HAL
open science

Application de traitements thermique et enzymatique de solubilisation et saccharification de la fraction hémicellulosique en vue de la valorisation de la bagasse de canne à sucre

Houda Boussarsar

To cite this version:

Houda Boussarsar. Application de traitements thermique et enzymatique de solubilisation et saccharification de la fraction hémicellulosique en vue de la valorisation de la bagasse de canne à sucre. Ingénierie des aliments. Université de Reims Champagne Ardenne, 2008. Français. NNT : . tel-02823918

HAL Id: tel-02823918

https://hal.inrae.fr/tel-02823918

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
U.F.R. Sciences Exactes et Naturelles
Centre de Recherche en Physico-chimie et Biotechnologie Agroindustrielle «Europol-Agro »
&
UNIVERSITE DE SFAX POUR LE SUD
Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax
Centre de Biotechnologie de Sfax

THESE DE DOCTORAT

(Co-tutelle)

Présentée par

Houda BOUSSARSAR

pour l'obtention des grades de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
&
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE SFAX POUR LE SUD

Spécialités

Chimie Physique Industrielle - Génie biologique

APPLICATION DE TRAITEMENTS THERMIQUE ET ENZYMATIQUE DE SOLUBILISATION ET SACCHARIFICATION DE LA FRACTION HÉMICELLULOSIQUE EN VUE DE LA VALORISATION DE LA BAGASSE DE CANNE À SUCRE

Soutenue le 11 Décembre 2008

Devant le jury :

M. DUCHIRON, F.,	Professeur, URCA, Reims	Président
M. THOMAS, D.,	Professeur, UT, Compiègne	Rapporteur
M. HAMDI, M.,	Professeur, INSAT, Tunis	Rapporteur
M. BELGHITH, H.,	Maître de conférences, ENIS, Sfax	Examinateur
M. GARGOURI, A.,	Professeur, ENIS, Sfax	Co-Directeur de thèse
M. MATHLOUTHI, M.,	Professeur, URCA, Reims	Co-Directeur de thèse
M. DUFLOT, P.,	Docteur Ingénieur, Roquette, Lestrem	Membre invité

A la mémoire de mon très cher père

A ma très chère mère

A mon frère

A mon fiancé

A tous ceux que j'aime…

REMECIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés en co-tutelle entre la Faculté des Sciences Exactes et Naturelles de l'université de Reims Champagne-Ardenne et l'Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax de l'Université de Sfax pour le Sud.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Mohamed MATHLOUTHI, Directeur de Laboratoire de Chimie Physique Industrielle de l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour son encadrement, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de son appui scientifique, de son encouragement constant et pour tout ce qu'il a fait pour que cette thèse voit le jour. Nulles paroles ne peuvent exprimer ma reconnaissance, mon profond respect et ma fidèle gratitude.

Monsieur le Professeur Ali GARGOURI, Directeur de Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes au Centre de Biotechnologie de Sfax a co-dirigé ce travail. Ses encouragements, ses conseils et sa disponibilité m'ont toujours été précieux. Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je suis honorée de la présence au titre de rapporteur de Monsieur Daniel THOMAS, Professeur de l'Université de Compiègne. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus respectueux à Monsieur Mokhtar HAMDI, Professeur à l''Institut National des Sciences Appliquées et de Technologie de Tunis, d'avoir bien voulu me faire l'honneur par sa participation à l'appréciation de ce travail en tant que rapporteur.

Je suis particulièrement sensible à l'intérêt que porte Monsieur Hafedh BELGHITH, Maître de conférences à l'Ecole Nationale des Ingénieurs de Sfax, à ce travail pour avoir accepté de l'examiner. Je suis gré pour son encouragement, ses conseils et sa disponibilité tout le long de la période de mes travaux au laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryote à Sfax.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur Francis DUCHIRON, Professeur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne d'avoir bien voulu présider le jury de soutenance de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également à Madame Barbara ROGE, Maître de conférences au Laboratoire de Chimie Physique Industrielle de l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour son aide constante et pour la façon amicale avec laquelle elle a suivi mon travail.

Je voudrais également remercier Monsieur Philippe DEBEIRE, Directeur de recherche de l'INRA de Reims, pour l'intérêt qu'il a porté au travail, de nous fournir la xylanase purifiée, d'accepter de m'accueillir dans son laboratoire pour faire certaines analyses, de ses conseils et de sa sympathie.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame Caroline REMOND, maître de conférences à l'Université de Reims Champagne Ardenne, pour l'intérêt qu'elle a porté au travail.

Je n'oublie pas de remercier Mlle Nathalie AUBRY, de l'INRA de Reims et Monsieur Mosbeh DARDOURI, du Centre de Biotechnologie de Sfax, pour le temps qu'ils ont consacré à la réalisation de certaines analyses.

Mes remerciements vont au centre d'essai de Recherche et de Formation sur la canne à sucre (CERF) à la Réunion de nous avoir fourni la bagasse de canne à sucre et pour l'intérêt porté à ces travaux.

Il me faut également citer que ce travail a reçu le support matériel de la société Roquette frères. Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Pierrick DUFLOT, directeur de recherche et de développement pour son intérêt porté au travail.

J'exprime toute ma sympathie à mes collègues, membres du laboratoire de Chimie Physique Industrielle pour leur amitié et l'excellente ambiance de travail qu'ils ont fournie.

Une pensée à toute l'équipe du laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes pour leur accueil chaleureux et leur sympathie.

Je finis par remercier toute personne ayant contribué à la réalisation de cette thèse que je n'ai pas citée.

A tous un grand merci...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La canne à sucre 6

I.1.1. Origine et historique 6

I.1.2. Description 8

I.1.3. La campagne sucrière 10

I.1.4. Composition de la canne à sucre 11

I.1.5. Procédés de transformation de la canne à sucre 12

I.1.6. Les sous-produits de la canne à sucre 14

I.1.6.1. La mélasse 14

I.1.6.2. Les boues 14

I.1.6.3. La bagasse de canne à sucre 14

I.2. Composition lignocellulosique de la biomasse de canne à sucre 16

I.2.1. La cellulose 18

I.2.2. Les hémicelluloses 18

I.2.2.1. Les xylanes 19

I.2.3. La lignine 22

I.2.4. Composants mineurs 23

I.2.5. Les liaisons interpolymères chez les graminées 23

I.2.5.1. Les liaisons covalentes 24

I.2.5.1.1. Les liaisons diphénoliques 24

I.2.5.1.2. Les liaisons glycosidiques 24

I.2.5.1.3. Les liaisons ester 24

I.2.5.1.4. Les liaisons éther 24

I.2.5.2. Les liaisons non-covatentes : Les liaisons Hydrogènes 25

I.3. Intérêts technico-économiques des hémicelluloses 25

I.4. Méthodes d'extraction des hémicelluloses 27

I.4.1. Méthodes chimiques 27

I.4.1.1. Hydrolyse acide 27

I.4.1.1.1. Mécanise de l'hydrolyse acide des hémicelluloses 29

I.4.1.2. Hydrolyse alcaline 31

I.4.1.3. Procédé Organosolv 33

I.4.2. Méthodes physico-chimiques 34

I.4.2.1. Traitements hydrothermiques 34

I.4.2.1.1. Mécanisme de réaction de thermohydrolyse 35

I.4.2.1.2. Conditions opérationnelles utilisées dans les traitements hydrothermiques 36

