes pressions respectives. L'estimation de cette puissance peut également être estimée par la formule suivante (Eq. 6).

$$P = \rho * g * H * Q$$

(Eq. 6)

Où : P = Puissance hydraulique mécanique (kW)

ρ = Masse volumique (kg/m³)

g = Accélération de la pesanteur (m²/s)

H = Hauteur virtuelle de la chute d'eau (1 bars = 10 mètres)

Q = Débit (m³/s)

Dans le cadre d'une chute de pression de 500 bars, la puissance transmise à la suspension est estimée à 1,619 Kw, valeur proche des puissances électriques délivrées par le moteur référencée par l'abaque (Fig. 9).

Le prix de l'électricité repris pour le calcul a été établi sur base du prix médian de l'électricité facturé en 2010 aux grands clients industriels (consommation annuelle supérieure à 10 GWh ou puissance nécessaire supérieure à 5 MW). La fourchette des prix facturés en 2010 pour ce type de consommateur était comprise entre 29 et 110 €/MWh avec un prix médian égal à 64,6 €/MWh TTC, qui a été retenu pour notre calcul (étude (F)120131-CDC-1134, GREG, 2010).

Les coûts relatifs aux consommations d'eau nécessaires à la mise en suspension du substrat ont ensuite été ajoutés au coût énergétique. Le prix de l'eau de distribution pour un consommateur industriel (consommation > 25000 m³/an) est de 3,35 €/m³ TTC (http://www.swde.be/xml/fiche__fr-FLASH-0-NBCOL-3-IDC-500-IDD--.html, 2012).

Le tableau 2. reprend le détail des coûts des différents prétraitements d'homogénéisation appliqués pour traiter 100 grammes de cellulose modèle mise en suspension dans 10 litres d'eau.

Tableau 2. Estimation des coûts d'homogénéisation pour le traitement de 100 grammes de cellulose modèle

Pression (bar)	Degré d'Homogénéisation	Durée du prétraitement (h)	Coût eau mise en suspension	Consommation électrique	Coût Total
250	4,2	1	$0.01 \times 3.35 \Rightarrow 0,034 \text{ €}$	1,20 KWh $\Rightarrow 0,077 \text{ €}$	0,111 €
250	12,9	2,08	$0.01 \times 3.35 \Rightarrow 0,034 \text{ €}$	2,49 KWh $\Rightarrow 0,161 \text{ €}$	0,195 €
250	32,1	4,16	$0.01 \times 3.35 \Rightarrow 0,034 \text{ €}$	4,99 KWh $\Rightarrow 0,323 \text{ €}$	0,357 €
500	4,2	1	$0.01 \times 3.35 \Rightarrow 0,034 \text{ €}$	1,80 KWh $\Rightarrow 0,116 \text{ €}$	0,150 €
500	12,9	2,08	$0.01 \times 3.35 \Rightarrow 0,034 \text{ €}$	3,74 KWh $\Rightarrow 0,241 \text{ €}$	0,275 €
500	32,1	4,16	$0.01 \times 3.35 \Rightarrow 0,034 \text{ €}$	7,48 KWh $\Rightarrow 0,483 \text{ €}$	0,517 €

Au premier abord, les coûts repris dans le tableau 2 montrent que l'application d'un traitement d'homogénéisation entraîne un surcoût important qui suggère une non rentabilité de la technologie en dépit de l'accroissement significatif des rendements d'hydrolyse. L'analyse du tableau montre en effet que le coût du traitement est compris entre 1,11 et 5,17 €/kg suivant l'intensité du prétraitement appliqué.

Les coûts importants des traitements d'homogénéisation résident d'une part dans la faible concentration des suspensions traitées (1 %), qui limite les quantités de cellulose obtenues. Dans le cadre de notre étude, la configuration de notre installation pilote ne permettait pas de traiter des suspensions de cellulose plus concentrées. Aux concentrations supérieures, des phénomènes d'obstruction et d'instabilité de pression étaient observés.

Cependant, l'architecture des nouvelles installations d'homogénéisation a fortement évolué au cours de ces dernières années pour permettre le traitement de suspensions de cellulose de concentration plus élevée (jusqu'à 4%) qui pourrait conduire à une première diminution très significative des coûts du prétraitement

(http://www.apv.com/pdf/technicalinfo/PB_Cellulose_2008.pdf, 2008).

