

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Dans ce chapitre l'objectif est de déterminer les paramètres dirigeant la digestibilité des substrats lignocellulosiques étudiés, en s'aidant des études conduites jusqu'à présent dans ce manuscrit. Il s'agira autant que possible de déterminer dans quelle mesure ces paramètres s'expriment, tant en termes d'amplitude que de plage de validité. L'intérêt de ce chapitre est multiple. Il s'agit de déterminer une partie des liens existants entre les paramètres physicochimiques étudiés. Il vise à lier des paramètres issus de différentes échelles d'observation avec la digestibilité enzymatique, et à prédire de manière relativement simple le rendement en glucose. Pour cela des paramètres sont choisis, non redondants pour expliquer au mieux la digestibilité mesurée. Ce chapitre a donc un double objectif de compréhension et d'application au système étudié. Sauf indication contraire dans une légende, le même code couleur dépendant de la sévérité du prétraitement est utilisé pour représenter les échantillons au fil des figures.

1. Evolution de la conversion en cellulose au cours du temps : modèle cinétique empirique

Comme nous l'avons vu précédemment, la conversion de la cellulose en glucose au cours de l'hydrolyse enzymatique est évaluée de la sorte : la biomasse est introduite à hauteur de 1 % ms de cellulose et est imbibée pendant la nuit. Les hydrolyses enzymatiques sont donc réalisées de façon à ce que la teneur en cellulose dans le milieu soit toujours identique. Les enzymes sont ensuite introduites à $t=0$ puis des prélèvements du surnageant sont réalisés à différents temps (1,5 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, et 144 h) puis analysés par un gluco-stat pour évaluer la teneur en glucose libéré et donc déterminer le rendement en glucose sur l'ensemble de la cinétique.

La conversion de la cellulose en fonction du temps d'hydrolyse $R(t)$ peut être modélisée de manière empirique de la façon suivante :

$$R(t) = R_m \cdot (1 - e^{-k \cdot t})^n \quad \text{Équation (4)}$$

Avec :

- k la constante de vitesse qui définit la rapidité de conversion de la cellulose pour une accessibilité donnée de la cellulose
- R_m le rendement maximal de glucose qu'il est possible d'atteindre lorsque $t \rightarrow +\infty$ (il correspond donc à la quantité totale de cellulose accessible à terme)
- n un coefficient strictement inférieur à 1 que l'on peut fixer de manière commune aux différents échantillons. Dans notre cas, il est posé égal à 0,46. Il est nécessaire à l'obtention du morphisme de la courbe, mais n'a pas de signification physique particulière

Les constantes k et R_m ont été ajustées pour chaque échantillon, afin de modéliser au mieux les courbes expérimentales. Un exemple de cinétique et son ajustement est présenté sur la Figure 91.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

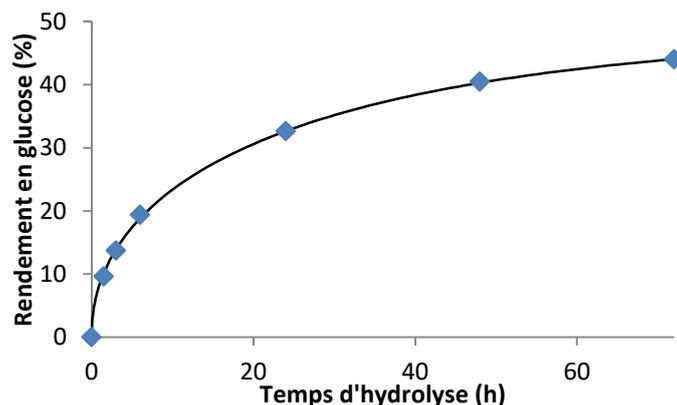


Figure 91. Exemple de courbe obtenue sur l'échantillon C020C qui traduit de la conversion de la cellulose en fonction du temps d'hydrolyse. Un exemple d'ajustement est présenté avec $k=2,27 \cdot 10^{-2} h^{-1}$ et $R_m=48,7$

Ce modèle cinétique ne se base pas sur une approche mécanistique de la dégradation enzymatique de la cellulose dans un substrat lignocellulosique. Il est inspiré d'un modèle de cinétique d'ordre 1 auquel on a rajouté une puissance non entière inférieure à 1 pour se rapprocher au mieux des données expérimentales. On trouve dans la littérature d'autres modèles d'ajustements empiriques possibles avec un morphisme en exponentiel, certains avec une tangente de pente finie au temps 0 [262].

Les valeurs de k et de R_m ont été évaluées pour chaque substrat sur la plage temporelle 0-72 h.

Le rendement en glucose à 72 h est le premier paramètre étudié pour rendre compte de l'évolution de la digestibilité des substrats en fonction des conditions opératoires (partie 12) et des paramètres physicochimiques (partie 13).

2. Effets du prétraitement sur la conversion de la cellulose

a. Le traitement à l'acide dilué

La Figure 92 et la Figure 93 illustrent l'évolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction des conditions opératoires. Deux représentations sont montrées :

- la première en fonction du temps de séjour pour différentes températures,
- la deuxième en fonction de la température pour les différents temps de séjour

Le point pour lequel le rendement en glucose est maximal correspond à un prétraitement à 160 °C pendant 20 min. Sur la Figure 92, il est possible de constater différents comportements en termes de digestibilité enzymatique pour la même paille de blé en fonction de la température de prétraitement :

- lorsque la température de cuisson est faible (égale à 100 °C) l'augmentation du temps de séjour provoque une légère augmentation du rendement de conversion de la cellulose : de 18,9 à 26,4 % pour un temps de séjour variant de 20 à 120 minutes
- pour des températures élevées (160 °C et 180 °C), le rendement maximal en glucose est atteint pour de courts temps de séjour (respectivement 20 et 10 minutes).
- pour une température intermédiaire (140 °C), le rendement maximal en glucose décrit un plateau (à environ 44 %) sur une large plage de temps de séjour (de 20 à 90 minutes).

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

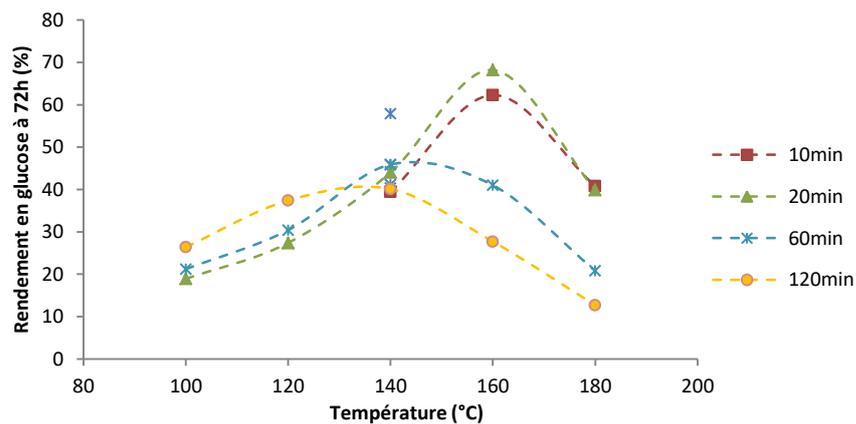


Figure 92 : Evolution du rendement en glucose en fonction de la température du prétraitement (°C)

Par ailleurs, sur la Figure 93, il apparaît que pour un temps de séjour donné, il existe une température pour laquelle la conversion en cellulose est optimale :

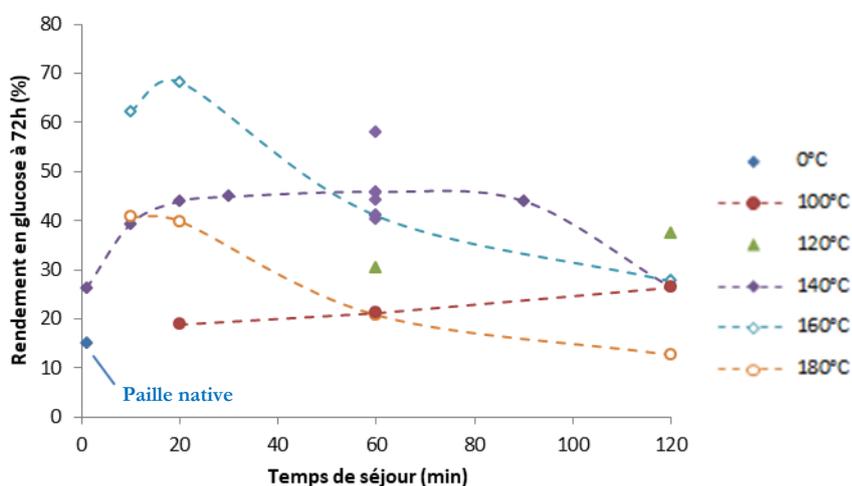


Figure 93 : Evolution du rendement en glucose à 72 h en fonction du temps de séjour (min)

Pour mieux visualiser la contribution de chacune des deux conditions opératoires du prétraitement sur le rendement en glucose obtenu, on peut aussi représenter le rendement en glucose comme fonction du temps de séjour et de la température (Figure 94).

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

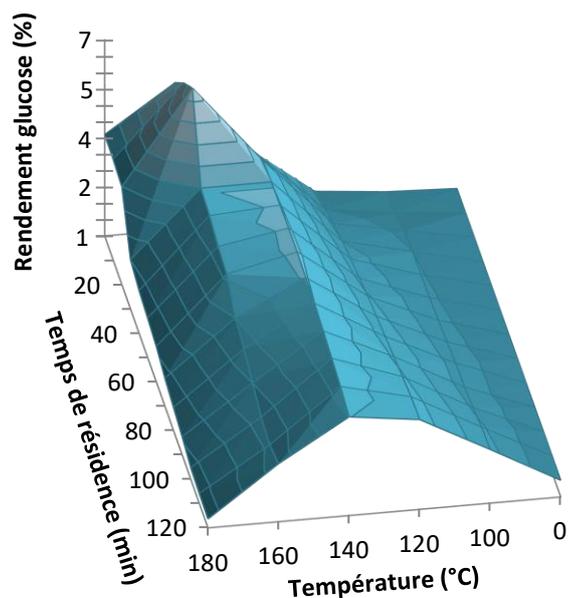


Figure 94 : Rendement en glucose en fonction du temps de résidence et de la température de prétraitement

Les constantes de vitesses k et les rendements maximaux R_m déterminés par ajustement, sont tracés sur la Figure 95. Le rendement maximal R_m suit la même tendance que le rendement à 72 h, puisque à ce grand temps d'avancement, le rendement en glucose est plus dépendant de la cellulose accessible (*via* R_m) que du taux de conversion qui diminue continuellement au cours de l'hydrolyse (*via* la constante de vitesse k).

Par ailleurs, R_m diminue à trop forte sévérité de prétraitement, alors que k diminue globalement quand le facteur de sévérité augmente. En augmentant la sévérité du prétraitement, la cellulose de plus en plus accessible, puis redevient moins accessible. D'autre part, la cellulose accessible est légèrement moins facilement convertie à mesure que la sévérité augmente. Les paramètres régissant le rendement maximal et la cinétique d'hydrolyse sont donc différents.

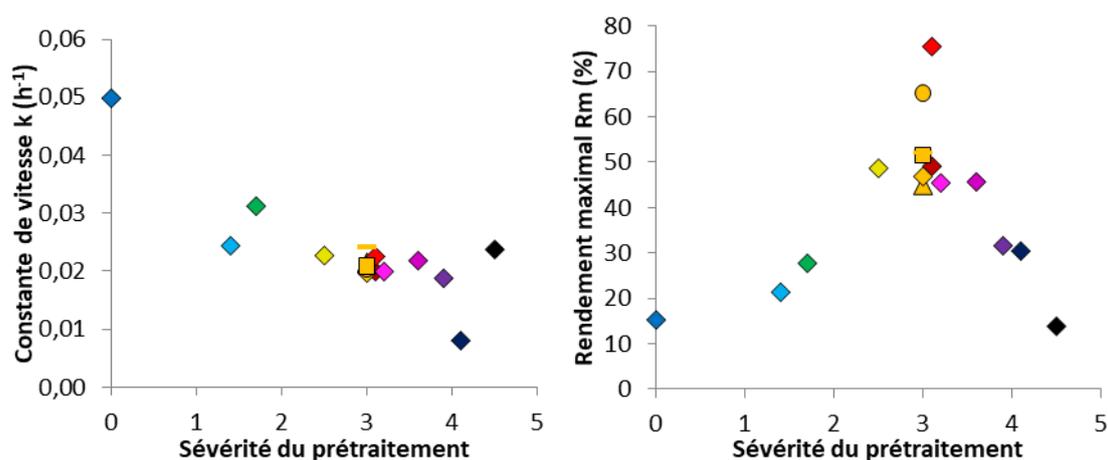


Figure 95 : Constante de vitesse k (à gauche) et rendement maximal R_m (à droite) en fonction de la sévérité du prétraitement à l'acide dilué

b. L'effet de la détente explosive

L'effet de la détente explosive sur la digestibilité des substrats a été investiguée. Pour cela, la paille de blé a été prétraitée à l'acide dilué à différentes conditions opératoires, puis le pH a été rehaussé (rendu neutre par ajout de soude) avant que la paille prétraitée ne soit à nouveau chauffée dans le réacteur

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

d'explosion vapeur et détendue en pression à 7, 14 ou 20 bar. Ces substrats ont été décrits dans le chapitre précédent.

La Figure 96 montre pour chaque échantillon l'effet de la détente explosive sur le rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse, pour différentes variations de pression. Plusieurs points sont à noter. Pour la paille non prétraitée et les échantillons produits à 100 et 120 °C, le rendement en glucose est maximal (ou similaire à celui obtenu en absence de détente) lorsque la variation de pression est la plus importante (20 bar). Au contraire, les pressions intermédiaires (7 et 14 bar) semblent avoir un effet néfaste sur la digestibilité des échantillons traités à 100, 120, et 140 °C. Pour les échantillons traités à l'acide dilué à 180 °C, la conversion en cellulose reste grossièrement inchangée quelle que soit la pression de la détente explosive. L'effet positif de la forte détente à faibles sévérités (jusqu'à 120 °C) provient directement de la reprise d'hydrolyse des hémicelluloses lors du chauffage nécessaire à la mise en pression avant détente explosive. Cet effet n'est donc pas une conséquence de la détente explosive. Pour des pressions intermédiaires et/ou à plus haute température, la détente explosive n'a au mieux pas d'effet sur la digestibilité.