I.4.2.1.3. Composition chimique des matériaux lignocellulosiques les plus favorables pour les traitements hydrothermiques 42

I.4.2.1.4. Procédés industriels basés sur les traitements hydrothermiques 45

I.4.2.2. Prétraitement AFEX (explosion à l'ammoniaque) 48

I.4.2.3. Explosion au CO_2 49

I.4.3. Hydrolyse enzymatique 50

I.4.3.1. Les enzymes de dégradation de la chaîne principale des xylanes 50

I.4.3.1.1. Les endo-β-1,4-xylanases (EC 3.2.1.8) 50

I.4.3.1.2. Les β-xylosidases (EC 3.2.1.37) 53

I.4.3.2. Les enzymes de dégradation de la chaîne latérale 54

I.4.3.2.1. Les α-L-arabinofuranosidases (EC 3.2.2.55) 54

I.4.3.2.2. Les α-D-glucuronosidases (EC 3.2.1.139) 54

I.4.3.2. 3. Les acétyles estérases (EC 3.1.16) 55

I.4.3.3. Mécanisme de l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses 55

I.4.3.4. Dégradation enzymatique des polysaccharides pariétaux 56

I.4.3.5. Facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides pariétaux en phase hétérogène 57

I.4.3.6. Hydrolyse enzymatique des matériaux lignocellulosiques et nécessité de prétraitements 59

I.5. Conclusions et présentation du sujet 61

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Le matériel végétal 66

II.2. Les enzymes 66

II.2.1. L'endoxylanase purifiée de *Thermobacillus xylanilyticus* 66

II.2.2. Le surnageant de culture d'*Humicola insolens* 66

II.2.3. Le surnageant de culture de *Trichoderma Reesei* 66

II.3. Les souches fongiques 66

II.4. Les réacteurs 67

II.4.1. Les réacteurs enzymatiques 67

II.4.1.1. Les petits réacteurs (20 ml) 67

II.4.1.2. Le réacteur d'agitation-mélange instrumenté (2L) 67

II.4.2. Le réacteur du traitement hydrothermique 68

II.5. Méthodes préparatives 70

II.5.1. Traitement hydrothermique 70

II.5.2. Hydrolyse acide 70

II.5.3. Traitement alcalin (Délignification) 70

II.6. Méthodes analytiques 70

II.6.1. Dosage des activités enzymatiques 70

II.6.1.1. Activité xylanase 70

II.6.1.2. Activité β-xylosidase 71

II.6.1.3. Activité α-glucosidase (pNPGase) 71

II.6.1.4. Activité pf (papier filtre) ou cellulases totales 72

II.6.1.5. Activité CMCase 72

II.6.2. Méthodes chimiques de caractérisation du substrat 72

II.6.2.1. Teneur en eau 72

II.6.2.2. Teneur en cendre 72

II.6.2.3. Dosage des lignines : Méthode au bromure d'acétyle 72

II.6.2.4. Dosage des composés phénoliques 73

II.6.2.4.1. Hydrolyse des liaisons ester et éther 73

II.6.2.4.2. Hydrolyse des liaisons ester 73

II.6.2.4.3. Conditions d'analyse en HPLC 74

II.6.3. Méthodes physiques de caractérisation du substrat 74
II.6.3.1. Microscopie photonique 74
II.6.3.2. Détermination de la capacité d'absorption d'eau 74
II.6.3.3. Détermination du volume de gonflement 75
II.6.3.4. Isotherme de sorption de la vapeur d'eau 75
II.6.3.4.1. Isotherme de sorption 75
II.6.3.4.2. Eau de la couche d'hydratation monomoléculaire 76
II.6.4. Méthodes de caractérisation des hydrolysats 77
II.6.4.1. Mesure de la coloration 77
II.6.4.2. Détermination des masses sèches 77
II.6.4.3. Méthodes de dosage et de caractérisation des sucres 77
II.6.4.3.1. Dosage des sucres réducteurs 77
II.6.4.3.2. Dosage des sucres totaux 78
II.6.4.3.3.Chromatographie Liquide Haute Performance d'échange d'ions (Dionex) 78
II.6.4.3.4. Chromatographie sur Couche Mince 79
II.6.4.3.5. Chromatographie d'Exclusion stérique Haute Performance (HP-SEC) 79
II.6.4.3.6. Méthodes enzymatique (Kit) 80
II.5.5. Mesure viscosimétrique 81
II.6.5.1. Appareillage 81
II.6.5.2. Principe 81
II.6.5.3. Protocole 82

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Caractérisation du substrat : La bagasse de canne à sucre 83

III.1.1. Morphologie de la bagasse 83

III.1.2. Composition chimique 83

III.1.3. Absorption d'eau et volume de gonflement 85

III.1.4. Isotherme de sorption 85

III.1.4.1. Isotherme de sorption de la bagasse 85

III.1.4.2. Eau de la couche monomoléculaire d'hydratation 86

III.1.5. Utilisation de la bagasse de canne à sucre comme source de carbone dans les milieux de culture de plusieurs souches fongique 87

III.1.5.1. Etude la cinétique de production d'enzymes par la souche AX4 cultivée en présence de la bagasse de canne à sucre 90

III.1.5.1.1. Culture en milieu liquide 90

a) Effet de la concentration de la bagasse de canne à sucre 90

b) Effet de la granulométrie de la bagasse de canne à sucre 91

III.1.5.1.2. Fermentation en milieu solide (SSF) 92

III.1.5.2. Etude de la cinétique de production d'enzymes par la souche RutC30 cultivée en présence de la bagasse de canne à sucre 93

III.1.5.3. Conclusion 96

III.2. Enzymes utilisées 97

III.2.1. Caractérisation de la xylanase INRA 97

III.2.1.1. Etude de la cinétique de la xylanase INRA sur substrat modèle 97

III.2.1.1.1. Détermination de la concentration optimale d'enzyme 97

III.2.1.1.2. Détermination des constantes cinétiques de la xylanase INRA 98

III.2.1.2. Effet de certains additifs dépresseurs de l'activité de l'eau sur l'activité enzymatique 100