Le tableau 2 indique également que le nombre de passages nécessaires à l'ouverture de la structure de la cellulose modèle est un autre facteur qui va influencer la durée du prétraitement et donc le coût du prétraitement. Etant donné que les nouvelles technologies d'homogénéisation (ainsi que certaines technologies de microfluidisation) permettent d'atteindre des pressions de traitement beaucoup plus importantes (de 1500 à 2000 bars) et appliquent des cisaillements d'une intensité bien supérieure, la destructuration de la cellulose dans ce type d'installation pourrait être beaucoup plus rapide et contribuer de cette façon à une diminution du nombre effectif de passage. Cette diminution se traduirait par une réduction de la durée et des quantités d'énergie nécessaires et contribuerait également à améliorer significativement les quantités de produits obtenus (économie d'échelle).

Une dernière approche, qui permettrait de réduire significativement les coûts énergétiques du procédé, consisterait à récupérer l'énergie dissipée sous forme de chaleur dans la suspension traitée au moment du cisaillement. Les essais réalisés sur cellulose modèle ont en effet montré une hausse significative de la température de la suspension de cellulose consécutive à l'application du prétraitement. Cette augmentation de température a notamment été régulée par un circuit de refroidissement pour éviter que la suspension n'atteigne sa température d'ébullition pendant le prétraitement.

Pour ce faire, un suivi de la température de la suspension a été réalisé. La Figure 2 montre l'évolution de la température d'une suspension de cellulose (volume 10 litres) pendant un traitement d'homogénéisation réalisé à une pression de 500 bars, sans la présence d'un système de refroidissement

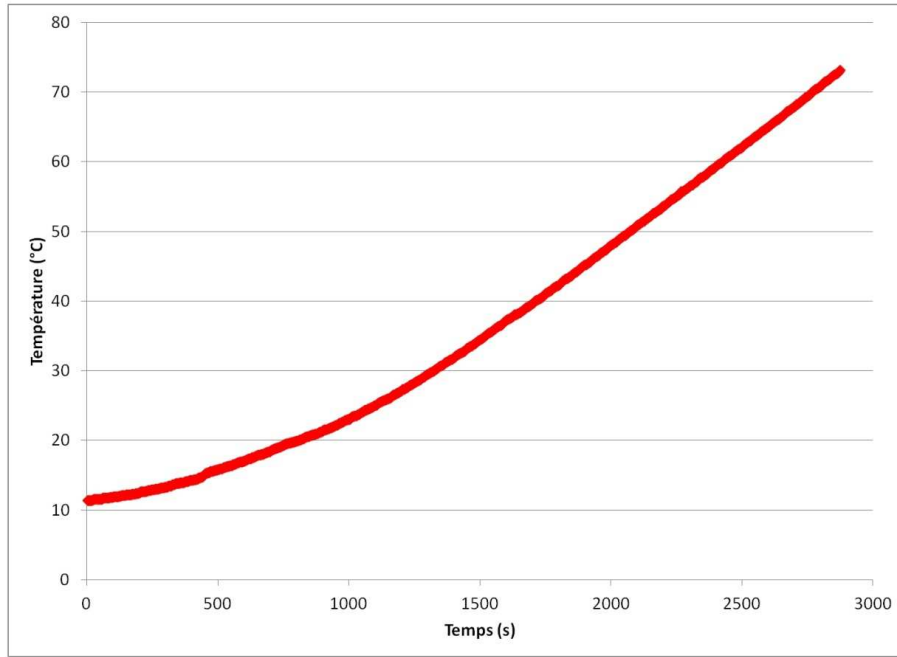


Fig. 10 : Evolution de la température de la suspension de cellulose au cours d'un traitement d'homogénéisation appliqué à une pression de 500 bars

L'analyse du profil de température montre une croissance rapide de la température de la suspension de cellulose au cours du traitement. Dans un premier temps, l'augmentation de la température est plus faible en raison du liquide contenu dans le volume mort de l'installation. Une évolution plus marquée est ensuite observée. La température de la suspension augmente de 17 à 63°C en plus ou moins 38 minutes. Le traitement d'homogénéisation a ensuite été stoppé lorsque la température a atteint 70°C pour éviter toute détérioration de l'installation pilote.