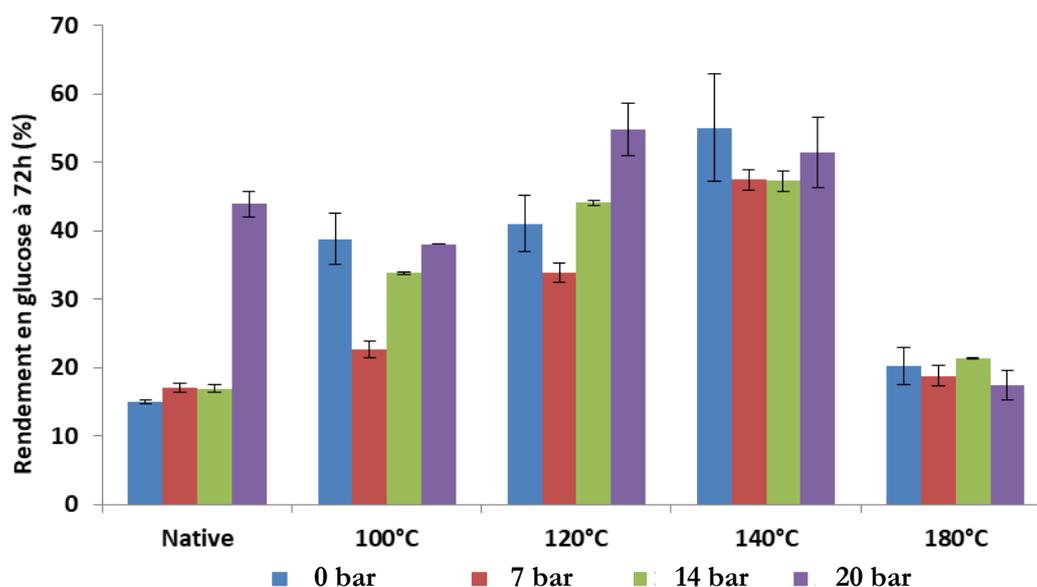


Figure 96 : Rendement en glucose en fonction de l'amplitude de la détente explosive, pour les différentes conditions opératoires de traitement à l'acide dilué réalisées en amont

3. La recherche de descripteurs

Dans cette partie on raisonne principalement sur un ensemble d'échantillons le plus exhaustif en termes d'analyse, de plage de sévérité de prétraitement testée, et de nombre d'échantillons produits, à savoir les échantillons produits par traitement à l'acide dilué. Lorsque possible, les échantillons servant à l'étude de la détente explosive seront également considérés.

a. Propriétés chimiques

i La teneur en hémicelluloses

Les hémicelluloses sont responsables de la limitation de l'accessibilité de la cellulose aux enzymes, par recouvrement physique. Ces hémicelluloses peuvent être hydrolysées de manière plus ou moins totale à la faveur d'un traitement à l'acide dilué. La Figure 97 trace la conversion en cellulose à 72h en fonction du taux d'hémicelluloses mesuré par IR sur les échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué pour des sévérités comprises entre 0 et 3,1 (sévérités faibles et intermédiaires des phases 1 et 2). Nous pouvons constater que la teneur en hémicelluloses est directement en lien avec la digestibilité du substrat. Comme décrit dans l'état de l'art, ce type d'évolution est complètement conforme à ce qui peut être trouvé dans la littérature [80].

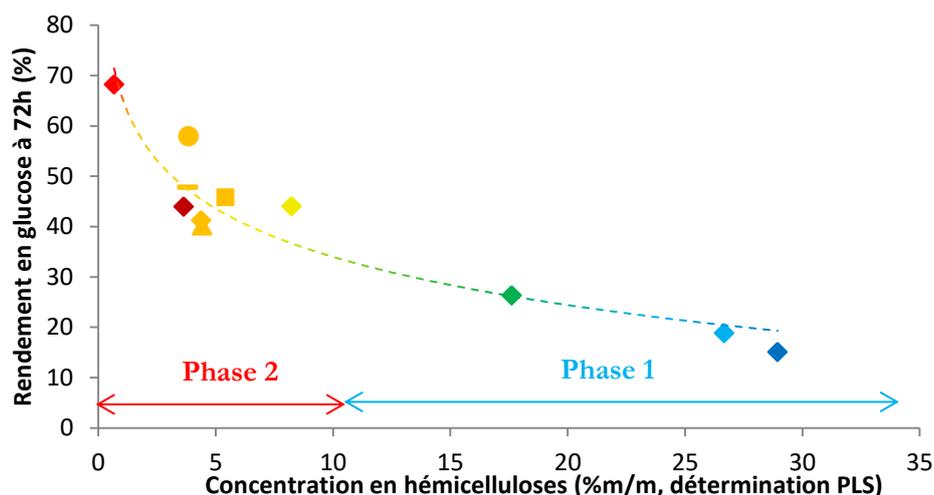


Figure 97 : Evolution du rendement en glucose à 72 heures d'hydrolyse enzymatique des échantillons traités à l'acide dilué, en fonction de la concentration en hémicelluloses déterminée par mesure IR et régression PLS des données IR

La tendance observée est globalement du même type pour les échantillons de l'étude de la détente explosive, comme l'illustre la Figure 98, avec cependant une dispersion plus importante des rendements en glucose par rapport à la droite de corrélation et une décroissance différente possiblement due à la dose doublée d'enzymes utilisée sur cette série d'échantillons.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

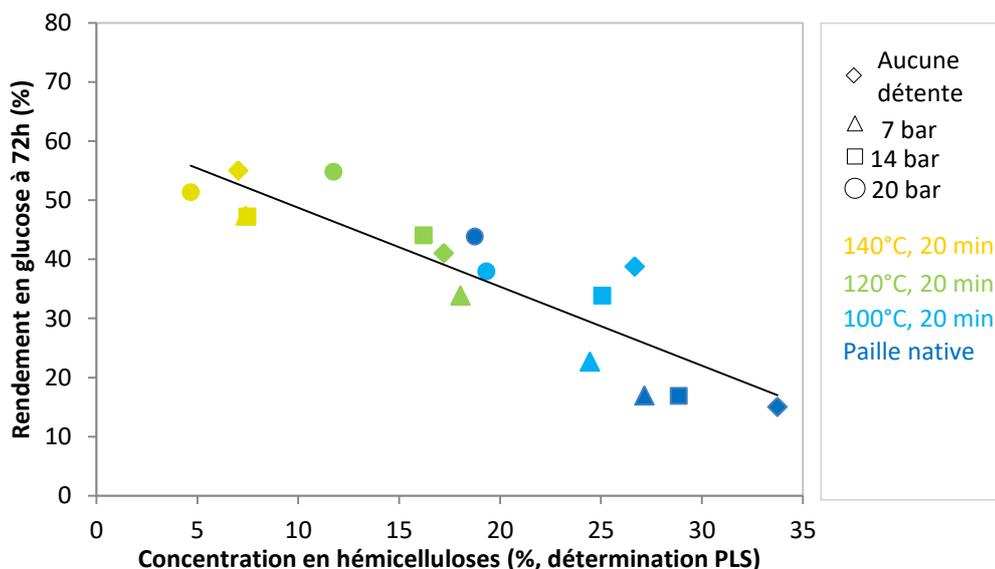


Figure 98 : Evolution du rendement en glucose à 72 heures d'hydrolyse enzymatique en fonction de la concentration en hémicelluloses déterminée par mesure IR et régression PLS des données IR

ii La teneur en lignine

Comme expliqué dans l'état de l'art, la lignine est une source de récalcitrance identifiée en hydrolyse enzymatique en intervenant à la fois en tant qu'obstacle physique pour bloquer l'accès des enzymes à la cellulose et en favorisant l'affinité que peuvent porter les enzymes envers certaines lignines (dépendamment de la biomasse, et du traitement utilisé). Elle est aussi réputée pour limiter le gonflement de la matrice (donc l'imprégnation d'acide sulfurique) et rendre cette matrice hydrophobe (ce qui ralentit là encore l'imprégnation).

La Figure 99 représente la conversion de la cellulose à 72h en fonction de la teneur en lignine déterminée par IR pour nos échantillons. Dans notre cas, **la teneur en lignine ne semble pas être en lien direct avec la conversion de la cellulose dans le cadre des substrats étudiés.**

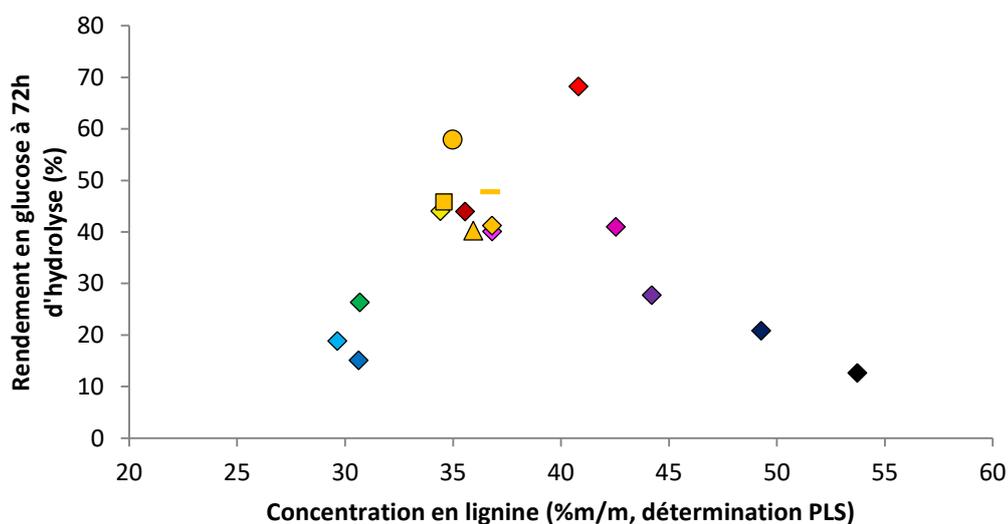


Figure 99 : Evolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en lignine déterminée régression PLS des données IR

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Ceci peut provenir de deux raisons :

- La première est le fait que le traitement à l'acide dilué n'a pas pour vocation de changer drastiquement le taux de lignine (par hydrolyse par exemple). La lignine étant très stable en milieu acide, elle n'est que peu hydrolysée dans le milieu réactionnel. L'évolution de la concentration relative en lignine dans le substrat solide après prétraitement est le fruit de l'hydrolyse des hémicelluloses (puis de la cellulose et de la formation d'humines à forte sévérité).
- Deuxièmement, **plus que la teneur en lignine, c'est la répartition spatiale de celle-ci qui se révèle critique quant à l'accessibilité de la cellulose**, de même que les liens covalents qu'elle réalise avec les polysaccharides présents, et éventuellement sa structure [181]. Dans notre cas, les observations en microscopie MEB ont montré qu'à partir de 140 °C, la lignine pouvait être sujette à des modifications au niveau de sa distribution dans la matrice lignocellulosique, à savoir sous forme de gouttelettes : on suppose que l'action combinée de la température qui ramollit la lignine et de l'hydrolyse des hémicelluloses (qui sont liées intimement à la lignine et entourent des microfibrilles de cellulose), provoque la migration et le regroupement d'une partie de la lignine sous une forme compacte sphérique, ce qui minimise par là même son énergie de surface. Pendant le refroidissement, la lignine se fige dans cet état-là. Des gouttelettes sont ainsi formées et sont visibles à la surface des parois cellulaires (Figure 100a). Pour les substrats traités à l'acide dilué entre 140 et 160 °C, cette réduction de surface de lignine participerait à une meilleure accessibilité de la cellulose aux enzymes. De plus dans l'hypothèse d'une adsorption non productive d'enzymes sur la lignine, le regroupement de la lignine sous une forme compacte est là-aussi providentiel. Des observations réalisées en microscopie confocale sur l'échantillon D020C produit par traitement à l'acide dilué à une sévérité optimale de 3,1 (température de 160 °C pendant 20 min), montre l'existence de particules qui ont perdu leur structure cellulaire à la faveur du prétraitement. Ces particules sont les plus présentes chez l'échantillon D020C. Un marquage préalable fixe la safranine sur le substrat et provoque une fluorescence de la lignine à 640-700 nm (avec une excitation à 640 nm) représentée ici dans le canal rouge, et une fluorescence de la cellulose à 510-550 nm (avec une excitation à 488 nm) représentée ici dans le canal vert. Les observations réalisées montrent que ces particules déstructurées présentent des zones cellulosesiques et des zones ligneuses qui sont spatialement disjointes, contrairement à ce que l'on peut trouver pour les tissus lignifiés non altérés, ce qui rend la cellulose de ces particules d'autant plus accessible.

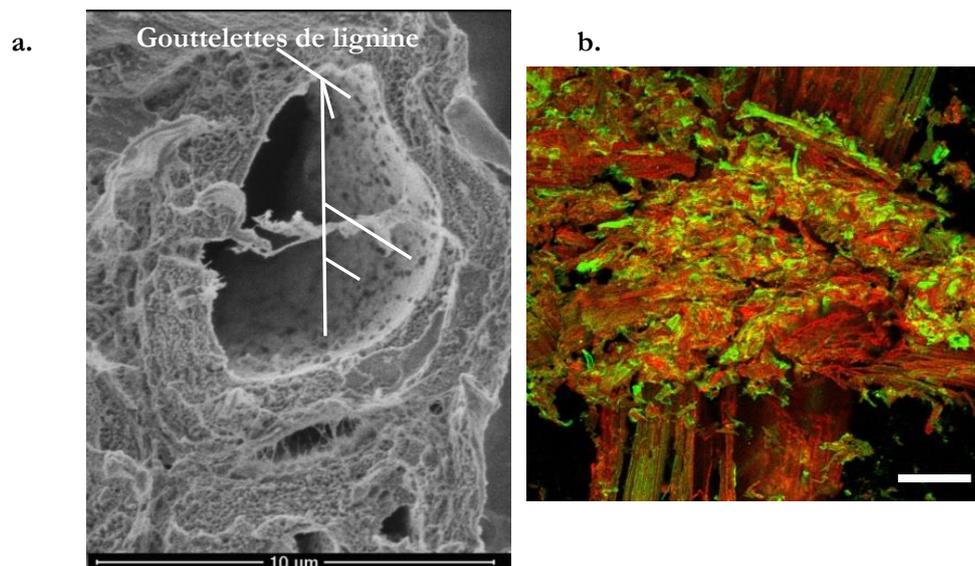


Figure 100 : a. Exemples de clichés mettant en évidence les gouttelettes de lignine dans le lumen d'une cellule lignifiée de l'échantillon D020C ; b. Image en microscopie confocale d'une coupe microscopique de l'échantillon D020C au niveau d'une zone déstructurée. Barre d'échelle, 100 µm

Pour toutes ces raisons, il est donc normal que ce ne soit pas la teneur en lignine en elle-même qui soit critique au niveau de la réactivité des échantillons.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

iii La teneur en humines

Les humines sont des composés dont la structure complexe et le mécanisme de formation à partir de différents sucres et autres précurseurs font l'objet de recherches [96,98,99,263–265]. Elles semblent largement responsables de la baisse de réactivité en phase 3. Ceci est illustré par la Figure 101 pour laquelle on remarque que le rendement en glucose à 72 heures diminue avec la formation des humines (dès les premiers pourcents). Cette évolution est, dans une certaine mesure, du même type que celle rencontrée pour les hémicelluloses.