III.2.2. Hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée (INRA) 103

III.2.2.1. Effet de la granulométrie de la bagasse sur la xylanase INRA 103

III.2.2.2. Nature des produits d'hydrolyse 104

III.2.2.3. Effet de la concentration de l'enzyme sur le rendement de l'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre 106

III.2.2.3.1. Analyse des hydrolysats par la méthode au phénol sulfurique 107

III.2.2.3.2. Analyse par HPLC

III.2.2.4. Effet de la délignification sur l'hydrolyse enzymatique 108

III.2.2.5. Degré de pureté en xylose des hydrolysats de bagasse obtenus par la xylanase INRA 110

III.2.3. Hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par le surnageant de culture d'Humicola insolens (xylanase Roquette) 111

III.2.3.1. Effet de la concentration de l'enzyme sur le rendement de l'hydrolyse de la bagasse 111

III.2. 3.1.1. Analyse des sucres totaux par la méthode au phénol sulfurique 112

III.2. 3.1.2. Analyse par HPLC

III.2.3.2. Analyse des sucres autres que le xylose et degré de pureté des hydrolysats de bagasse obtenus par le surnageant de culture d'Humicola insolens 112 114

III.2.3.2.1. Analyse des sucres autres que le xylose 114

III.2.3.2.2. Degré de pureté en xylose des hydrolysats enzymatiques 116

III.2.3.3. Effet de la concentration du substrat 117

III.2.3.4. Effet de la délignification sur l'hydrolyse de la bagasse 118

III.2.4. Hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre en milieu pâteux : Installation pilote 119

III.2.5. Conclusion 122

III. 3. Traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre 122

III.3.1. Détermination du maximum de xylose extractible : hydrolyse acide de la bagasse de canne à sucre 122

III.3.2. Optimisation du traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre 124

III.3.2.1. Evaluation du taux de solubilisation de la fraction hémicellulosique par analyse HPLC (Dionex) 124

III.3.2.2. Détermination du degré de pureté des hydrolysats hydrothermiques 126

III.3.2.2.1. Détermination de la masse sèche des hydrolysats 126

III.3.2.2.2. Analyse des sucres autres que le xylose et degré de pureté des hydrolysats hydrothermiques 127

III.3.2.2.3. Analyse de la coloration des hydrolysats 129

III.3.3. Caractérisation des sucres présents dans les hydrolysats hydrothermiques 131

III.3.3.1. Chromatographie sur couche mince 131

III.3.3.2. Chromatographie d'exclusion de taille haute performance 132

III.3.4. Conclusion 134

III.4. Saccharification enzymatique des hydrolysats hydrothermiques 135

III.4.1. Essais préliminaires 136

III.4.1.1. Hydrolyse enzymatique sur milieu complet 136

III.4.1.2. Hydrolyse enzymatique du résidu solide de la bagasse 138

III.4.1.3. Hydrolyse enzymatique des fractions solubles 139

III.4.2. Optimisation des conditions de l'hydrolyse enzymatique de la fraction solubilisée par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre 141

III.4.2.1. Etude de l'hydrolyse par l'endoxylanase 141

III.4.2.1.1. Effet de la concentration du substrat 141

III.4.2.1.2. Détermination de la concentration optimale de la xylanase 143

III.4.2.1.3. Etude de l'inhibition de la xylanase de Roquette par le xylose 144

III.4.2.1.4. Etude de l'effet du réglage de pH sur la cinétique en fonction du temps de l'hydrolyse enzymatique des fractions solubles 145

III.4.2.2. Hydrolyse par la béta-xylosidase 146

III.4.2.2.1. Effet de la concentration de la β-xylosidase sur le rendement de récupération du xylose 146

CONCLUSION GÉNÉRALE 147

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 153

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure I.1. La canne à sucre 8

Figure I.2. Schéma d'un entre-nœud de canne à sucre 9

Figure I.3. Tiges de canne à sucre coupées 10

Figure I.4. La canne à sucre en fleur 10

Figure I.5. Récolte de la canne à sucre 11

Figure I.6. Canne à sucre coupée et prête à être transformée 12

Figure I.7. Bagasse de canne à sucre 15

Figure I.8. Photo illustrant la forte abondance de la bagasse de canne à sucre 15

Figue I.9. Diagramme simplifié d'un procédé typique de l'industrie sucrière 16

Figure I.10. Représentations schématiques des composants de la paroi cellulaire végétale 17

Figure I.11. Structure chimique partielle de la cellulose 18

Figure I.12. Structure chimique partielle de a) O-acéthyl-4-O-methylglucuronoxylane de bois dur ; b) Arabino-4-O-methylglucuronoxylane de bois tendre ; c) arabinoxylane de son de blé ; d) arabinoxylane d'herbe (Nabarlatz, 2006) 21

Figure I.13. Schéma structural de la lignine 22

Figure I.14. Les types de liaisons lignine-polysaccharide les plus suggérés (Fengel et Wegener, 1989) 25

Figure I.15. Structure du xylose 26

Figure I.16. Mécanisme de l'hydrolyse acide des liaisons glycosidiques (→ Réaction dominante) 29

Figure I.17. Conformation demi-chaise de l'ion tautomérique oxocarbonium (Fengel et Wegner, 1989) 30

Figure I.18. Formation en milieu acide du furfural, hydroxymethlfurfural, l'acide levulinique et l'acide formique à partir des monosaccharides (Nabarlatz, 2006) 31

Figure I.19. Représentation schématique de trois configurations de réacteurs pour traitement hydrothermique en phase aqueuse : co-courant (a), contre-courant (b) et en écoulement continu (c) 47

Figure I.20. Fragment d'hétéroxylane hypothétique et des sites d'attaque possibles par des enzymes xylanolytiques (Ac : groupement acétyl ; Araf : L-arabinofuranose ; MeGlc A : acide 4-O-méthyl-D-glucuronique ; Xyl : D-xylose) (Biely, 1993) 50

Figure I.21. Représentation schématique du mécanisme de l'hydrolyse de xylane par réaction double déplacement (Coughlan et al., 1993) 53

Figure I.22. Représentation schématique du mécanisme de l'hydrolyse de xylane par réaction simple déplacement (Coughlan et al., 1993) 53

Figure I.23. Mécanisme d'action de plusieurs enzymes sur l'arabinoglucuronoxylane, arabinoxylane et glucuronoxylane (Popa., 1998) 56

Figure II.1. Le réacteur pilote d'agitation-mélange 68

Figure II.2. Photos du réacteur batch utilisé pour le traitement hydrothermique 69

Figure II.3. Représentation schématique du réacteur utilisé pour le traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre : ((1) et (1') vannes (2) et (2') Points d'évacuation (3) chambre de détente, (4) manomètre, (5) chambre sous pression, (6) support) 69