Sur base de la chaleur spécifique de l'eau (4,18 kJ/Kg°C), un rapide calcul (Eq 7.) permet d'estimer la quantité d'énergie dissipée dans la suspension de cellulose au cours du prétraitement d'homogénéisation.

$$C_p * V * \rho * (T_f - T_i) = E$$

(Eq. 7)

Où C_p = Chaleur spécifique de l'eau (kJ/kg°C)

V = Volume (m³)

ρ = Densité (kg/m³)

T_f = Température finale

T_i = Température initiale

Pour notre essai, l'énergie dissipée sous forme de chaleur dans la suspension correspond à :
 $4,18 * 10 * (63 - 18) = 1922$ kJ, qui correspond à une puissance moyenne dissipée de 0,842 kW

$$1922 / 38 * 60 = 0,842 \text{ kW}$$

Dans le cadre d'un essai réalisé à 500 bars, où la puissance moyenne fournie par le moteur électrique est de 1,8 kW, la puissance dissipée sous forme de chaleur dans la suspension de cellulose correspond à environ 46 % à 50 % de la puissance nominale du moteur.

La récupération de cette quantité importante d'énergie, qui doit de toute façon être otée de la suspension pour maintenir la température du produit à des valeurs compatibles avec les limites de l'installation, devrait contribuer à diminuer fortement les coûts du prétraitement. Cette énergie thermique pourrait éventuellement être réutilisée de manière aisée lors d'étape ultérieure, tels que l'hydrolyse enzymatique ou les diverses opérations de fermentation.

Enfin, il serait également possible d'améliorer les performances économiques du prétraitement d'homogénéisation en diminuant les quantités d'eau nécessaires au prétraitement. Une séparation solide/liquide (ex : par décantation centrifuge) réalisée à la fin

du prétraitement pourrait notamment diminuer significativement les quantités d'eau nécessaires à la mise en suspension du substrat.

Pour terminer, il ne faut pas oublier que l'ensemble des estimations réalisées ci-dessus a été basé sur les performances énergétiques d'un homogénéisateur pilote, et non d'une installation industrielle.

L'optimisation combinée de l'ensemble des facteurs décrits ci-dessus pourrait donc contribuer à une diminution très significative des coûts du traitement. Bien qu'il soit difficile à l'heure actuelle de chiffrer cette diminution, il apparaît qu'une réduction des coûts d'un facteur 3 à 5 ne soit pas irréaliste, ce qui pourrait rendre le prétraitement d'homogénéisation rentable, notamment pour certaines filières d'exploitation à haute valeur ajoutée (production de nanocellulose, cellulose microcristalline,...)

Pour confirmer cette dernière hypothèse, une voie d'évaluation a consisté à estimer le gain apporté par l'homogénéisation, appliquée en prétraitement, lors d'une étape d'hydrolyse enzymatique. Dans cette optique, la diminution des coûts enzymatiques induit par le traitement d'homogénéisation pour un procédé classique d'hydrolyse de la cellulose modèle (procédé de référence décrit au point 6.2.2) a été estimée.

Pour ce faire, les prix des complexes enzymatiques utilisés ont été évalués. L'estimation du coût d'achat des enzymes a été donnée en octobre 2012 par la société Novozymes S.A. pour un volume d'achat important compatible avec une utilisation industrielle. Les prix obtenus ont été de 18,50 €/HTVA par litre d'enzyme pour le complexe *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Celluclast® 1.5 L) 30 FPU/ml et de 20,50 €/HTVA par litre pour le complexe *Aspergillus Niger* (Novozym 188) (Novozymes A/S, Denmark), 295 FPU/ml. Il faut noter que les coûts de transport sont inclus dans les prix.

Les coûts enzymatiques relatifs à l'hydrolyse de 1 kilo de cellulose modèle (suivant le procédé de référence décrit au point 6.2.2) sont présentés au tableau 3.

Tableau 3. Coût enzymatique du procédé d'hydrolyse de référence décrit au point 6.2.2.

Procédé	Celluclast® 1.5 L (FPU)	Novozym 188 (CBU)	Coût Celluclast® 1.5L (€)	Novozym 188 (€)	Coût global de l'enzyme pour le test (€)	Coût Total/kg de Cellulose traitée(€)
Référence	25	123	0,0154	0,0085	0,0239	0,956

Le tableau 3 montre que le coût enzymatique moyen d'une hydrolyse enzymatique réalisée dans les conditions décrites au point 6.2.2. avoisine les 1 euro par kilo de cellulose traitée.