Les humines limitent donc drastiquement la conversion de la cellulose au cours de l'hydrolyse, que ce soit à cause d'un masquage des fibrilles de cellulose ou par un phénomène d'adsorption non productive des enzymes sur ces humines.

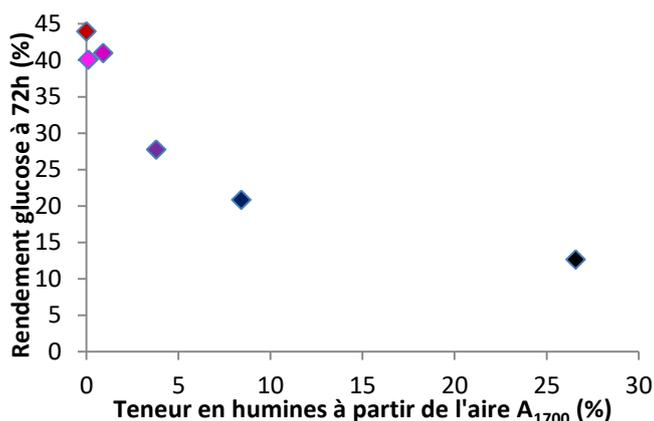


Figure 101 : Evolution du rendement en glucose à 72 heures d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en humines estimées à partir des régressions PLS, pour les échantillons produits par traitement à l'acide dilué

iv La teneur en cellulose

La teneur en cellulose des substrats de l'étude du traitement à l'acide dilué évolue de manière intéressante avec le rendement en glucose à 72 h avec le teneur en cellulose. La Figure 102 montre cette évolution. La tendance indiquée sur la figure est réalisée en sachant qu'à 0 % de cellulose la conversion est nulle, et que lorsque la concentration tend vers 100 %, la conversion à 72 h de la cellulose tend vers 100 % (tout du moins à la dose d'enzyme utilisée en hydrolyse standard), puisque la cellulose se retrouve seule et est donc complètement accessible.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

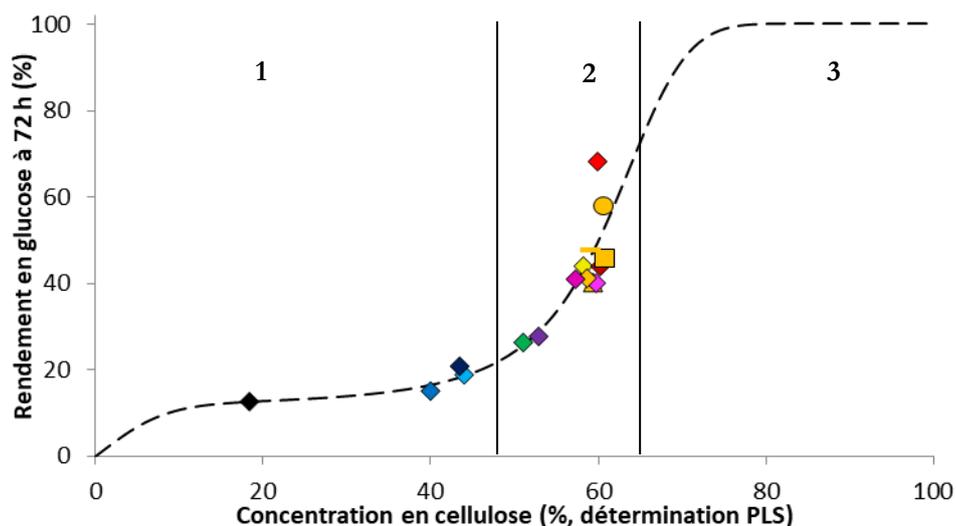


Figure 102 : Evolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en cellulose du substrat

Cette évolution s'explique par le fait que l'évolution de la teneur en cellulose est en lien direct avec l'hydrolyse des hémicelluloses dans un premier temps, le retrait de la cellulose elle-même dans un second temps, et à la proportion d'humines formées :

- À faible concentration en cellulose (zone 1), la cellulose est difficilement accessible car masquée par d'autres composés : lignine, hémicelluloses à faible sévérité, humines à forte sévérité.
- A concentration intermédiaire de cellulose (zone 2), le rendement en glucose est limité par la présence de ces composés résiduels ou par d'autres paramètres physiques limitant l'accessibilité de la cellulose
- A forte concentration en cellulose (zone 3 non décrite par des substrats réels), l'accessibilité à la cellulose ne serait plus limitante.

Cette tendance est toutefois mise en défaut par exemple lorsque l'on considère les échantillons de l'étude de la détente explosive (Figure 103), pour lesquels il existe des rendements en glucose proches dont les échantillons ont une teneur en cellulose pourtant très variable (33 et 57 %).

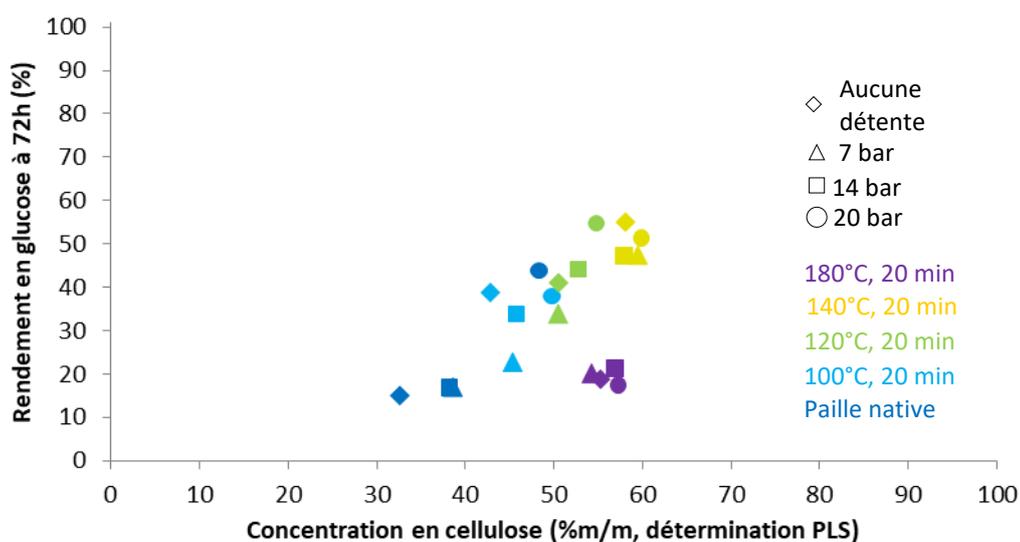


Figure 103 : Evolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction de la teneur en cellulose du substrat

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

On retiendra donc que la teneur en cellulose n'est pas un descripteur majeur de la digestibilité, d'autant plus que ses variations témoignent à la fois de l'hydrolyse des hémicelluloses et de l'hydrolyse de la cellulose (et de la formation d'humines par déshydratation des polysaccharides), qui ont des répercussions potentiellement différentes sur l'accessibilité de la cellulose résiduelle.

v La cristallinité de la cellulose

La cellulose cristalline est connue pour avoir une digestibilité moindre notamment parce que la structure cristalline (allomorphes I_β et I_α dans notre cas) permet une adsorption des enzymes en moins grande abondance, et un clivage des liaisons $\beta(1,4)$ moins rapide [158]. Dans le cadre de notre étude, l'évolution du rendement en glucose à 72 h en fonction de l'indice de cristallinité IC_{cell} des échantillons de l'étude du traitement à l'acide dilué est montrée en Figure 104. On remarque ainsi qu'il n'y a pas de tendance qui s'en dégage. Comme expliqué au chapitre précédent, il est important de préciser qu'entre le début de la phase 1 et la fin de la phase 2, l'indice de cristallinité subit une augmentation de l'ordre de 10 points, qui est liée à l'hydrolyse partielle et préférentielle de la cellulose amorphe durant le prétraitement. Ainsi, la cellulose présente dans le substrat étant plus cristalline, celle-ci devrait être plus lentement dégradée. L'indice de cristallinité n'est donc pas un descripteur direct du rendement en glucose à 72 h.

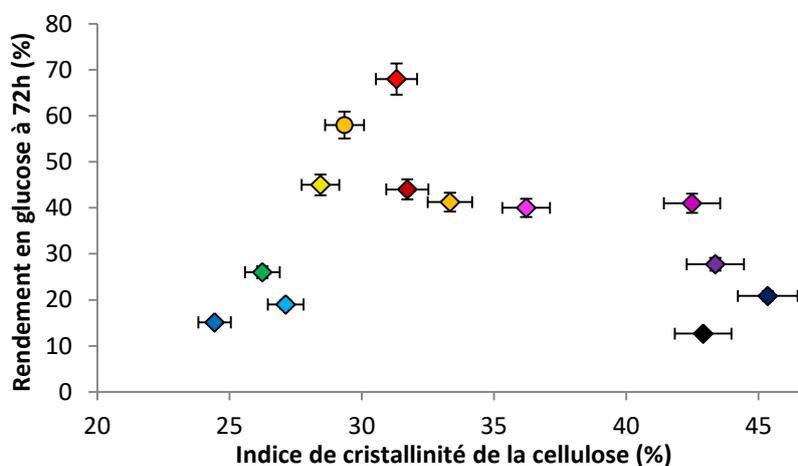


Figure 104 : Evolution du rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique en fonction de l'indice de cristallinité des échantillons produits par prétraitement à l'acide dilué

La Figure 105 montre l'évolution de la constante de vitesse en fonction de l'indice de cristallinité de la cellulose. Il semble qu'il existe une certaine corrélation négative entre ces deux paramètres. Il est intéressant de noter que les échantillons présentant les taux de conversion et les indices de cristallinité les plus éloignés sont la paille native (en haut à gauche) et l'échantillon E060C (en bas à droite). Ce dernier a été obtenu dans des conditions opératoires très sévères de prétraitement (180 °C pendant 60 min). Ces deux échantillons ont cependant des rendements de conversion à 72 h assez proches (15 % pour la paille non traitée et 20 % pour l'échantillon E060C). On constate également que pour des conditions opératoires intermédiaires et optimales, et notamment telles qu'elles seraient pratiquées dans le cadre d'une production industrielle, autour d'une sévérité de 3 (échantillons en orange), l'indice de cristallinité ne semble pas être un paramètre déterminant de la vitesse de conversion en début d'hydrolyse.

L'indice de cristallinité conditionne donc une partie de la vitesse de conversion enzymatique de la cellulose pour une accessibilité donnée, à savoir lorsque le facteur de sévérité du prétraitement est inférieur à 3 ou supérieur à 3,5. A l'inverse, la valeur de cet indice n'est pas déterminante quant à l'accessibilité de la cellulose dans la matrice totale. Ainsi, l'effet de l'indice de cristallinité pourra être remarqué dans les premiers temps de l'hydrolyse enzymatique, pour des échantillons trop ou trop peu sévèrement prétraités.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

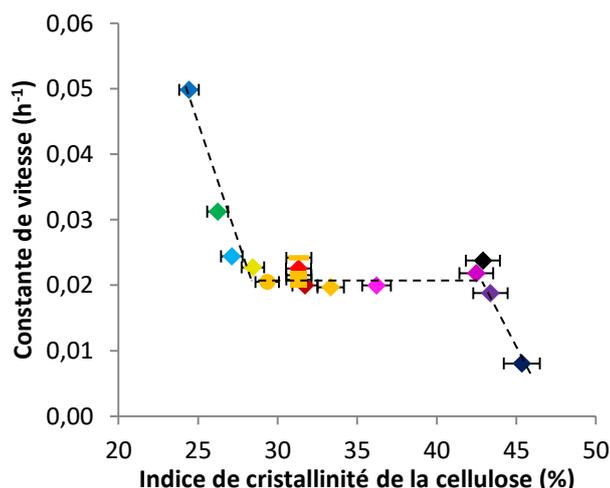


Figure 105 : Constante de vitesse de la cellulose en fonction de l'indice de cristallinité

vi Les propriétés d'autofluorescence

Plusieurs études de la littérature amènent à penser que les propriétés de fluorescence de matrices lignocellulosiques peuvent être mises en lien avec la digestibilité des substrats [123,172,183,266]. Les propriétés de fluorescence témoignent de la présence ou de l'état d'altération de certains composés chimiques, en l'occurrence les unités phénylpropanes de la lignine, et les acides hydroxycinnamiques situés à la fois sur certaines lignines (celles des parois secondaires, mais pas au niveau de la lamelle moyenne) et les hémicelluloses.