Figure II.4. Détermination de l'eau de la couche monomoléculaire à partir de l'exploitation d'une courbe de sorption (Brunauer et al., 1983 ; d'après Mejri, 1998) 77

Figure III.1. Photos de bagasse de canne à sucre : (a) bagasse broyée, (b) bagasse non broyée 83

Figure III.2. Isotherme de sorption de la bagasse de canne à sucre 85

Figure III.3. Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités pNPGase (exprimées en UI/ml) par les souches AX4 et RutC30 88

Figure III.4. Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités xylanase (exprimées en UI/ml) par les souches AX4 et RutC30 88

Figure III.5. Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités CMCase (exprimées en UI/ml) par les souches AX4 et RutC30 88

Figure III.6. Variation du pH des milieux de culture des deux souches AX4 et RutC30 cultivées en présence de plusieurs sources de carbone (bagasse de canne à sucre, son de blé (SB) et xylane de bouleau). 89

Figure III.7. Effet de la concentration de la bagasse de canne à sucre sur la production d'activité xylanase par la souche AX4. 90

Figure III.8. Effet de la concentration de la bagasse de canne à sucre sur la production d'activité β-glucosidase par la souche AX4. 91

Figure III.9. Effet de la granulométrie de la bagasse sur la production des activités xylanase et β-glucosidase par la souche AX4. 92

Figure III.10. Production d'activité xylanase par la souche AX4 cultivée en milieu de fermentation solide en présence de plusieurs sources de carbone (bagasse de canne à sucre, son de blé et son d'orge) 93

Figure III.11. Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités pNPGases (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 94

Figure III.12. Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités xylanases (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 94

Figure III.13. Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités CMCase (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 95

Figure III.14. Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités cellulases totale ou pf (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 95

Figure III.15. vitesse initiale de l'hydrolyse du xylane de bouleau en fonction de la concentration l'endo-xylanase purifiée (INRA) 98

Figure III.16. Evolution de la vitessse intiale de la xylanase purifiée (INRA) en fonction de la concentration de substrat (a) et représentation de Lineweaver-Burk correspondante (b) 99

Figure III.17. Evolution de la vitesse initiale de la xylanase (INRA) purifiée diluée 100 fois sur une période de 10 jours d'incubation à 4°C 100

Figure III.18. Evolution de l'activité relative de la xylanase purifiée en fonction de l'aw et en présence de polyols 101

Figure III.19. Etude de la stabilité de la xylanase en fonction du temps d'incubation à température ambiante et en présence de plusieurs additifs (avec E : enzyme, T : tampon, G : glycérol, S : sorbitol). 103

Figure III 20. Effet de la granulométrie sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre par une endoxylanase purifiée 104

Figure III.21. Chromatographie sur couche mince de l'hydrolysat de la bagasse de canne à sucre obtenu par hydrolyse enzymatique par la xylanase de *Bcillus xylanilyticus* 105

Figure III.22. Chromatographie sur couche mince des hydrolysats de bagasse de canne à sucre, de rafes de maïs et drêches de brasserie obtenus par hydrolyse enzymatique par la xylanase de Bacillus xylanilyticus avec et sans délignification 105

Figure III. 23. Cinétiques d'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée en fonction de temps d'incubation (h) 107

Figure III.24. Cinétiques d'hydrolyse des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée (exprimé en % d'arabinoxylane dégradé par rapport à la quantité d'arabinoxylanes présents dans le substrat) en fonction de temps d'incubation 108

Figure III.25. Effet de la délignification sur le rendement d'hydrolyse, par la xylanase purifiée, des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucré comparé à d'autres substrats lignocellulosique (rafles de maïs et drêches de brasserie) 109

Figure III.26. Evolution de la composition des hydrolysats de bagasse obtenus par hydrolyse enzymatique par la xylanase purifiée (à 86,86 UI/ml pendant 24h), (Analyse réalisée par HPLC). 110

Figure III.27. Degré de pureté (en %) des hydrolysats de bagasse de canne à sucre obtenus par hydrolyse enzymatique (24 heures) par la xylanase INRA à différentes concentrations (en UI/ml de volume réactionnel) 111

Figure III.28. Cinétique d'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase Roquette à différentes concentrations. La concentration en substrat est constante (20g/l) et la concentration en enzyme varie entre 4,12 et 86,86 UI/ml. 112

Figure III.29. Cinétiques d'hydrolyse des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucre par la xylanase Roquette exprimé en % d'arabinoxylane dégradé par rapport à la quantité d'arabinoxylanes présents dans le substrat) en fonction du temps d'incubation. 113

Figure III.30. Evolution de la concentration de glucose dans les hydrolysats de bagasse de canne à sucre en fonction du temps de l'hydrolyse par le jus de culture à différentes concentrations. 114

Figure III.31. Evolution de la concentration de l'arabinose dans les hydrolysats de bagasse de canne à sucre en fonction du temps de l'hydrolyse par le jus de culture à différentes concentrations 115

Figure III.32. Concentration de galactose dans les hydrolysats de bagasse de canne à sucre à différents temps de l'hydrolyse par le jus de culture à différentes concentrations 115

Figure III.33. Degré de pureté (en %) des hydrolysats de bagasse de canne à sucre obtenus par hydrolyse enzymatique (24 heures) par le surnageant de Roquette à différentes concentrations (en UI/ml de volume réactionnel). 116

Figure. III.34. Effet de la concentration du substrat sur l'hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre par la xylanase Roquette : (a) variation du rendement d'hydrolyse ; (b) variation de la concentration de xylanes solubilisés 117

Figure III.35. Effet de la délignification de la bagasse sur son hydrolyse par le jus de culture xylanolytique (86,86 UI/ml) 119

Figure III.36. Suivi du rendement en équivalent xylose et de la contrainte (TAU) en fontion du temps de l'hydrolyse de la bagasse (150 g/L) par la xylanase INRA 120

Figure III.37. Suivi du rendement en équivalent xylose et de la contrainte (TAU) en fontion du temps de l'hydrolyse de la bagasse (150 g/L) par la xylanase Roquette 120

Figure III.38. Suivi du rendement en équivalent xylose et de la contrainte (TAU) en fontion du temps de l'hydrolyse de la bagasse (150 g/L) par la xylanase Roquette 121

Figure III.39. Evolution de la concentration du xylose, glucose et des sucres réducteurs libérés à partir de la bagasse de canne à sucre par traitement hydrothermique acide (H_2SO_4 1% et 150°C) 123

Figure III.40. Variation en fonction du temps de l'arabinose (a) et le galactose (b) libérés par traitement hydrothermique acide 123

Figure III.41. Analyse Dionex et la composition en xylose des hydrolysats obtenus par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre 125

Figure III.42. Variation de la masse sèche et de la concentration en xylose des hydrolysats obtenus en fonction du temps de traitement hydrothermique et à différentes températures : 150°C (a), 170°C (b) et 190°C (c) 126