Ces chiffres, relatifs à l'estimation du coût enzymatique, doivent être cependant nuancés. De nouveaux complexes enzymatiques sont aujourd'hui en cours de développement et devraient être testés pour affiner cette estimation.

De plus, les coûts enzymatiques sont estimés sur base de l'utilisation de complexe enzymatique possédant un grade alimentaire. Pour le complexe enzymatique issu de *Trichoderma reesei*, un grade technique est aujourd'hui commercialisé (ce qui n'est pas le cas pour le complexe cellobiase). Le prix de ce grade technique, pour des volumes de conditionnement similaires, est de 10,50 €/HTVA le litre, soit 40 % moins onéreux que le grade alimentaire. En faisant l'hypothèse probable que le nombre d'unités dans le grade technique est similaire à celui du grade alimentaire (non vérifié au laboratoire), les coûts enzymatiques du procédé pourraient être nuancés (tableau 4).

Tableau 4. Coût enzymatique du procédé d'hydrolyse de référence décrit au point 6.2.2.

(grade technique)

Procédé	Celluclast® 1.5 L (FPU)	Novozym 188 (CBU)	Coût Celluclast® 1.5L (€)	Novozym 188 (€)	Coût global de l'enzyme pour le test (€)	Coût Total/kg de Cellulose traitée(€)
Référence	25	123	0,0087	0,0085	0,0172	0,688

La comparaison des valeurs de ces deux estimations (tableaux 3 et 4) avec les coûts estimés de l'homogénéisation (tableau 2) montre que l'amélioration des rendements d'hydrolyse induit par les différents prétraitements d'homogénéisation (tableau 5) ne compense pas, dans la configuration actuelle, le surcoût occasionné par ce dernier. En effet, un prétraitement réalisé à une pression de 500 bars avec un degré d'homogénéisation de 4,2 induirait une réduction d'environ 0,32 € au niveau du coût enzymatique.

Tableau 5. Amélioration des rendements d'hydrolyse en fonction des paramètres pression et degré d'homogénéisation appliqué pendant le prétraitement

Pression (bar)	Degré d'Homogénéisation	Amélioration des rendements d'hydrolyse (%)
250	4,2	34
250	12,9	50
250	32,1	71
500	4,2	46
500	12,9	65
500	32,1	103

Cependant, une réduction éventuelle des coûts d'homogénéisation, sur base de l'optimisation des différents paramètres décrit ci-dessus, pourrait rendre le prétraitement attractif économiquement. De surcroit, les gains de matière première (taux d'hydrolyse plus important) ainsi que les économies d'échelle des installations pourraient donc rendre le prétraitement d'homogénéisation financièrement compétitif.

Pour conclure cette discussion sur les coûts d'homogénéisation, les différents calculs réalisés ci-dessus montrent qu'il est actuellement difficile de se prononcer sur la rentabilité de la technologie. Les estimations réalisées montrent que l'homogénéisation est une technologie coûteuse mais ne permettent cependant pas de l'écarter définitivement de la liste des technologies de prétraitements. Il faut également noter que la valeur ajoutée du produit d'hydrolyse final recherché va également influencer les conclusions. Pour le glucose, qui a une valeur ajoutée réduite, il est probable que l'homogénéisation soit une technologie beaucoup trop coûteuse (et de surcroît, son obtention par l'hydrolyse enzymatique). Par contre, dans le cadre de la production de cellobiose, dont la valeur ajoutée est plus importante (3 euros/kilo), le prétraitement d'homogénéisation pourrait se révéler rentable d'un point de vue économique.

7.6. Références

Abatzoglou, N., 1992. Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. Chem. Eng. Sci. 47, 1109-1122

Chikako, A., Ai A., Chizuru. S., Yoshitoshi N., 2011. Characterization of the steam-exploded spent Shiitake mushroom medium and its efficient conversion to ethanol. Bioresour. Technol. In press

Chum, H.L., Johnson, D.K., Black S.K., Overend, R.P. 1990. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. Appl. Biochem. Biotechnol. 24-25.

Chornet E., Overend R.P., 1988. Phenomenological Kinetics and Reaction Engineering Aspects of Steam/Aqueous Treatments. Proceedings of the International Workshop on Steam Explosion Techniques, Fundamentals and Industrial Applications, 21-58.