Dans notre cas, on s'intéresse d'une part à la fluorescence rouge émise par excitation bleue qui est censée être émise par les doubles liaisons conjuguées de carbone des unités de la lignine, et d'autre part à la fluorescence bleue émise par excitation ultraviolette (UV-B). Les autres canaux utilisés dans le chapitre précédent pour caractériser l'évolution de la fluorescence dépendamment du prétraitement ne sont pas rigoureusement redondants, mais donnent globalement le même type d'information. C'est pour cela que l'on utilise ici seulement 2 canaux, qui sont orthogonaux quant à l'information qu'ils fournissent. La Figure 106 indique l'évolution du rendement en glucose en fonction des intensités de fluorescence rouge (par excitation bleue), et bleue (par excitation UV-B). Pour les échantillons des phases 1 et 2, on retrouve grossièrement les tendances décrites dans la littérature, à savoir que la perte de fluorescence s'accompagne d'une augmentation du rendement en glucose. Mais à plus forte sévérité et lorsque le rendement en glucose diminue à cause de la formation des humines, la perte de fluorescence se poursuit et se termine. La relation entre la conversion de la cellulose et la fluorescence respective des acides hydroxycinnamiques et de la lignine, apparaîtrait comme simple témoin des modifications de la matrice, en regard des autres modifications chimiques majeures qui ont lieu. En effet, entre l'hydrolyse des hémicelluloses et la modification de la répartition de la lignine dans les parois, il est difficile de conclure si c'est directement la perte ou l'altération des espèces chimiques à l'origine de la fluorescence qui est responsable de la meilleure digestibilité du substrat.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

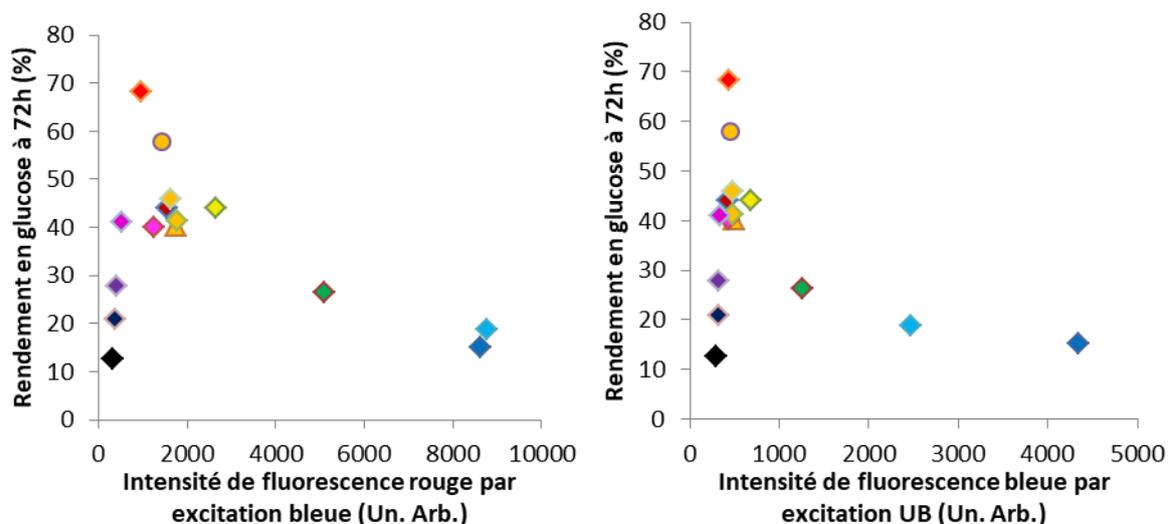


Figure 106 : Rendement en glucose en fonction de l'intensité moyenne de fluorescence des images mosaïques multispectrales

vii Conclusion sur l'influence des paramètres chimiques

D'après les expérimentations réalisées sur les échantillons considérés, les hémicelluloses limitent par leur présence l'accessibilité de la cellulose vis-à-vis des enzymes. Cet effet est visible pour les échantillons de la première et de la deuxième phase (i.e. à sévérité douce et intermédiaire de prétraitement). De ce fait, leur concentration semble être un descripteur pertinent notamment en vue de la détermination de la conversion de la cellulose à partir de propriétés physicochimiques appropriées. La présence d'humines limite visiblement la quantité de cellulose accessible, avec une amplitude qui dépend de l'abondance celles-ci. L'indice de cristallinité de la cellulose semble déterminer la valeur de la constante de vitesse k de l'hydrolyse, notamment hors des plages de conditions opératoires optimales (à savoir à faibles et très fortes sévérités). En revanche, il ne semble pas avoir d'effet particulier sur la quantité de cellulose accessible. Ainsi, en fin d'hydrolyse, cet effet de la cristallinité n'est plus mesurable (contrairement au tout début de l'hydrolyse).

Par ailleurs, la teneur en lignine n'a pas été directement mise en lien avec la digestibilité des substrats, bien que la lignine soit réputée participer activement à la récalcitrance de la lignine. Par les observations microscopiques faites, il semble que la répartition de la lignine dans la matrice soit plus importante que son abondance. Les travaux en microscopie confocale exposés dans la partie suivante, confirmeront ce point en s'intéressant à la chimie de surface, accessible et exposée aux enzymes lors de la saccharification.

Cette notion d'accessibilité de la cellulose semble être cruciale et est conditionnée à la fois par la composition chimique et par la structure de la matrice, c'est pourquoi il est aussi intéressant d'étudier d'autres paramètres possiblement liés à cette notion d'accessibilité comme la taille des particules, la surface spécifique S_{BET} et chimie de surface, telle qu'exposée aux enzymes.

b. La taille des particules

La Figure 105 présente l'évolution du rendement en glucose à 72 h en fonction du diamètre médian équivalent des distributions granulométriques en abondance volumique. Aucun lien direct avec le rendement en glucose des différents échantillons traités à l'acide dilué (et de granulométrie initiale de 2 mm) n'est observé. La même observation est faite pour la constante de vitesse k .

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

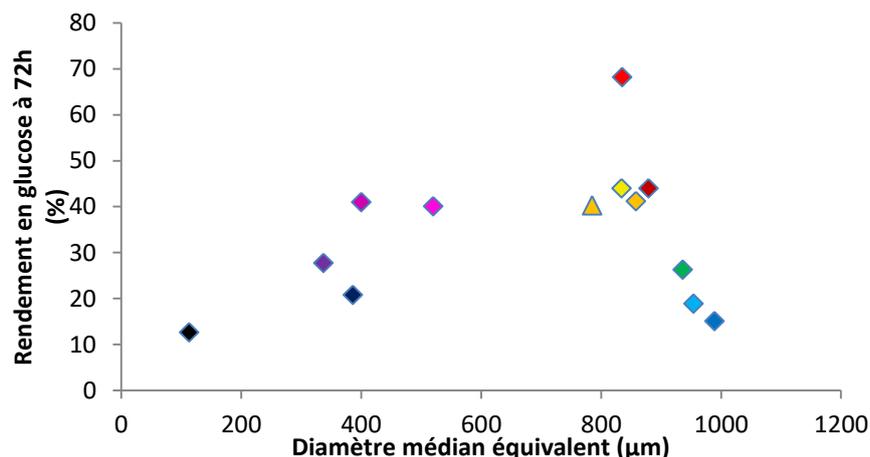


Figure 107 : Evolution du rendement en glucose en fonction du diamètre médian équivalent, pour les distributions en abondance volumique de pailles de blé prétraitées à l'acide dilué

Une autre confirmation de ce résultat provient de l'échantillon C060C5 qui est la seule répétition de ces conditions opératoires avec une granulométrie initiale (avant prétraitement) de 20 mm. Comme on peut le voir dans le Tableau 20, cet échantillon possède une composition chimique et une cinétique de saccharification identique à celle des autres répétitions (dont la granulométrie initiale était de 2 mm) de ces conditions opératoires de prétraitement (compte tenu des incertitudes expérimentales et instrumentales).

Tableau 20 : Teneur en polysaccharides (cellulose et hémicelluloses, détermination PLS) et rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse enzymatique pour les échantillons C060C de granulométrie avant prétraitement de 20 et 2 mm

	Cellulose (%ms)	Hémicelluloses (%ms)	Rendement en glucose à 72h (%)
Moyenne des C060C (granulométrie 20 mm)	59,1	3,8	47,8
Moyenne des C060C (granulométrie 2 mm)	59,8	4,5	46,3

Ainsi, la réduction de granulométrie ne constitue pas un descripteur pertinent de la réactivité, tout du moins sur cette plage de granulométrie et pour nos substrats considérés, ce qui diffère légèrement de ce qui a été trouvé par Liu *et al.* [88] chez qui l'augmentation de la taille des particules (sur une plage de taille de 5 à 25 mm) était bénéfique pour la saccharification (c'est l'inverse pour des granulométries bien plus fines sans prétraitement [89,267]).

c. L'état de porosité et état de surface

Les liens pouvant exister entre la surface BET (et donc le volume poreux, qui lui est linéairement lié dans notre cas) ou les propriétés des distributions en taille de pores, avec la digestibilité des substrats lignocellulosiques sont ici étudiés.

i Le cas des échantillons traités à l'acide dilué

On s'intéresse dans un premier temps aux échantillons produits par cuisson à l'acide dilué. La Figure 108 montre l'évolution du rendement en glucose en fonction de la surface BET. Concernant la phase 1, le rendement est globalement en coévolution avec la surface BET. Nous avons vu dans le chapitre précédent que la surface BET développée dans les échantillons de la phase 1 était induite par le retrait des hémicelluloses. Quant à la phase 3 (échantillons mauves à noirs), le rendement en glucose est en coévolution négative avec la surface BET. Pour rappel, cette surface BET très importante développée dans les échantillons de la phase 3 peut être reliée à la présence d'humines, dont la porosité peut également

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

être appréciée par les observations MEB qui dévoilent une structure friable et rugueuse (voir le chapitre précédent) caractéristiques de ces fortes sévérités.

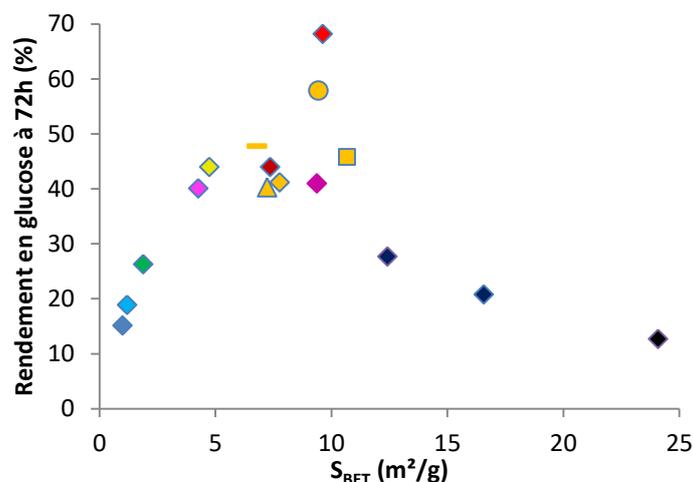


Figure 108 : Evolution du rendement en glucose en fonction de la surface BET

Ainsi, il est difficile d'établir à ce stade si la surface accessible contribue à la digestibilité, indépendamment des facteurs chimiques, car la surface accessible est fortement dépendante des hémicelluloses et humines. Les deux paragraphes qui suivent permettent de mieux comprendre les effets que peuvent avoir la surface accessible sur la digestibilité des substrats.

Concernant les distributions en taille de mésopores, la porosité étant du même type sauf à forte sévérité de prétraitement où les distributions sont légèrement décalées vers des tailles de pores plus grandes, on considère qu'il n'y a pas de lien entre les distributions calculées et la conversion de la cellulose. De plus, la microporosité semble être absente (tout du moins à l'état lyophilisé). De ce fait, **la surface BET mesurée est *a priori* directement représentative de la surface développée physiquement accessible aux enzymes.**

ii Une modification de surface à chimie égale

Afin de s'assurer que la surface accessible mesurée *via* la surface BET est un descripteur pertinent de la digestibilité des substrats de manière complètement indépendante de la composition des substrats, nous avons exploité le phénomène d'effondrement irréversible de la matrice lignocellulosique (phénomène d'hornification) qui se produit lorsque l'on sèche un substrat de manière traditionnelle (à l'air libre, ou en étuve). Dans un tel cas, la chimie est identique au même substrat non séché ou lyophilisé, et la surface accessible du substrat est largement réduite même après ré-imprégnation. De cette manière, la comparaison des cinétiques donne l'impact seul de la surface accessible sur la digestibilité des substrats.

Pour mener à bien cette étude, trois échantillons sont choisis, à savoir les échantillons A060C (phase 1, traitement à 100 °C pendant 60 min), C030C (phase 2, traitement à 140 °C pendant 30 min), et E010C (phase 3, traitement à 180 °C pendant 10 min).

Ces échantillons ont été caractérisés par physisorption d'azote afin de déterminer leur surface BET. Les valeurs sont indiquées dans le Tableau 21.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Tableau 21 : Surfaces BET par séchage en étuve ou par lyophilisation

	Etat	S _{BET} (m ² /g)
A060C	lyophilisé	2,7
	étuve	1
C030C	lyophilisé	6,0
	étuve	2,6
E010C	lyophilisé	8,8
	étuve	5,9

La Figure 109A montre les cinétiques obtenues pour ces trois échantillons, pour les spécimens laissés humides, et ceux séchés à l'étuve (50 °C pendant 24 h) puis ré-imprégnés. On constate qu'effectivement la réduction irréversible de surface occasionnée par l'hornification a bien un effet délétère sur la saccharification. La Figure 109B qui s'intéresse plus particulièrement aux faibles temps d'hydrolyse, montre qu'en plus d'une réduction de la conversion de la cellulose, l'hydrolyse semble commencer avec un retard (d'environ 1 h). Cela suggère que dans ce cas la diffusion des enzymes dans les tissus est un paramètre limitant la conversion de la cellulose au démarrage de l'hydrolyse.