Figure III.43. Variation en fonction du temps de l'arabinose (a), glucose (b) et le galactose (c) libérés par traitement hydrothermique 128

Figure III.44. Degré de puretés des hydrolysats hydrothermiques de la bagasse de canne à sucre obtenus à différentes températures (150, 170 et 190°C) et différents intervalles de temps 129

Figure III.45. Variation en fontion du temps, de la coloration des hydrolysats obtenus par traitements hydrothermique et acide 130

Figure III.46. Variation du pH des hydrolysats hydrothermiques et acide en fonction du temps de traitement 130

Figure III.47. Chromatographie sur couche mince de l'hydrolysat hydrothermique de la bagasse de canne à sucre obtenu à 170°C/2h 132

Figure III.48. *Profils d'élution des hydrolysats hydrothermiques (4 répétitions) obtenus par Chromatographie D4Exclusion Stérique Haute Performence (HP-SEC)* 133

Figure III.49. Effet de la concentration de la fraction solide sur le taux de l'hydrolyse enzymatique des milieux complets correspondant à différents temps de traitements hydrothermiques 136

Figure III.50. Hydrolyse enzymatique (par la xylanase de Roquette 40 UI/ml) en milieu complet et en milieu soluble obtenu par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre (170°C pendant 2h) 138

Figure III.51. Hydrolyse enzymatique par l'endoxylanase de Roquette (40 UI/ml pendant 24 heures) des résidus solides de la bagasse prétraitée (20 g/L) obtenus à différents temps de traitement hydrothermique 139

Figure III.52. Efficacité d'un traitement hydrothermique seul, d'une hydrolyse enzymatique et de l'association traitement thermique et enzymatique de la bagasse de canne à sucre (exprimée en concentration des sucres réducteurs libérés) 140

Figure III.53. Rendement (en %) de l'hydrolyse enzymatique des hydrolysats hydrothermiques de la bagasse en fonction de la concentration du xylane et dérivés (exprimés en équivalent xylose g/L) 141

Figure III.54. Effet de la concentration (en Rotavapor) et/ou de l'hydrolyse enzymatique des hydrolysats hydrothermiques de la bagasse sur le rendement de libération de xylose 142

Figure III.55. Libération des sucres réducteurs à partir des hydrolysats hydrothermiques de bagasse de canne à sucre en fonction de la concentration de l'endoxylanase 143

Figure III.56. Effet de la concentration du xylose en milieu réactionnel sur le rendement d'hydrolyse enzymatique du xylane de bouleau par la xylanase de Roquette 144

Figure III.57. Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de l'hydrolysat hydrothermique de la bagasse de canne à sucre par la xylanase de Roquette avec et sans réglage de pH 145

Figure III.58. Effet de la concentration de la β-xylosidase sur la libération du xylose. 146

Tableau I.1. Les principaux pays producteurs de sucre de canne (en milliers de tonnes de sucre brut) 8

Tableau I.2. Composition moyenne de la canne à sucre 12

Tableau I.3. Conditions opérationnelles utilisées dans des traitements hydrothermiques des matériaux lignocellulosiques 37

Tableau I.4. Quelques données sur les conditions de chauffage utilisées dans les traitements hydrothermiques 38

Tableau I.5. Composition des liqueurs obtenues par hydrolyse hydrothermique des drêches de brasserie à 150, 170 et 190°C (Carvalheiro et al., 2004) 40

Tableau I.6. Composition en cellulose, hémicellulose et lignine (en % de la masse sèche de biomasse) des différents matériaux lignocellulosiques 43

Tableau I.7. Composition en sucres monomères de différents matériaux lignocellulosiques (en % de la masse sèche de l'échantillon) 44

Tableau I.8. Taux de récupération des xylooligosaccharides à partir de différents substrats lignocellulosiques obtenus dans les mêmes conditions opératoires (Nabarlatz et al., 2007) 44

Tableau II.1. Gradient utilisé pour le dosage des acides hydroxycinnamiques en HPLC 74

Tableau II.2. Humidité relative des solutions salines utilisées pour contrôler l'atmosphère lors de la sorption de la vapeur d'eau sur la bagasse de canne à sucre 76

Tableau III.1. Composition chimique de la bagasse de canne à sucre 84

Tableau III.2. Composition en sucres monomères de la bagasse de canne à sucre déterminé par HPLC 84

Tableau III.3. Composition en acides phénoliques de la bagasse de canne à sucre déterminé par HPLC 84

Tableau III.4. Paramètres cinétiques de la xylanase purifiée (INRA) sur le xlane de bouleau à 60°C 99

Tableau III.5. Concentrations du glycérol et du sorbitol utilisées et les activités d'eau correspondantes (Ninni et al., 2000) 101

Tableau III.6. Viscosités correspondantes aux différentes concentrations des polyols utilisés 102

Tableau III.7. Rendements d'extraction (exprimés en g/g bagasse et en % Masse sèche initiale) obtenue par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre à différentes températures de traitement 125

Tableau III.8. Caractéristiques macromoléculaires des hydrolysats hydrothermiques (4 répétitions) déterminées par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance 134

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'exploitation des co-produits et sous-produits agricoles en vue d'une valorisation a bénéficié au cours de ces dernières années d'un regain d'intérêt pour des raisons économiques aussi bien qu'environnementales (Orlando *et al.*, 2002a ; Pandey *et al.*, 2000a). L'importance de ces co-produits agricoles réside dans leur abondance, leur faible coût ainsi que dans le fait qu'ils représentent une source organique naturelle disponible partout sur la planète. Cependant, aujourd'hui, l'industrie mondiale utilise moins de 10% de la biomasse végétale produite (Liu *et al.*, 2008) et des quantités énormes des résidus d'agriculture sont brulés chaque année, ce qui cause un problème environnemental sérieux (Sun *et al.*, 2002).

Actuellement, plusieurs pays ont imposé de nouvelles réglementations pour limiter la combustion de ces co-produits en réponse aux restrictions concernant l'émission de gaz à effet de serre à l'origine du réchauffement climatique. Ceci a permis de stimuler l'intérêt pour l'utilisation des co-produits agricoles en tant que ressource naturelle renouvelable (Orlando *et al.*, 2002b). En effet, des co-produits de l'agriculture ont été utilisés comme une source renouvelable d'énergie et pour la production de nombreux composés chimiques, incluant le bioéthanol, le charbon actif. Les résidus agro-industriels ont été aussi utilisés dans les procédés de fabrication de pâte à papier et la production de bio-produits permettant d'une part, de fournir des substrats alternatifs et d'autre part de résoudre le problème de pollution engendré par la non utilisation effective de ces résidus.