Fernandez-Bolanos, J., Felizon, B., Heredia, A., Rodriguez, R., Guillen, R., Jimenez, A., 2001. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. Bioresour. Technol. 79, 53-61.

Étude (F)120131-CDC-1134 (2010). Le niveau et l'évolution du prix de l'énergie. Commission de régulation de l'électricité et du Gaz.

International comparison of electricity and gas prices for commerce and industry. Final report on a study prepared for CREG, 2011. Frontier Economics Ltd, London.

Holtzapfel, M. 1991. The ammonia freeze explosion (AFEX) process. Appl. Biochem. Biotechnol. 28, 59-74

http://www.apv.com/pdf/technicalinfo/PB_Cellulose_2008.pdf

http://www.iaamaroc.net/asseleing_iaa/docs/Evaporation_support_du_cours.pdf

http://www.swde.be/xml/fiche__fr-FLASH-0-NBCOL-3-IDC-500-IDD--.html

Moniruzzaman, M., 1996. Saccharification and Alcohol Fermentation of Steam-Exploded Rice Straw. Bioresour. Technol. 55, 111-117.

Negro, M.J., Manzanares, P., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Ballesteros, M., 2003. Changes in various physical/chemical parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment. Biomass Bioenergy. 25, 301-308.

Nunes, A. P., Pourquie, J., 1996. Steam Explosion Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Eucalyptus Wood. Bioresour. Technol. 57, 107-110.

Pedersen, M., Meyer, A.S., 2010. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. New Biotechnology, 27(6), 739-750.

Sun X.F., Xu F., Sun R.C., Geng Z.C., Fowler P., Baird M.S., 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. Carbohydr. Polym. 60, 15-26.

Sorensen, A., Teller, P.J., Hilstrom, T., Ahring, B.K., 2008. Hydrolysis of Miscanthus for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresour. Technol.* 99, 6602-6607.

Yang, B., Wyman, C.E., 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flow through pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 89.95

Zhang, B., Wang, L., Shahbazi, A., Diallo, O., Whitmore, A., 2011. Dilute-sulfuric acid pretreatment of cattails for cellulose conversion. *Bioresour. Technol.* 102, 9308-9312.

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En se focalisant spécifiquement sur la cellulose modèle, cette thèse, qui s'intègre dans le concept de la bioraffinerie, a atteint ses objectifs en permettant une meilleure compréhension des modifications apportées par deux types de prétraitements (la steam explosion et l'homogénéisation) sur les propriétés physicochimiques de la fibre de cellulose et leurs impacts sur les propriétés d'hydrolyse.

La première partie du travail s'est axée spécifiquement sur le prétraitement de steam explosion. Dans un premier temps, un modèle, permettant d'estimer l'intensité des prétraitements de steam explosion sur base d'une corrélation entre la pression et la température, et applicable à des installations pilotes où la montée en température n'est pas instantanée, a été établi. Il a également été montré que ce modèle pourrait être significativement amélioré dans le futur en y intégrant des paramètres liés à l'acidité du milieu et au substrat traité lui-même.

L'étude a ensuite montré que le traitement de steam explosion n'améliorerait pas les rendements d'hydrolyse enzymatique de la cellulose modèle. Ces résultats sont opposés à ce qui est traditionnellement présenté dans la littérature pour les matériaux lignocellulosiques complexes. Cependant, il a été montré que les propriétés physicochimiques des fibres de cellulose (rétention d'eau et cristallinité) sont modifiées au cours du prétraitement et des liens entre ces modifications et les propriétés d'hydrolyse ont été établis. Enfin, l'évaluation de la dégradation thermique de la cellulose a permis d'établir un modèle relatif à la dégradation thermique de cellulose au cours du prétraitement de steam explosion, sur base du facteur de sévérité appliqué.

En termes d'acquis, cette partie du travail a permis :

- D'élaborer un modèle d'estimation de l'intensité du prétraitement de steam explosion transposable à grande échelle ;

- D'estimer l'évolution de la dégradation thermique de la cellulose pendant le prétraitement de steam explosion en fonction de l'intensité du prétraitement ;
- De rendre compte de l'impact exact du prétraitement de steam explosion sur la fibre de cellulose, impact qui est fort différent de ce qui est présenté dans la littérature sur les matériaux complexes.