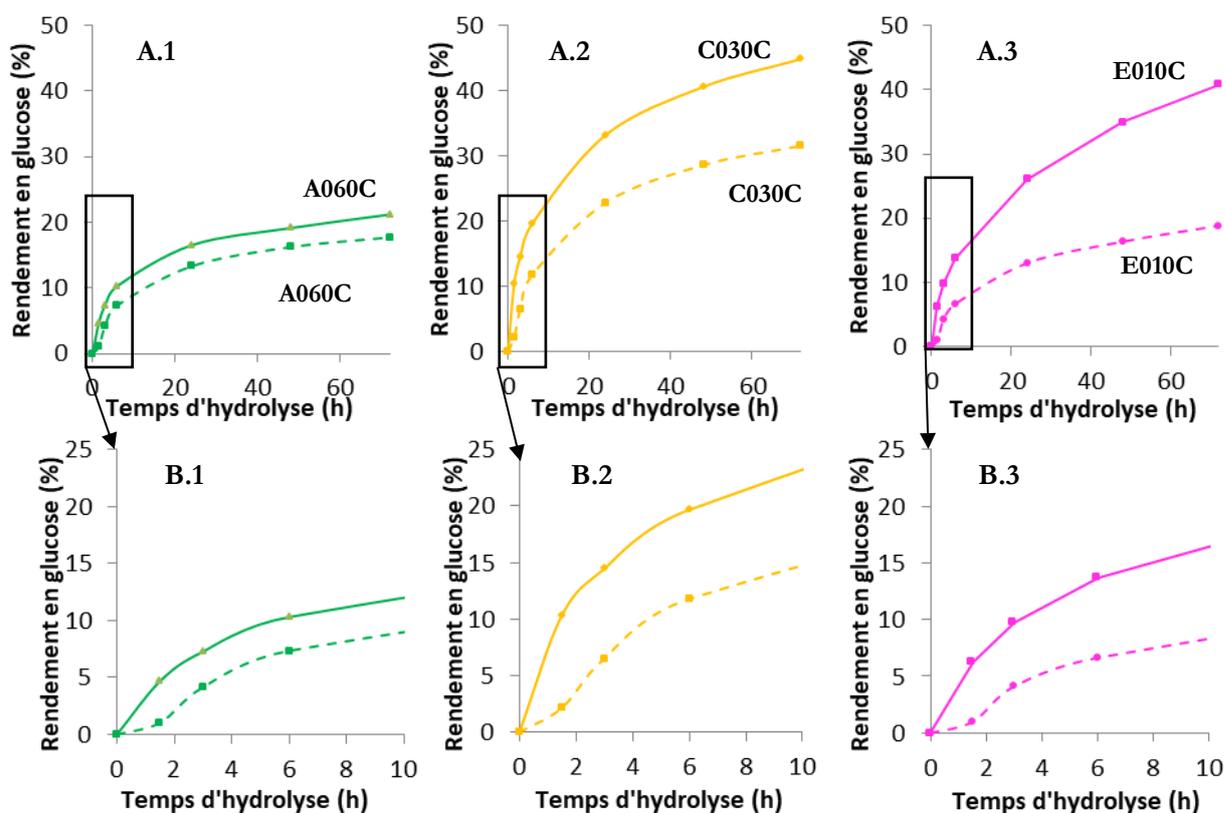


Figure 109 : Cinétiques de dégradation d'un échantillon de la première phase (A.1 et B.1), de la deuxième phase (A.2 et B.2) et de la troisième phase (A.3 et B.3), sans séchage (cas classique, en traits continus) et avec séchage à l'étuve (tirets). Les figures A et B représentent respectivement les longs et courts temps d'hydrolyse enzymatique

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Si l'on rapporte la baisse de rendement à 72 h d'hydrolyse au rendement de référence (sans séchage), on constate que la réactivité de l'échantillon de la phase 3 (E010C) est le plus sensible à l'effet du séchage et donc à la modification de surface.

On souhaite maintenant lier la perte relative de rendement avec la perte relative de surface entre l'échantillon lyophilisé (dont on suppose qu'elle est représentative de celle de l'échantillon non séché) et l'échantillon séché à l'étuve. La Figure 110 montre que plus la perte de surface est importante, moins la perte de rendement est importante. Ceci permet de montrer que l'effet de la surface sur la saccharification varie dépendamment de la sévérité de l'échantillon, **ce qui fait de la surface accessible un descripteur, mais dont l'expression varie dépendamment de la chimie du substrat.**

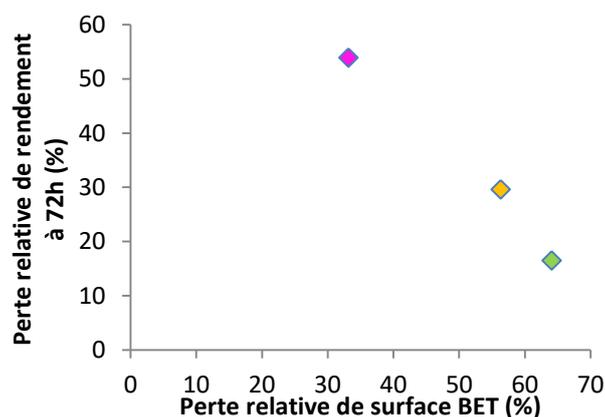


Figure 110 : Evolution de la perte relative de rendement en glucose à 72 h en fonction de la perte relative de surface BET

iii Et les échantillons explosés dans tout ça ?

On considère les échantillons prétraités à l'acide dilué puis soumis à une détente explosive sans qu'il y ait de reprise d'hydrolyse des polysaccharides lors de l'étape du chauffage avant détente. Il s'agit des séries C020V, C060, et E020 aux différentes pressions. Sur ces échantillons, l'augmentation de la surface accessible est directement attribuable à l'effet physique de la décompression. On constate que pour ces échantillons, le gain en surface ne se manifeste pas par un rendement de conversion plus élevé. Cela montre que l'effet de la surface sur la conversion de la cellulose est très dépendant de la chimie de surface du substrat, qui ici a pu changer dépendamment de la pression (par exemple lors de l'étape de réchauffage).

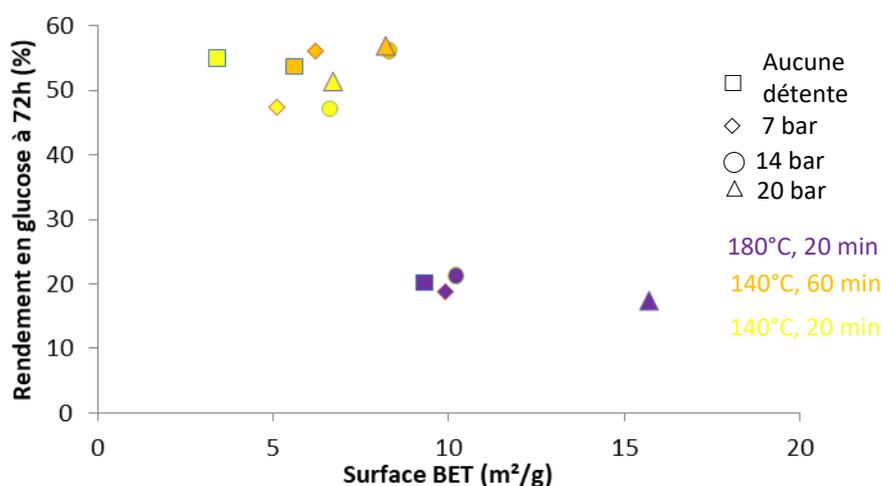


Figure 111 : Conversion de la cellulose en fonction de la S_{BET} pour échantillons explosés et sans reprise d'hydrolyse

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

iv Chimie de surface par microscopie confocale

Le suivi de la chimie de surface par moyen microscopique est particulièrement intéressant par le fait que les informations sont résolues spatialement et susceptible d'être plus représentatif de la chimie qui est réellement exposée aux enzymes, contrairement à la chimie globale. L'étude de la chimie de surface devrait rendre compte de cet effet de distribution surfacique de la lignine à faible sévérité de prétraitement, ou au contraire du regroupement plus compact de celle-ci à sévérité intermédiaire.

Par marquage à la safranine on distingue aisément la surface cellulosique de la surface ligneuse. La cellulose est représentée en couleur verte, la lignine en couleur rouge. La Figure 112 montre une cartographie des préparations microscopiques de 3 échantillons (parmi les 4) sélectionnés pour cette étude (ils feront par ailleurs l'objet de l'étude *in situ* du chapitre suivant), à savoir les échantillons A020C (phase 1, produit par traitement à 100 °C pendant 20 min), C020C (début de phase 2, 140 °C pendant 20 min), et D020C (optimum de phase 2, 160 °C pendant 20 min).

On remarque que la prédominance de la surface ligneuse ou au contraire cellulosique, est fortement dépendante du taux de retrait des hémicelluloses lors du prétraitement. Cet effet est visible sur l'ensemble des tissus lignifiés présents sur ces champs de vue.

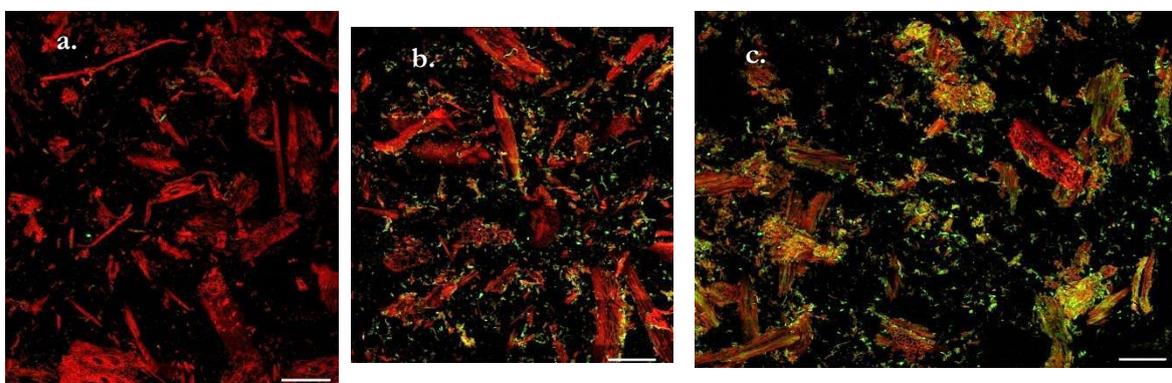


Figure 112 : Images mosaïques en microscopie confocale des échantillons A020C (a), C020C (b), et D020C (c). Le marquage (safranine) se fixe sur le substrat et provoque une fluorescence de la lignine à 640-700 nm (avec une excitation à 640 nm) représentée ici dans le canal rouge, et une fluorescence de la cellulose à 510-550 nm (avec une excitation à 488 nm) représentée ici dans le canal vert. Barre d'échelle : 300 μ m

Comme expliqué dans le chapitre précédent, les surfaces cellulosiques et ligneuses ont été calculées. En Figure 113, la conversion en glucose est tracée en fonction de la proportion relative du signal d'intensité de fluorescence de la cellulose marquée, pour les 4 échantillons. Pour autant que l'on puisse en juger par le faible nombre de points présents, le rendement en glucose à 72 h d'hydrolyse semble suivre une relation affine avec cette proportion calculée. Il est maximal pour l'échantillon D020C, et minimal pour l'échantillon A020C, alors que c'est l'inverse pour ce qui est des teneurs en cellulose. En raisonnant sur les surfaces cellulosiques et ligneuses par seuillage, la même tendance est trouvée. Ceci indique qu'il est tout à fait possible d'avoir un substrat pauvre en lignine mais recouvert en surface de lignine, et inversement d'avoir un substrat riche en lignine mais dont la répartition est telle que la lignine ne recouvre que peu la fraction cellulosique. Le quatrième échantillon (cercle jaune), est l'échantillon C020V20, équivalent de l'échantillon C020C (losange jaune), mais ayant subi une détente explosive de 20 bar. On constate que la valeur de cette proportion de cellulose en termes de fluorescence est légèrement inférieure pour l'échantillon explosé que pour son homologue non explosé, pour autant que la différence ne soit significative (de plus nombreuses analyses auraient été nécessaires).

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

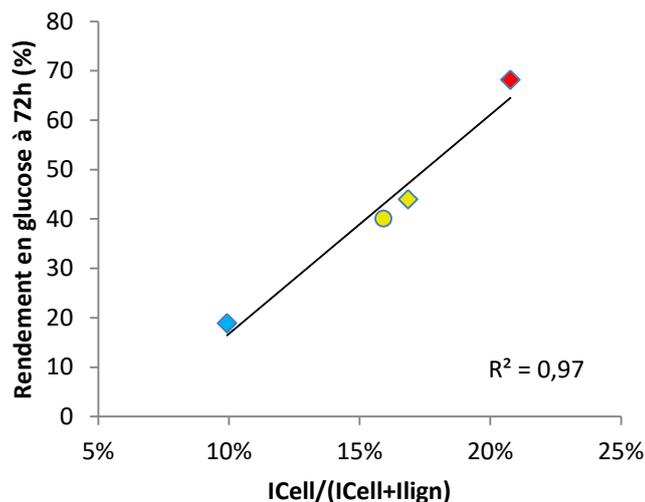


Figure 113 : Graphique représentant l'évolution du rendement en glucose en fonction de la proportion relative d'intensité de fluorescence émise par la cellulose marquée, $I_{cell}/(I_{cell}+I_{lign})$

Ainsi cette surface produite bien visible en MEB (chapitre précédent), et induite par l'hydrolyse des hémicelluloses, constitue une surface utile et bénéfique à la réactivité des substrats. De plus, il semble que la surface cellulosique mesurée par marquage à la safranine soit tout-à-fait représentative de l'accessibilité de la cellulose vis-à-vis des enzymes.

Enfin, le fait que l'échantillon explosé présente une proportion de cellulose accessible inférieure à celle de son échantillon équivalent non explosé, tend à confirmer l'hypothèse avancée selon laquelle le réchauffage effectué avant la détente explosive provoque une redistribution partielle et délétère de la lignine dans les tissus, diminuant de fait l'accessibilité de la cellulose et sa conversion en hydrolyse enzymatique en dépit d'une surface accessible plus importante.

Comme on l'a vu, la formation d'humines à plus forte sévérité résulte en une baisse assez brutale de la conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique. Si sa cartographie n'a pas été réalisée en tant que telle comme pour les surfaces cellulosiques et ligneuses en microscopie confocale, la présence d'humines se remarque par un état de rugosité de surface assez typique dont l'apparition coïncide avec la formation des humines. Ce point se remarque particulièrement en MEB (voir pour cela le chapitre précédent) pour les échantillons produits à trop forte sévérité et sur lesquels on observe cette surface rugueuse caractéristique.

Ainsi la hausse significative de surface BET observée au chapitre précédent pour les échantillons de la phase 3, traduit le changement de structure de la matrice imposé par la formation des humines, d'où l'intérêt par la suite de dissocier l'effet de la surface accessible qui conditionne la quantité de matériel lignocellulosique accessible aux enzymes, de l'effet de la composition chimique qui conditionne la proportion de cellulose qui sera accessible aux enzymes, pour une porosité donnée. En effet, la structure poreuse/rugueuse est probablement propice à la conversion de la cellulose par une meilleure accessibilité de celle-ci. Cependant lorsque la matrice est indigeste chimiquement, cette rugosité/porosité ne compense pas la récalcitrance de la matrice, et est possiblement propice au blocage physique des enzymes par pure rugosité, indépendamment de l'adsorption non productive d'ordre chimique sur les humines ou la lignine.