Parmi les co-produits agricoles les plus abondants et qui peuvent être intéressants en vue d'une valorisation, il y a la bagasse de canne à sucre, résidu fibreux des tiges de canne à sucre obtenu après extraction du jus dans l'industrie sucrière (ou de la production d'alcool). La bagasse est fortement générée par les industries sucrières plus ou moins partout dans le monde avec une production globale annuelle de 234 millions de tonnes (Liu *et al.*, 2008). Sa grande disponibilité, son faible coût et sa biodégradabilité, font de la bagasse une bonne candidate pour une valorisation et une meilleure exploitation ce qui lui a permis de regagner un grand intérêt pendant cette dernière décade (Orlando *et al.*, 2002b ; Pandey *et al.*, 2000b). L'une des caractéristiques attractives de la bagasse de canne à sucre étant sa composition chimique particulièrement riche en hémicellulose et qui est similaire à celle des bois durs (Liu *et al.*, 2007). En effet, les composants majeurs de la bagasse sont les composants macromoléculaires de la paroi cellulaire : cellulose, hémicellulose et lignine, ainsi que l'ensemble des composés extractibles à faible poids moléculaire. Des essais de valorisation de la bagasse de canne à sucre ont été réalisés mais encore en nombre limité. La bagasse est traditionnellement utilisée comme combustible pour la production

d'électricité en sucrerie ou comme fourrage ou encore comme engrais. Plusieurs nouvelles applications ont été développées pour la bagasse comme par exemple la fabrication de papier, cartons et panneau agglomérés, et l'utilisation comme source d'énergie pour des centrales charbon-bagasse. Elle a été aussi utilisée pour la production de certains composés chimiques tel que le furfural (Rewell et Keany, 1991). Cependant, son utilisation actuelle ne concerne qu'une faible partie de toute la bagasse produite. Des milliers de tonnes de bagasse sont abandonnés tous les jours par les sucreries de canne ce qui pose un grand problème environnemental (Khosravi-Darani et Zoghi, 2008). D'où l'urgence de trouver des applications convenables de ce résidu. Une alternative de l'utilisation économique de la bagasse étant son utilisation comme substrat de fermentation en vue de la production d'enzymes actives sur la bagasse permettant sa dégradation et la production de produits à haute valeur ajoutée tel que le xylose.

La bioraffinerie constitue une alternative prometteuse pour l'utilisation de la bagasse de canne à sucre. L'approche consiste en un fractionnement de la plante entière en ses constituants par des traitements successifs. A part l'extraction de sucre, le co-produit (bagasse) subit des traitements visant à extraire des produits à haute valeur-ajoutée et à maximiser le profit. Le développement de la bioraffinerie dans une usine de production de sucre constitue un concept particulièrement intéressent dont les enjeux économiques et environnementaux se situent directement au cœur de l'actualité afin de mieux répondre aux enjeux du renouvellement des politiques énergétique et de réduction des gaz à effet de serre.

Le fractionnement des hémicelluloses, constituant de la bagasse, selon le concept de la bioraffinerie a retenu de plus en plus l'attention des chercheurs et des industriels notamment dans la production de bioéthanol dans le but d'une amélioration des rendements et en minimisant les coûts.

De nombreuses technologies ont été proposées pour l'extraction ou le fractionnement des hémicelluloses à partir de substrats végétaux. Certaines de ces technologies ont été appliquées à l'échelle industrielle notamment dans l'industrie papetière.

Les premiers procédés de conversion ou d'hydrolyse utilisés étaient surtout chimiques. Ces procédés sont devenus, à l'heure actuelle, peu compétitifs en raison notamment des coûts des réactifs et de la génération de nombreux sous-produits et de composés non désirables. De tels composés peuvent nécessiter une étape importante de purification ou agir en tant qu'inhibiteurs rendant les hydrolysats peu fermentescibles, dans les procédés de production d'alcool à partir de substrats lignocellulosiques.

Ces procédés chimiques sont désormais concurrencés par les procédés enzymatiques, plus spécifiques et qui permettent une hydrolyse dans des conditions moins sévères. Cependant, vue sa structure complexe, la biomasse lignocellulosique n'est pas directement accessible aux enzymes. Elle nécessite une phase préalable de prétraitement afin d'améliorer la susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique aussi bien de la cellulose que de l'hémicellulose. Ce prétraitement peut être mécanique, thermique ou chimique, ou bien la combinaison de deux ou trois de ces types d'action.

Plus récemment, des études d'hydrolyse des matériaux lignocellulosiques par des traitements hydrothermiques ont montré l'efficacité de cette technologie à donner de bons rendements de récupération des hémicelluloses. Ces traitements sont prometteurs pour l'établissement de procédés adéquats de fractionnement des matériaux lignocellulosiques en concordance avec le concept de bioraffinerie.

Dans ce cadre, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont porté sur la valorisation de la bagasse de canne à sucre par extraction de sa fraction hémicellulosique par un traitement enzymatique ou hydrothermique et de sa saccharification par voie enzymatique pour l'obtention du xylose sous forme monomérique avec des rendements rentables à une échelle industrielle.

Ce travail se situe dans le cadre d'un projet supporté par la société Roquette Frères et vise donc à la mise en place d'un protocole d'extraction de l'hémicellulose de la bagasse et qui pourrait par la suite être utilisé dans la mise en place de l'unité de production de xylose en aval de la chaîne de production de sucre de l'industrie sucrière. L'introduction de la bioraffinerie dans l'usine de production ne peut être que bénéfique aussi bien sur le plan économique qu'environnemental. En effet, en plus de la production de produit de haute valeur ajoutée à partir d'une biomasse disponible à moindre coût, l'insertion d'une telle unité de valorisation dans la chaîne de production « *onsite* » permet de réaliser des économies tout en préservant la valeur énergétique de la bagasse pour la génération onsite de l'énergie thermique, mécanique et électrique nécessaire pour le fonctionnement de la sucrerie.

Pour réaliser cette étude les objectifs suivants ont été fixés :

- Mise en place d'un système de traitement hydrothermique applicable à la bagasse de canne à sucre à l'échelle du laboratoire, du pilote puis de l'installation industrielle. Pour cela, un procédé de traitement hydrothermique dans des conditions les plus douces

possibles, pourrait améliorer la faisabilité de la technique à grande échelle en réduisant le coût et l'énergie nécessaires pour son application.