La deuxième partie du travail s'est principalement axée sur les potentialités d'utilisation de l'homogénéisation comme technologie de prétraitement. Contrairement à la steam explosion, les résultats obtenus ont montré une très nette amélioration des rendements d'hydrolyse de la cellulose, couplée à une nette amélioration des propriétés de rétention d'eau. Il a également été montré qu'un réseau tridimensionnel s'établit au sein des suspensions de cellulose pour les intensités de prétraitement les plus importantes et que le développement de ces propriétés rhéologiques pouvait modifier les propriétés d'hydrolyse de la cellulose. Au delà du potentiel technologique de l'homogénéisation, une analyse des coûts a permis de positionner les perspectives économiques de l'homogénéisation en tant que technologie de prétraitement de la biomasse.

Enfin, la dernière partie du travail, axée sur l'hydrolyse enzymatique de la cellulose modèle, a montré qu'il était possible d'augmenter très significativement les concentrations en glucose dans les hydrolysats par des ajouts successifs d'enzyme et/ou de substrat en cours d'hydrolyse. En parallèle, des liens entre l'évolution des rendements de production en glucose et les principaux facteurs limitants de l'hydrolyse enzymatique ont été établis. Au delà de l'aspect technique, une estimation des coûts des différentes méthodes d'hydrolyse a été réalisée. Il ressort de l'estimation des coûts que la production de glucose par l'hydrolyse enzymatique de matériaux lignocellulosiques est très coûteuse (coût enzymatique par kilo de

glucose important) et aujourd'hui difficilement exploitable dans une optique de production de masse de molécule à faible valeur ajoutée.

En termes d'acquis, cette partie du travail a permis :

- D'identifier l'impact positif du traitement d'homogénéisation sur les propriétés d'hydrolyse d'une cellulose modèle ;
- D'évaluer les potentialités économiques de transfert de cette technologie comme technologie de prétraitement de la biomasse.

De nombreux développements doivent donc encore être réalisés dans cette optique. Dans un premier temps, le développement de complexes enzymatiques possédant des activités plus importantes à des coûts réduits devra être réalisé, étant donné que le coût des enzymes est actuellement le facteur économique limitant des opérations d'hydrolyse.

De nouveaux complexes globaux (mix de cellulases et hémicellulases) qui présentent des activités élevées sont actuellement en cours de développement. Dans un futur proche, l'efficacité de ces complexes devra être évaluée sur différents matériaux lignocellulosiques d'un point de vue technico-économique et ce, en combinaison avec les différentes technologies de prétraitement.

La rentabilité économique des procédés d'hydrolyse par voie enzymatique ne pourra également être concevable que si une fraction importante des enzymes est recyclée. Actuellement, des technologies de recyclage, basées sur des techniques d'ultrafiltration sont en cours de développement. Il n'en reste pas moins que le véritable challenge consistera à récupérer les enzymes adsorbées sur le substrat résiduel. De ce point de vue, la littérature montre que peu d'études sont menées dans ce domaine. L'étude détaillée des phénomènes

d'absorption d'enzyme et la compréhension de leurs mécanismes devrait apporter des améliorations significatives au niveau des coûts d'hydrolyse.

Enfin, la rentabilité de l'hydrolyse enzymatique des matériaux lignocellulosiques complexes sera liée à une optimisation des différents prétraitements. Cette optimisation impliquera notamment une meilleure compréhension des effets apportés par les différents prétraitements sur chacun des composants de la biomasse. Des travaux similaires à cette thèse, axés sur des hémicelluloses ou des lignines modèles pourraient apporter des avancées majeures dans le domaine des prétraitements et la compréhension de leurs effets sur la matière lignocellulosique.

Pour conclure, les résultats acquis au cours de cette thèse indiquent que l'avenir proche du bioraffinage sera lié à l'élaboration de procédés axés sur l'obtention de molécule à plus haute valeur ajoutée, qui intégrera également une valorisation complète de l'ensemble des coproduits issus du procédé.

Au final, il ressort de l'ensemble de ce travail que les matériaux lignocellulosiques possèdent le potentiel nécessaire pour s'intégrer dans une société basée sur le développement durable. Le développement de produits bio-basés à plus haute valeur ajoutée doit cependant être envisagé au même titre que celui des biocarburants.