L'évaluation de l'accessibilité de la cellulose par observation en microscopie confocale de biomasses marquées à la safranine est un bon descripteur de la réactivité des substrats, mais cette propriété est le fruit de l'expression de différents paramètres impliqués, comme la porosité des particules, leur composition chimique, ou encore la distribution de la lignine. **Ce paramètre traduit donc simplement la surface accessible de la cellulose à l'échelle microscopique, sans discriminer précisément les causes des changements de la digestibilité du substrat.**

d. Synthèse : proposition de descripteurs

Des différentes analyses réalisées, on a pu conclure que la conversion de la cellulose en hydrolyse enzymatique est directement limitée par :

- **La teneur en hémicelluloses** dont la présence rend la cellulose physiquement inaccessible aux enzymes.
- **La distribution surfacique de la lignine** lorsque le prétraitement est trop doux, ce qui rend la cellulose inaccessible. La gêne occasionnée par la lignine est en lien avec la présence des hémicelluloses qui lui sont liées. Lorsque l'hydrolyse des hémicelluloses a lieu, la lignine se regroupe pour minimiser son énergie de surface, ce qui rend la cellulose d'autant plus accessible.
- **La teneur en humines**, dont la présence rend la cellulose physiquement inaccessible aux enzymes.
- **La surface accessible** qui permet une plus grande exposition de matière aux enzymes à chaque instant. En revanche, cette surface est aussi le reflet des modifications chimiques qui ont lieu, que ce soit lorsque les hémicelluloses sont hydrolysées ou lorsque les humines sont produites par exemple. A ce titre, l'évaluation de l'implication de la surface accessible seule dans la digestibilité des substrats est délicate à évaluer pour chaque échantillon.
- **L'indice de cristallinité de la cellulose**. Plus précisément, plus il existe des plages de sévérités (douces, ou au contraire très sévères), pour lesquelles la phase cristalline de la cellulose ralentit la cinétique d'hydrolyse enzymatique. Cependant, cela ne change pas la quantité de cellulose qui peut être convertie en attendant suffisamment longtemps (à 72 h notamment, qui est le rendement en glucose le plus souvent observé, notamment dans la littérature). Compte tenu de la plage de valeur rencontrée pour les échantillons de l'étude, ce paramètre un effet délétère significatif seulement en début d'hydrolyse

On commence à distinguer le fait que le rendement en glucose à un temps donné est le résultat d'une contribution temporelle qui exprime en quelque sorte l'efficacité des enzymes à un moment donné. Cette efficacité tient compte de la quantité d'enzymes disponibles, de l'équilibre dynamique qui en résulte d'adsorption-désorption des enzymes au niveau de la cellulose, et d'une contribution fixe qui exprime la quantité totale de cellulose qui peut être convertie en attendant suffisamment (dans l'absolu, un temps infini).

4. Mise en équation

Dans ce chapitre, il sera tenté d'exprimer temporellement le rendement en glucose comme une fonction des descripteurs physicochimiques identifiés précédemment.

a. La méthodologie

Le rendement en glucose est défini au cours du temps grâce à l'Équation (4) par deux paramètres R_m et k qui désignent respectivement le rendement en glucose maximal qui peut être atteint et la constante de vitesse. On a vu que k dépendait de l'indice de cristallinité alors que le rendement maximal variait en fonction de la teneur en hémicelluloses, de la teneur en humines, et de la surface BET :

$$k = f(IC_{cell}) \quad \text{Équation (2)}$$

$$R_m = g(S_{BET}, [Hem], [Hum]) \quad \text{Équation (3)}$$

b. La détermination de l'expression du R_m

On met d'abord en équation le rendement maximal R_m . La surface a un rôle positif sur le rendement maximal de conversion. A l'inverse les hémicelluloses et les humines limitent l'accessibilité de la cellulose. De plus, l'accessibilité de la cellulose rendue possible par le retrait des hémicelluloses (et respectivement, la faible présence d'humines) est conditionnée par la surface accessible. Pour cette raison, on cherche deux fonctions croissantes f et g , telles que f soit fonction du rapport $S_{BET}/[Hem]$, et g fonction du rapport $S_{BET}/[Hum]$. Ces deux fonctions sont telles que R_m est une fonction affine de f aux phases 1 et 2 (sévérités faibles et intermédiaires), et de g en phase 3 (forte sévérité).

Dans un premier temps on cherche une expression du type $K_1 \cdot \ln\left(\frac{S_{BET}^a}{[Hem]^b}\right)$ avec A , a et b des puissances à déterminer, pour lesquelles l'expression évolue de manière affine avec R_m lorsque des hémicelluloses sont présentes (phases 1 et 2 principalement). Les coefficients a et b représentent l'importance relative de l'effet de la surface et du taux d'hémicelluloses. Comme le montre la Figure 114, on a bien la relation suivante :

$$R_m = -2 \cdot \ln\left(\frac{[Hem]^{4,7}}{S_{BET}^{4,3}}\right) + 49 \quad \text{Équation (5)}$$

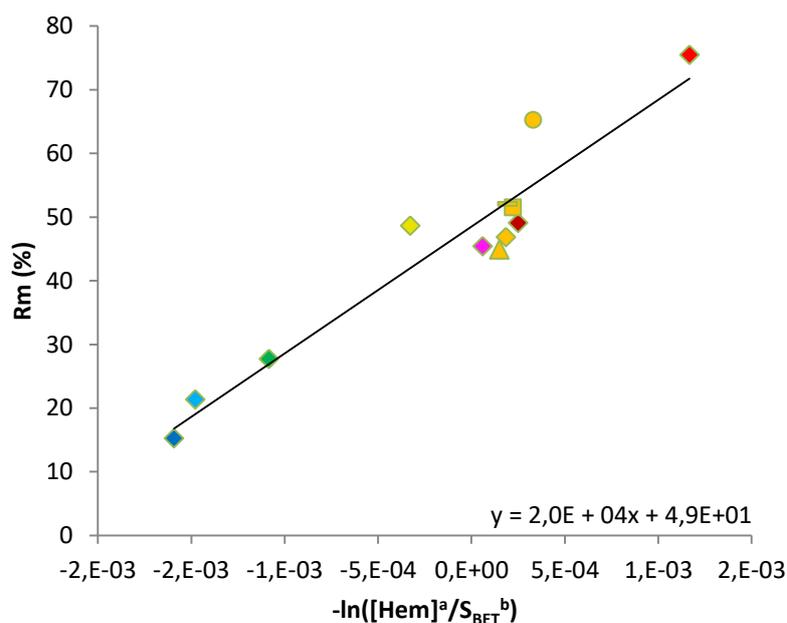


Figure 114 : Graphique représentant la relation affine entre le R_m et le ratio $-\ln([Hem]^a/S_{BET}^b)$

Relions maintenant le rendement maximal R_m en fonction de la teneur en humines déterminée à partir de l'aire de la bande IR à 1700cm^{-1} , en raisonnant de la même manière que pour les hémicelluloses. Ainsi, et comme le montre la Figure 115, on a la relation suivante pour les échantillons présentant des humines (phase 3) :

$$R_m = -4,3 \cdot 10^{-4} \cdot \ln\left(\frac{[Hum]^{14,6}}{S_{BET}^{8,5}}\right) + 31,4 \quad \text{Équation (6)}$$

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

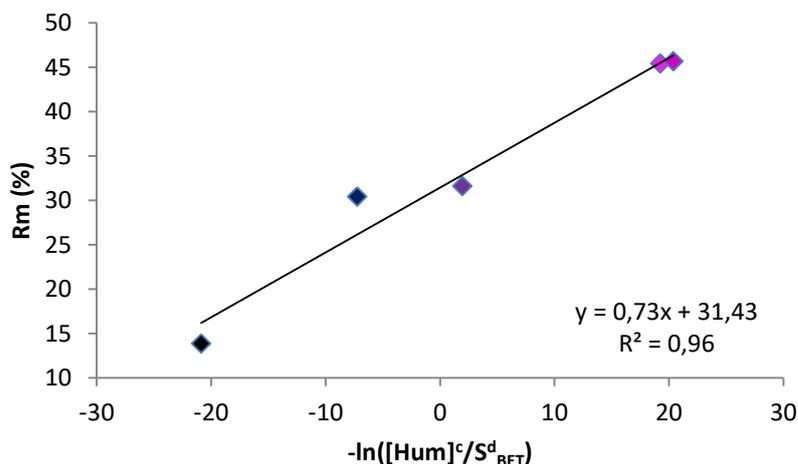


Figure 115 : Evolution du rendement maximal R_m en fonction de l'expression $-\ln([Hum]^c/S^d_{BET})$ pour les échantillons présentant des humines)

Deux domaines quasi disjoints existent pour lesquels les rendements maximaux sont définis par l'Équation (5) et l'Équation (6). Par la similarité des expressions et la présence de la surface BET dans les deux cas au dénominateur, le rendement maximal en glucose peut s'exprimer sous une forme regroupée des deux expressions, moyennant les ajustements idoines des paramètres, qui s'écrirait sous la forme suivante :

$$R_m(\%) = -K_8 \cdot \ln\left(\frac{[Hem]^a + K_b \cdot [Hum]^b}{S^c_{BET}}\right) + K_9 \quad \text{Équation (7)}$$

Après ajustements successifs, on trouve : $K_8=7,5$; $K_9=46,2$; $a=1,14$; $b=1,55$; $K_b=18,3$, et $c=1,20$.

La Figure 116 représente le rendement R_m prédit à partir des descripteurs en fonction du rendement déterminé à partir du modèle cinétique ajusté sur les données expérimentales. Cette figure illustre bien la qualité de la prédiction et la pertinence des descripteurs choisis pour ce lot d'échantillons.

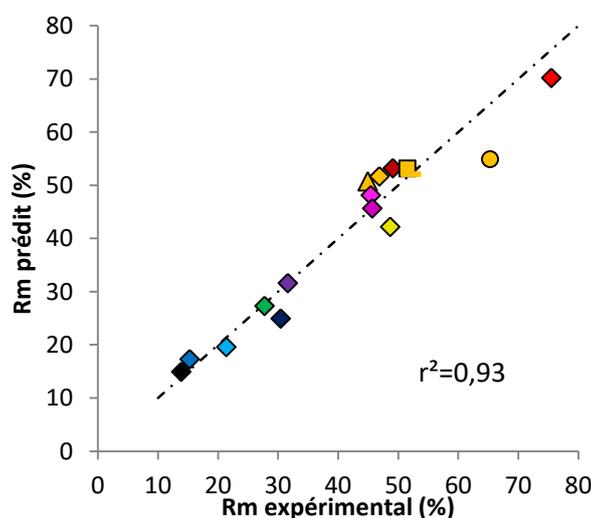


Figure 116 : Rendement maximal prédit à partir des descripteurs en fonction du rendement maximal déterminé à partir des points expérimentaux et du modèle cinétique

Cependant il faut bien noter que cette expression n'est pas majorée, il existe donc des domaines sur lesquels cette équation ne peut pas fonctionner car la prédiction pourrait par exemple être supérieure à 100 %. Pour obtenir un rendement décrit qui soit R_m peut être exprimé sans logarithme et sous la forme :

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

$$R'_m (\%) = 100 \left(1 - \kappa \cdot \left(\frac{[Hem]^\alpha + K_\beta \cdot [Hum]^\beta}{S_{BET}^\gamma} \right)^\delta \right) \quad \text{Équation (8)}$$

Pour arriver à cette expression, la même méthodologie peut être menée en raisonnant sur les hémicelluloses pour les phases 1 et 2, et sur les humines pour la phase 3, mais on peut aussi directement considérer l'écriture de R_m de l'Équation (7) en écrivant le nouvel R'_m tel que $R'_m = 100 \cdot (1 - K_{10} e^{-R_m/\tau})$. Après simplification de l'expression et renommage des coefficients, on retombe bien sur l'Équation (8).

Sous cette forme, le rendement est certes borné, mais les rendements en glucose élevés sont aussi sous-estimés (graphe non montré). En se permettant une majoration trop élevée physiquement (supérieure à 100 %, donc pour des substrats extrêmement digestes tels des aérogels de cellulose ou de la cellulose bactérienne, cela poserait problème), la liberté accordée permet un ajustement plus satisfaisant pour les hauts rendements en glucose (Figure 117).

On a alors :

$$R_m (\%) = K_0 \left(1 - \kappa \cdot \left(\frac{[Hem]^\alpha + K_\beta \cdot [Hum]^\beta}{S_{BET}^\gamma} \right)^\delta \right) \quad \text{Équation (9)}$$

Cette expression sera considérée par la suite pour la prédiction des rendements en glucose au cours du temps. Les paramètres obtenus sont $K_0 = 197$; $\kappa = 0,76$; $\alpha = \gamma = 0,59$; $K_\beta = 4,6$; $\beta = 0,69$; et $\delta = 0,1$ (posé "arbitrairement" entre 0 et 1). La surface BET est exprimée en m^2/g , la teneur en hémicelluloses et en humines est exprimée en pourcentage relatif et massique.

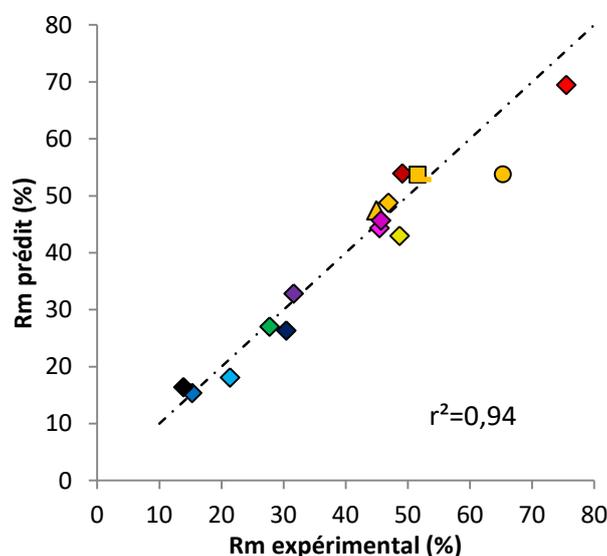


Figure 117 : Rendement maximal prédit à partir des descripteurs en fonction du rendement maximal déterminé à partir des points expérimentaux et du modèle cinétique

Compte tenu des échantillons à disposition, cette équation est valable pour des teneurs en hémicelluloses comprises entre 0 et 30 % pds, des teneurs en humines comprises entre 0 et 25 % pds, et une surface BET comprise entre 1 et 24 m^2/g .