- Optimisation des conditions opératoires du traitement hydrothermique notamment le barème du traitement (temps/température) ainsi que l'optimisation du ratio solide/liquide et la détermination de l'effet direct de ces paramètres sur la rentabilité et l'efficacité du traitement.
- Optimisation et mise en valeur de l'apport d'une éventuelle hydrolyse enzymatique sur les différentes fractions issues du traitement hydrothermique.
- Optimisation de l'hydrolyse enzymatique des fractions solubles par des endoxylanases et de la β-xylosidase en vue de la saccharification quasi totale des dérivés hémicellulosiques libérés en xylose monomérique.
- Essais d'hydrolyse enzymatique *in situ* des arabinoxylanes présents dans la bagasse de canne à sucre (non traitée) par des xylanases purifiées et non purifiées.
- Réalisation de l'hydrolyse en réacteur (2L) permettant de contrôler les paramètres rhéologiques et d'obtenir des volumes d'hydrolysats riches en sucres plus importants.
- Essais de modulation de l'activité enzymatique d'une xylanase purifiée dans des systèmes modèles à différentes activités d'eau afin de comprendre le comportement de l'enzyme placée dans un microenvironnement à activité d'eau réduite.
- Etude de la possibilité de l'utilisation de la bagasse en milieu de culture comme inducteur de voie métabolique pour la production d'enzymes à activités hydrolytiques spécifiques des hémicelluloses.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. La canne à sucre

I.1.1. Origine et historique

La canne à sucre est connue en Chine, en Inde et en Egypte depuis des millénaires. Les théories les plus récentes font remonter sa découverte à 9000 ans et son origine à la Papouasie-Nouvelle-Guinée. Deux millénaires plus tard environ, la canne à sucre fut introduite en Nouvelle-Calédonie, aux Nouvelles-Hébrides et aux Îles Fidji (aux alentours de 8000 ans av. J.-C.), puis la fabrication du sucre voit le jour à Célèbes, à Bornéo, à Java, en Indochine et en Inde en 6000 ans av. J.-C. De l'Inde, la canne à sucre fut acheminée en Chine (200 ans av. J.-C.) où les caractéristiques étaient idéales pour sa culture.

Par Néarque, amiral d'Alexandre le Grand, les peuples d'Occident apprirent l'existence de la canne à sucre 325 ans av. J-C. Néarque, qui par la vallée de l'Indus alla explorer la mer des Indes, parle dans son cahier de voyages d'une sorte de miel produit à partir de la canne à sucre, sans le concours des abeilles. C'est vers le 3ème siècle av. J-C. que des marchands indiens et perses commencent à importer du sucre sur les rivages de la Méditerranée orientale, en Arabie Saoudite et en Egypte.

Le brassage des populations dû aux guerres et aux échanges commerciaux participa largement à l'expansion de la canne à sucre. La canne à sucre ne poussant que dans les régions asiatiques à climat chaud ne fut importée que vers l'année 641 de notre ère dans la région du Delta du Nil. Entre le IVème et le VIIIème siècle, les hauts lieux de culture furent le Delta de l'Indus et le Golfe persique. C'est ici qu'était produit le sucre pour tout le Moyen-Orient. Les Perses, qui avaient été longtemps maîtres en l'art du sucre, disposaient, au Vème siècle de procédés de fabrication déjà avancés. Ils savaient raffiner le sucre brut par refonte, clarifier les sirops et présenter le sucre solide en pains. Deux siècles plus tard, ils subirent l'invasion des Arabes qui propagèrent la culture de la canne dans leurs territoires conquis du bassin méditerranéen. Les Arabes apprirent des Perses l'art de fabriquer du sucre solide.

C'est durant les Croisades que le sucre s'est répandu en Europe. A partir du XIème siècle, les croisés apportèrent la canne à sucre en Sicile, dans le sud de l'Italie et même dans le midi de la France. L'industrie du sucre de canne devient donc importante dans le sud de l'Espagne où, vers 1150 de notre ère, près de 30 000 hectares étaient consacrés à la culture de la canne à sucre.

Vers 1420, la canne est introduite dans l'île de Madère, et 40 ans plus tard aux îles Canaries et aux Açores. Lisbonne prit alors le pas sur Venise en matière de raffinage. En 1508, le port d'Anvers recevait la première cargaison de sucre en provenance des Canaries.

Ce n'est qu'après la découverte de l'Amérique, que la culture de la canne à sucre fut introduite dans de nouvelles régions possédant le climat favorable à sa production. Des plantes provenant de l'Espagne furent cultivées pour la première fois en République Dominicaine et à Haïti par Christophe Colomb en 1493, mais la plantation fut détruite. Une seconde tentative en 1509 permit une première récolte et une expansion de cette culture. Grâce aux navigateurs espagnols, la culture de la canne se répand dans les îles tropicales : Porto Rico, Cuba et la Jamaïque.

En 1520, la canne se cultivait au Mexique, et le premier moulin de sucre en Amérique du Nord vit le jour en 1535. La culture de la canne à sucre s'est vite répandue au Pérou, au Brésil, en Colombie et au Venezuela. En 1548, Porto Rico eut son premier moulin. En 1590, plus de cent moulins à sucre s'érigèrent au Brésil.

En 1670, les Jésuites introduirent la culture de canne à sucre en Argentine et l'apportèrent en Louisiane, en Floride et au Texas.

De l'autre côté de la planète, la production de sucre commença en 1747 à l'île Maurice, dans l'Océan Indien, et en 1824, la culture de la canne fut introduite en Australie (ACER, 2005).

Au Canada, il n'existe que deux compagnies qui contrôlent l'ensemble de la production : la B.C. Sugar et la Redpath Sugar. Sucres Lantic de Montréal appartient à la B.C. Sugar, bien qu'elle soit gérée comme une entreprise indépendante. Quatre raffineries produisent du sucre de canne à saint-Jean (Nouveau-Brunswick), à Montréal, à Toronto et à Vancouver. Plus de 90% du sucre raffiné au Canada provient du sucre de canne brut importé de régions tropicales. Entre 70 et 80% de la production des raffineries de sucre sont destinés aux fabricants et le reste est distribué au commerce de détail.

De nos jours, plus de cent pays cultivent la canne à sucre sur 130 000 km^2. Les vingt premiers ont récolté 1 199 millions de tonnes en 2004, soit 91% de la production totale mondiale (1 317 millions de tonnes). Les plus gros pays producteurs (tableau I.1) sont le Brésil, l'Inde et la Chine, contribuant respectivement à 31, 19 et 7% de la production totale mondiale. A l'heure actuelle, la canne à sucre fournit environ 74% de la production mondiale de sucre.

Tableau I.1. *Les principaux pays producteurs de sucre de canne (en milliers de tonnes de sucre brut)*

Brésil	Inde	Chine	Mexique	Australie	Thaïlande	Pakistan	Etats-Unis	Colombie	Afrique du Sud
28266	13700	9216	6183	5530	5425	3176	3018	2621	2235

I.1.2. Description

La canne à sucre (*Saccharum officinarum L.*) est une plante vivace de la famille des *Poacées* ou Graminées au même titre que le blé, le riz et le maïs. Contrairement à ces derniers la canne à sucre n'est pas cultivée pour ses graines mais bien pour ses tiges qui renferment un jus sucré. Il s'agit d'une plante saccharifère qui produit du saccharose.