Le fait que la surface BET intervienne dans l'équation depuis l'échantillon de paille native jusqu'à l'échantillon le plus sévèrement prétraité indique que la surface accessible reste un descripteur clef de la réactivité des substrats quelle que soit la chimie de la matrice.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Par la structure de l'équation, on se rend compte que la surface BET joue un rôle important lorsque celle-ci est faible. A l'inverse, plus la surface augmente, moins son importance se fait sentir. Il en est de même pour l'effet des hémicelluloses ou des humines, pour lesquelles la baisse engendrée de rendement est plus conséquente lorsque les concentrations sont faibles. Quant aux coefficients α , β , et γ , ils représentent l'importance relative des hémicelluloses, des humines et de la surface accessible, dans l'accessibilité de la cellulose.

Ceci est plutôt cohérent physiquement si l'on suppose que les hémicelluloses les plus stables peuvent encore limiter l'accessibilité de la cellulose par leur distribution surfacique sur le pourtour des fibrilles de cellulose. Pour ce qui est des humines, leur présence est visiblement délétère pour l'accessibilité de la cellulose dès leur formation. Leur formation est d'origine exogène à la matrice car les précurseurs sont issus des produits de dégradation (solubles) des polysaccharides. On peut donc penser que ces humines recouvrent d'abord la surface de la matrice, avant de s'accumuler de manière conséquente. Dans un tel cas, une faible présence d'humines (de l'ordre du pourcent) semble suffire à masquer la cellulose des enzymes.

c. La détermination de l'expression de la constante de vitesse k

On a vu précédemment que la constante de vitesse k peut être reliée avec la cristallinité de la cellulose, à l'aide d'une fonction continue affine par morceau (voir plus haut la Figure 105). Trois domaines d'indice de cristallinité sont définis, sur lesquels on exprime la constante de vitesse k par :

$$\text{Pour } IC_{cell} \leq \frac{b_1 - k_0}{a_1} \quad \text{Équation 10.1}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} k = a_1 \cdot IC_{cell} + b_1 \\ k = k_0 = 2,1 \cdot 10^{-2} h^{-1} \\ k = a_2 \cdot IC_{cell} + b_2 \end{array} \right. \quad \text{Pour } \frac{b_1 - k_0}{a_1} \leq IC_{cell} \leq \frac{b_2 - k_0}{a_2} \quad \text{Équation 10.2}$$

$$\text{Pour } IC_{cell} \geq \frac{b_2 - k_0}{a_2} \quad \text{Équation 10.3}$$

Avec $a_1 = 7 \cdot 10^{-3} h^{-1}$; $b_1 = 0,21 h^{-1}$; $k_0 = 0,021 h^{-1}$; $a_2 = 5,3 \cdot 10^{-3} h^{-1}$; $b_2 = 0,25 h^{-1}$

La Figure 118 représente les valeurs calculées en fonction des valeurs déterminées à partir des rendements expérimentaux et de l'ajustement des paramètres cinétiques en conséquence.

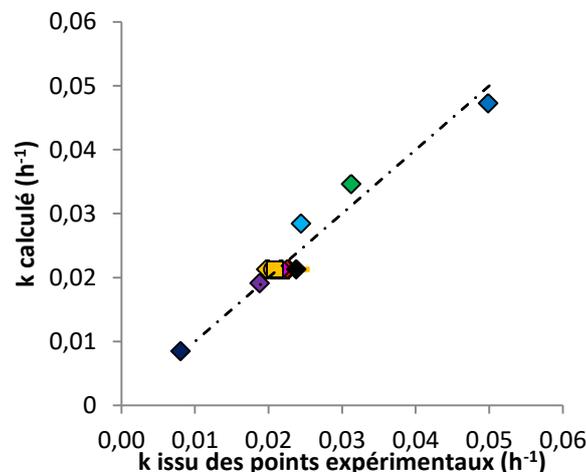


Figure 118 : Calcul des constantes de vitesse à partir de l'indice de cristallinité, en fonction de la constante de vitesse déterminée à partir des rendements en glucose expérimentaux et au cours du temps

d. Le rendement en glucose exprimé au cours du temps à partir des descripteurs

A partir des expressions du R_m et de la constante de vitesse k du paragraphe précédent, le rendement en glucose à un instant t s'exprime donc comme une fonction des propriétés physicochimiques clefs des échantillons (teneur en hémicelluloses, surface BET, teneur en humines, et indice de cristallinité de la cellulose), par l'expression suivante :

$$R(t) = \left(K_0 \cdot \left(1 - K \cdot \left(\frac{[Hem]^\alpha + K_\beta \cdot [Hum]^\beta}{S_{BET}^\gamma} \right)^\delta \right) \right) \times (1 - e^{-k \cdot t})^n \quad \text{Équation (11)}$$

Avec la constante k définie par l'Équation 10 dépendamment du domaine de l'indice de cristallinité de la cellulose.

La Figure 119 montre les cinétiques prédites pour l'ensemble des échantillons produits par traitement à l'acide dilué, avec pour comparaison les points expérimentaux. Globalement, les rendements en glucose sont prédits de manière satisfaisante, à l'exception de l'échantillon C060Cc, qui était déjà singulier (voir la première partie de ce chapitre).

La même démarche pourrait être réalisée pour les échantillons produits par explosion vapeur, en réajustant à façon les paramètres de l'équation, par le fait que la dose d'enzyme n'était pas la même que dans le cas des échantillons produits exclusivement par traitement à l'acide dilué. Cependant la démarche n'a pas été conduite, notamment par le fait que les analyses RMN permettant d'obtenir les indices de cristallinité n'ont pas été réalisées de manière exhaustive pour ces échantillons.

Grâce à un tel modèle non linéaire, il est possible de traduire d'une certaine manière les relations reliant les paramètres clefs entre eux. En d'autres termes, à travers l'expression algébrique choisie, l'effet d'un descripteur sur la conversion de la cellulose sera directement dépendant de la valeur des autres descripteurs, contrairement à ce que donnerait une approche linéaire. De plus, dans notre cas, la situation a été facilitée par le fait que les effets des hémicelluloses et des humines sur les rendements en glucose s'expriment sur des domaines de conditions opératoires quasi disjoints. De ce fait, le seul paramètre non trivial dont l'effet s'exprime sur tous les domaines de conditions opératoires de prétraitement est la surface accessible.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

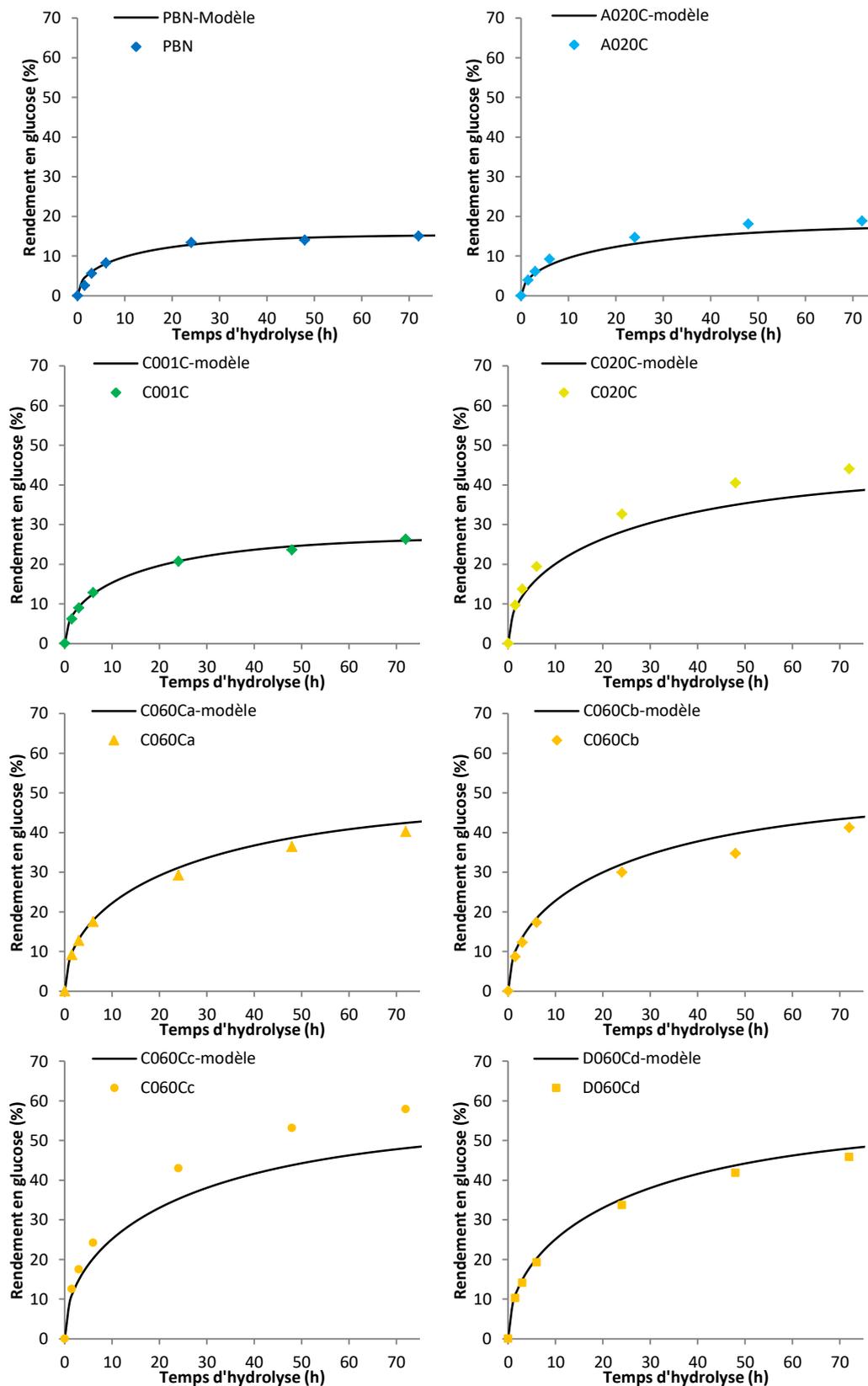


Figure 119 : Rendements en glucose mesurés (points) et prédiction des rendements sur la base du modèle cinétique dont les paramètres R_m et k sont reliés aux descripteurs déterminés

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

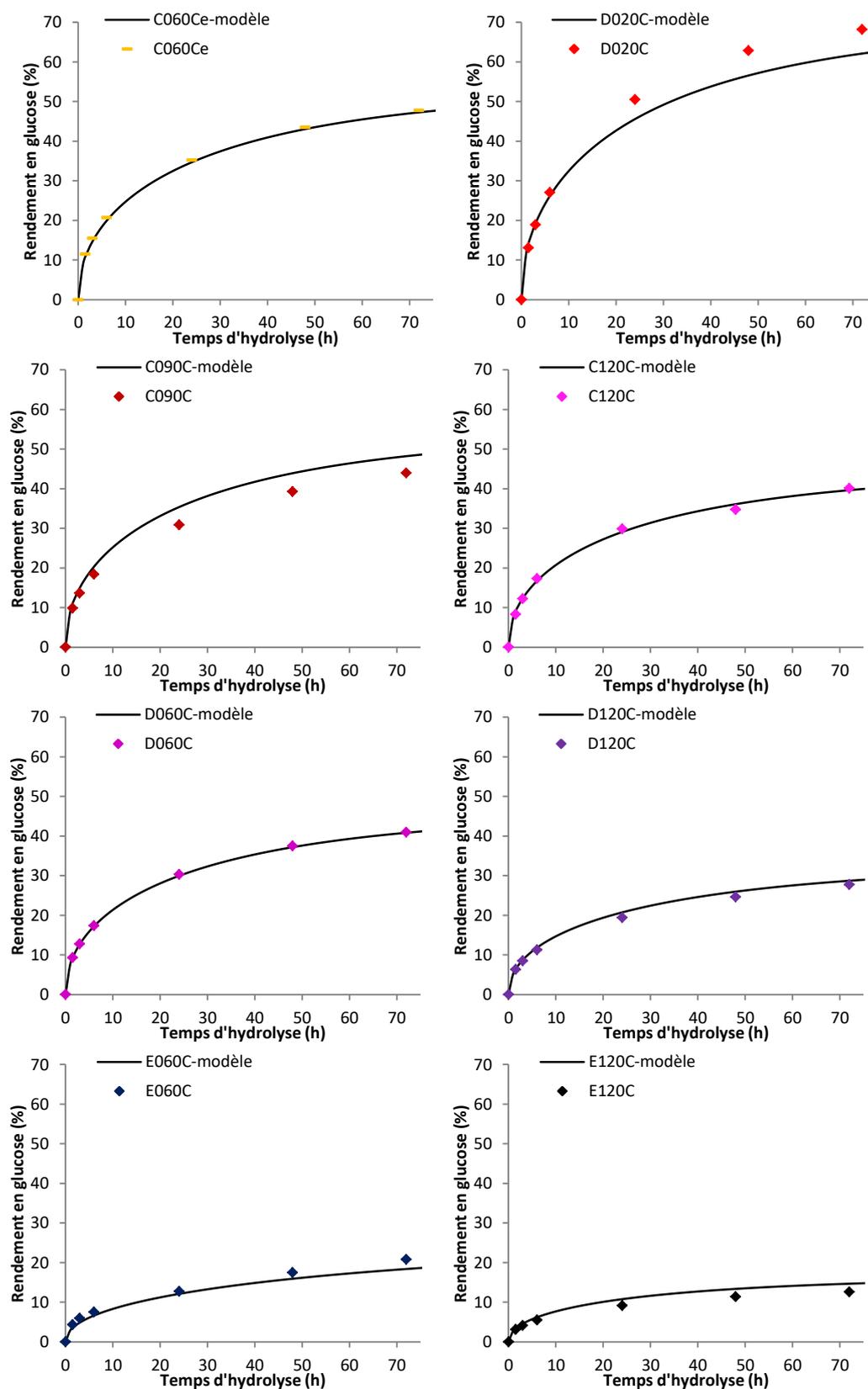


Figure 119 : Rendements en glucose mesurés (points) et prédiction des rendements sur la base du modèle cinétique dont les paramètres R_m et k_e sont reliés aux descripteurs déterminés (continuation)

e. Mise à l'épreuve du modèle de prédiction du Rm

On souhaite étudier la validité du modèle sur d'autres échantillons prétraités à l'acide dilué. Pour cela, on s'intéresse aux échantillons A060C (produit à 100 °C pendant 60 min, sévérité de 1,8), C030C (140 °C/30 °C, sévérité de 2,7), et E010C (180 °C/10 min, sévérité de 3,5) qui ont été utilisés pour l'étude de la modification de la surface accessible à chimie identique sur la réactivité des substrats (voir le paragraphe VI.c.ii). On calcule pour ces trois échantillons sous leur forme séchée en étuve et sous leur forme non séchée, les rendements Rm à partir de l'Équation (9). Le graphique de parité est présenté sur la Figure 120, avec pour comparaison le positionnement des autres points de l'étude, en noir. Les 3 échantillons non séchés sont représentés par des triangles, et les 3 échantillons séchés en étuve sont représentés par des cercles.

La prédiction de ces 6 nouveaux points est satisfaisante, ce qui montre que l'équilibrage des descripteurs est correct, et que les descripteurs choisis suffisent encore à caractériser la digestibilité des substrats. Seul l'échantillon E010C de la phase 3, est prédit avec une erreur significative de 16 % pour la préparation séchée, et de 14 % pour la préparation classique (laissée humide). Vu les différents positionnements de ces différents échantillons, il est possible que l'effet de la surface soit légèrement surestimée en phase 1, correctement pris en compte en phase 2, et probablement sous-estimée en phase 3.

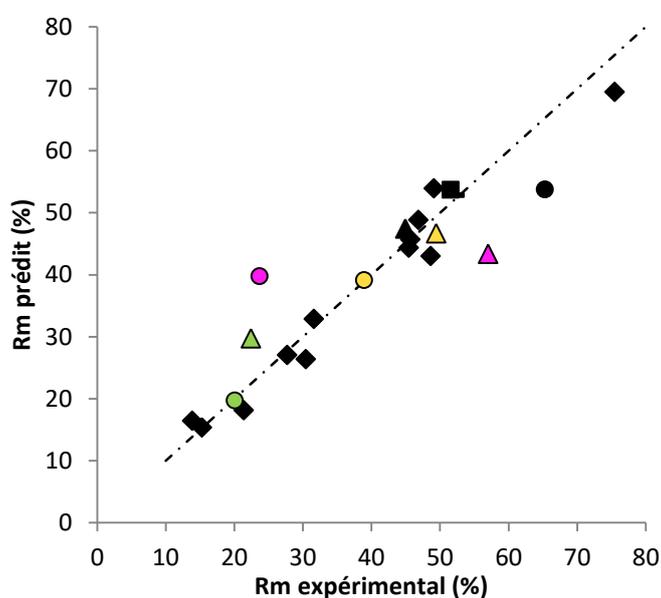


Figure 120 : Rendement Rm prédit en fonction du rendement Rm par ajustement du modèle cinétique empirique aux points expérimentaux, des échantillons A060C (vert clair), C030C (jaune pâle), et E010C (mauve). Les cercles représentent les échantillons séchés en étuve, les triangles représentent les échantillons classiques (non séchés)

f. Discussions sur le modèle

Le modèle empirique et son élaboration sont satisfaisants sur le lot d'échantillons considéré. En effet, sa construction a permis d'affiner la compréhension sur les descripteurs de la réactivité, et notamment sur leurs rôles respectifs "indépendamment" les uns des autres. Ensuite, ce modèle est simple d'utilisation, et la méthodologie est facilement transposable à d'autres procédés, au cas par cas.

En supposant que l'on souhaite garder la forme de ce modèle qui est particulièrement pratique d'utilisation et facile à conceptualiser, une perspective pourrait être de prendre en compte les évolutions des descripteurs au cours de l'hydrolyse enzymatique. En effet, on se sert de ces paramètres de manière figée, comme une "photographie au temps 0", sans considérer qu'ils évoluent au cours de l'hydrolyse enzymatique et donc qu'ils sont susceptibles de rétroagir sur la cinétique de la dégradation (en jouant à la fois sur la constante de vitesse k et de la cellulose accessible à travers la grandeur Rm). En conséquence, la

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

mesure des paramètres clés au cours de l'hydrolyse pourrait permettre à la fois d'affiner la prédiction des rendements en glucose pour les longs temps d'hydrolyse, et d'améliorer la robustesse du modèle. De ce fait, on aurait $k = k(t)$ et $R_m = R_m(t)$. Ces aspects seront étudiés dans le chapitre suivant. Par la perte de linéarité observée entre les rendements de conversion aux faibles avancements par rapport à ceux aux longs temps d'hydrolyse, considérer des paramètres k et R_m constants ne sauraient être satisfaisant pour les longs temps d'hydrolyse (144 h par exemple). La Figure 121 illustre cela en montrant les rendements en glucose à 48 h (a) et à 144 h (b) en fonction des rendements en glucose à 1,5 h. Pour le premier graphe, la relation liant les 2 rendements en glucose présente une faible dispersion, contrairement au graphe de droite.

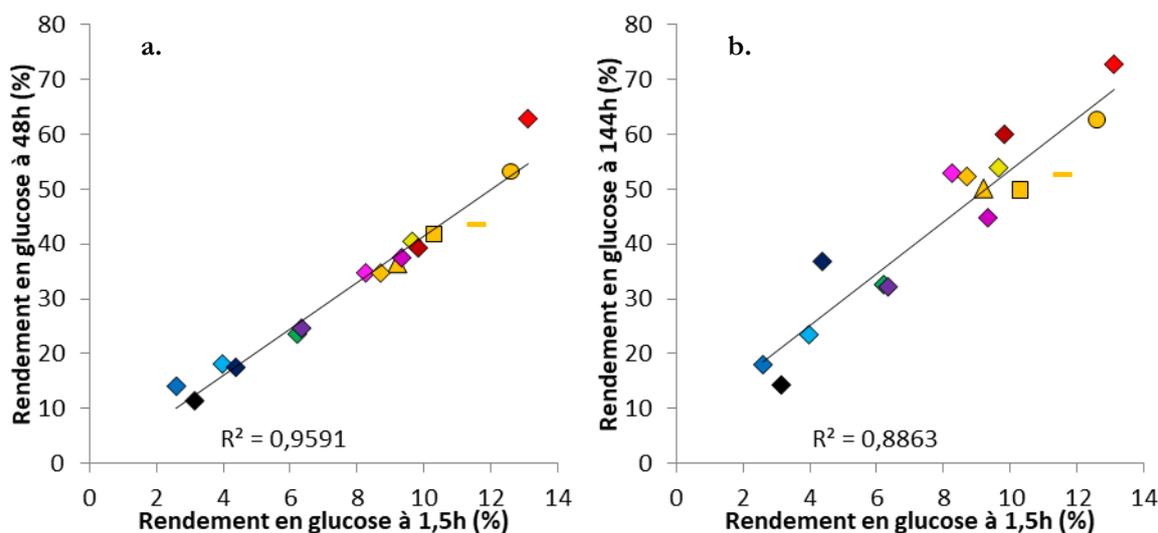


Figure 121 : Rendements en glucose à 48 h (a) et à 144 h (b) en fonction du rendement en glucose à 1,5 h

L'amélioration (en termes de robustesse et d'identification de nouveaux descripteurs) du modèle passera aussi par la considération de nouvelles biomasses voire de nouveaux procédés de prétraitement. Par exemple, il est probable que le paramètre d'ajustement α (et possiblement les autres) soit spécifique du type de biomasse, car la nature des hémicelluloses (et donc son comportement durant le prétraitement) varie grandement d'une essence à une autre.

Enfin, il serait intéressant d'exprimer des coefficients de digestibilité intrinsèque (indépendants de la dose d'enzyme ou des conditions opératoires), à partir des descripteurs physicochimiques au cours de l'hydrolyse enzymatique. Les rendements en glucose expérimentaux seraient alors ensuite calculés compte tenu des conditions opératoires de l'hydrolyse enzymatique, du cocktail enzymatique utilisé, de la concentration en enzymes choisie, etc...

D'autres méthodologies, telles que la régression multilinéaire, PLS, ou encore l'analyse multiblock sur plusieurs jeux de données issus de caractérisations non homogènes pourraient être envisagées, dans un premier temps pour confirmer ce qui a été établi, ou prédire une nouvelle. Cependant, si ces analyses présentent un potentiel certain, elles sont rapidement limitées :

- Ces méthodes qui manipulent des objets linéaires, ne peuvent par définition pas rendre compte correctement de phénomènes non linéaires.
- Dans le cas de régressions (PLS par exemple) réussies, l'interprétation des résultats peut être délicate.
- Les données qui diffèrent par des décalages (de temps, nombre d'onde, longueur d'onde, diamètre, etc), ne se prêtent pas directement à l'analyse chimiométrique.
- Pour les jeux de données qui sont obtenus sur des pas (temporels, spatiaux, etc.) non constants et distincts d'une acquisition à une autre (typiquement, les distributions en taille de pores), le traitement est tout de suite plus complexe (utilisation d'une fonction d'interpolation continue).

g. Synthèse

Les descripteurs de la biomasse lignocellulosique ont été étudiés en première partie de ce chapitre, et leurs effets ont été quantifiés dans une certaine mesure, en deuxième partie de chapitre.

Les principales conclusions retenues sont les suivantes :

- La surface accessible conditionne l'accessibilité de la cellulose aux enzymes dépendamment de la teneur en hémicelluloses et en humines, et réciproquement. Ces trois paramètres interdépendants sont les trois descripteurs pour lesquels les contributions relatives vis-à-vis de l'accessibilité de la cellulose ont été déterminées
- La grandeur k qui représente le taux instantané de conversion de la cellulose rapporté à la quantité totale de cellulose accessible est, au stade de notre compréhension, uniquement liée à la cristallinité de la cellulose. Plus le temps d'hydrolyse est grand, moins ce paramètre s'exprime (au profit de la quantité de cellulose directement accessible). Pour la paille de blé et dans des conditions opératoires crédibles de prétraitement pour une industrialisation (donc dans la phase 2), cette constante k est commune aux différents échantillons.
- La répartition de la lignine dans la matrice est très probablement un paramètre qui manque pour prédire complètement les rendements en glucose pour des substrats produits par des prétraitements de type traitement à l'acide dilué, explosion à la vapeur, ou encore prétraitement hydrothermal. La difficulté de prise en compte de ce descripteur vient du fait qu'il est difficile de lui associer une valeur numérique, et qu'il est largement dépendant de l'hydrolyse des hémicelluloses, du temps de séjour et du refroidissement (dans le cas d'un traitement à l'acide dilué), et du type de détente explosive effectué. Ce paramètre pourrait expliquer pourquoi le modèle établi sur les échantillons produits par traitement à l'acide dilué, est sensible sur la plage de sévérité de 3 à 3,3.
- Les descripteurs considérés sont susceptibles d'évoluer au cours du temps. Pour prédire de manière précise et pour tout temps les rendements en glucose, il serait donc nécessaire de connaître l'évolution temporelle desdits descripteurs, ce qui constitue un défi majeur car leur évolution est conditionnée par la physicochimie (et donc aussi par ces mêmes descripteurs) des substrats. Il y a donc rétroaction des descripteurs sur eux-mêmes, ce qui pourrait se traduire par un système d'équations différentielles non linéaires à plusieurs variables.

En outre, les coefficients du modèle établis seront probablement dépendants de la biomasse considérée

A ce stade de la compréhension, un prétraitement à l'acide dilué optimisé (avec ou sans détente explosive) doit présenter des caractéristiques particulières. En effet, il doit être suffisamment sévère (par la température et/ou le temps de séjour) pour retirer toutes les hémicelluloses, et être suffisamment chaud pour ramollir significativement la lignine qui va alors se délocaliser. Par ailleurs, il doit présenter un temps de séjour suffisamment court pour ne pas créer d'humines ni réaliser une relocalisation dans les tissus de la lignine qui s'était délocalisée sous forme compacte.

Des substrats de pailles prétraitées à l'acide dilué puis soumis à une détente explosive à différentes pressions ont été également caractérisés. Dans les cas où la reprise d'hydrolyse des hémicelluloses (lors du réchauffage avant détente explosive) n'a pas lieu (soit parce que l'échantillon ne présente plus assez d'hémicelluloses instables, soit parce que le réchauffage n'a pas été assez intense : 7 et 14 bar), la détente a un effet néfaste sur la digestibilité des substrats (ou aucun effet, dans le meilleur des cas). Pour autant, la surface accessible a été légèrement augmentée suite à l'explosion. La perte de digestibilité occasionnée par la détente explosive en dépit d'une surface augmentée n'est pas totalement comprise. A l'heure actuelle, on privilégie l'hypothèse d'une évolution de la chimie de surface dépendamment de la température de réchauffage avant détente explosive, qui serait néfaste pour l'accessibilité de la cellulose et compenserait la création de surface occasionnée par la détente explosive. Le protocole de production des échantillons étant lui-même critiquable par la dissociation de l'étape de cuisson en milieu acide et de l'étape d'explosion à la vapeur qui a nécessité un réchauffage de la matière, il est difficile de se prononcer sur ce phénomène dont l'origine vient possiblement d'un biais expérimental.

Liens entre les propriétés physicochimiques de la paille prétraitée et la conversion de la cellulose

Le modèle de prédiction du rendement en glucose établi empiriquement sur la base des échantillons issus d'un prétraitement à l'acide dilué ne peut pas être employé tel quel sur les échantillons prétraités par explosion vapeur car la dose d'enzymes utilisée pour les hydrolyses enzymatiques diffère significativement entre les deux lots d'échantillons.

Ce modèle repose sur des considérations macroscopiques. Cependant il ne donne pas vraiment d'indices concernant les mécanismes précis impliqués lors de la conversion de la cellulose, que ce soit au niveau de l'affinité des enzymes pour chaque tissu, la présence d'adsorption non productive sur la lignine ou les humines, ou encore sur le blocage progressif des enzymes dans la matrice. Voilà pourquoi le suivi des échantillons au cours de l'hydrolyse et notamment par approche microscopique sera très intéressante à développer dans le prochain chapitre.