Toutes les espèces du genre *Saccharum* sont des graminées vivaces de grande longévité dont l'aspect rappelle celui du roseau (figure I.1). Elle peut parfois atteindre cinq mètres et est essentiellement exploitée dans les zones tropicales et subtropicales.

Figure I.1. *La canne à sucre*

Il existe plusieurs variétés qui possèdent des caractéristiques diverses (telles que la robustesse, la teneur en sucre plus ou moins élevée, etc.) adaptées aux différentes régions de culture. La plante n'est qu'une herbe géante qui se compose de plusieurs parties. La tige est certainement l'un des éléments qui la caractérise le mieux. Elle est souvent comparée à celle du

roseau et constitue le réservoir à sucre de la plante avec une proportion de 10 à 18% de saccharose dont une proportion allant jusqu'à 96% peut être extraite lors du processus industriel. La tige de la canne à sucre (ou plutôt les tiges, car elles peuvent être jusqu'à 40 sur le même pied) est épaisse, longue (2 à 5 mètres de haut) et d'un diamètre pouvant aller de 2 à 6 cm. Elle présente un aspect assez lisse entrecoupé de nœuds où sont implantés des bourgeons, et d'entre nœuds gorgés d'eau sucrée (figure I.2). Les entre nœuds sont généralement long de 10 à 15 cm, mais si les conditions de croissance sont bonnes ils peuvent atteindre les 30 cm.

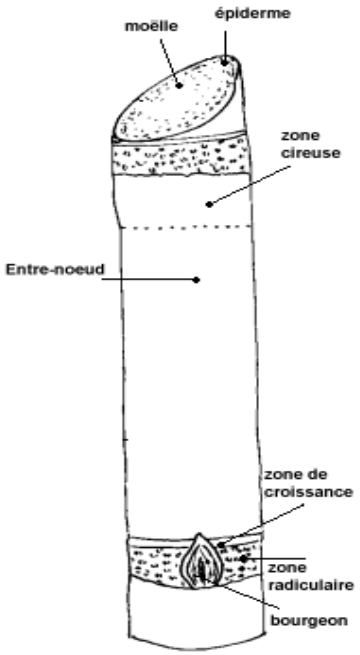


Figure I.2. *Schéma d'un entre-nœud de canne à sucre*

Selon les variétés et l'exposition au soleil, la couleur de la tige peut aller du vert-jaune au violet en passant quelquefois par le blanc (figure I.3). A la hauteur de chacun des nœuds partent des feuilles alternées et allongées pouvant atteindre un mètre cinquante.

Figure I.3. *Tiges de canne à sucre coupées*

En période de floraison, lorsque la canne arrive à maturité, la tige se termine par une panicule surmontée d'une inflorescence qui portera les graines (figure I.4).

L'apparition de la floraison marque la fin de la croissance de la plante et le début d'une augmentation sensible de formation de saccharose qui se déclenche sous l'action de la sècheresse et de la fraîcheur nocturne. Pendant la période qui précède la récolte, la plante fabrique peu à peu son sucre (saccharose) selon le mécanisme de la photosynthèse. Le saccharose s'accumule dans la tige comme réserve énergétique, mais sa répartition n'est pas égale et le sommet de la plante est moins riche en sucre.

Figure I.4. *La canne à sucre en fleur*

I.1.3. La campagne sucrière

La récolte de la canne à sucre (figure I.5) intervient après onze à dix-huit mois de culture, avant la floraison. Elle débute avec le début de la saison et se poursuit après les premières pluies.

Afin de déterminer la période la plus favorable pour la coupe de la canne, la quantité de saccharose de la tige est mesurée à l'aide d'un réfractomètre. Les cannes sont coupées au ras du sol et la partie supérieure de la plante ainsi que les feuilles sont abandonnées dans les champs, en raison de leur faible contenu en sucre. La plante ensuite peut se renouveler jusqu'à huit à dix années consécutives. Au delà de ce temps, il faut renouveler les plantes pour s'assurer d'une bonne teneur en saccharose.

Une fois reçus à la sucrerie, les morceaux de canne sont séparés et lavés, s'il y a lieu. Ces morceaux passent dans trois coupes cannes appelés défibreurs où les fibres de canne sont séparées. A ce stade, les morceaux de canne ont une taille de l'ordre de 100 mm de longueur et 4 mm de diamètre. Cette étape de broyage est déterminante et facilite considérablement l'opération d'extraction.

Le rendement moyen varie entre 60 et 100 tonnes/hectare. Une tonne de canne permet d'obtenir environ 115 kg de sucre. Les deux régions productrices en France sont les Antilles et la Réunion.

Figure I.5. *Récolte de la canne à sucre*

I.1.4. Composition de la canne à sucre

Les principaux constituants de la canne à sucre sont le sucre et la fibre (tableau I.2). Selon l'état de maturité de la plante la teneur en fibre peut varier de 10 à 18%, la quantité d'eau de 72 à 77% et le saccharose de 12 à 18%.

Tableau I.2. *Composition moyenne de la canne à sucre*

Constituant	Teneur (%)
Eau	70
Fibres ligneuses	14
Saccharose	14
Impuretés	2

I.1.5. Procédés de transformation de la canne à sucre

Pour extraire, concentrer et raffiner le sucre contenu dans la canne, celle-ci doit être soumise à un traitement qui est devenu très complexe avec les années. Aujourd'hui, le processus s'est grandement mécanisé et permet d'obtenir un produit d'une grande pureté.

Une fois les cannes arrivées à l'usine, elles sont traitées immédiatement (maximum: une demi-journée après la coupe) afin de ne pas perdre trop de leur teneur en saccharose. En effet, plus le temps entre la récolte et le traitement est long, plus le rendement en sucre est faible. Les cannes sont coupées en tronçons (figure I.6). Afin de rendre le traitement ultérieur plus aisé, les tronçons de canne vont successivement passer dans un séparateur magnétique qui va permettre de retirer les éventuels bouts de métal qui risqueraient d'endommager les machines, puis vers un défibreur qui va broyer les cannes.

Les opérations de base du procédé d'extraction du sucre de canne brut sont les suivant : Extraction, Epuration, Evaporation, Cristallisation, Malaxage, Turbinage, Séchage, Emballage et Entreposage.

Figure I.6. *Canne à sucre coupée et prête à être transformée*

L'extraction du jus de canne à sucre (appelé vesou) se fait par broyage dans une série de moulins successifs. Un résidu fibreux est extrait en même temps que le jus : la « bagasse ». Tout au long de cette étape, un flux d'eau chaude est injecté afin de faciliter l'extraction du sucre de canne.

Les moulins permettent d'extraire 92 à 96% du saccharose contenu dans les tiges de canne. Le vesou est d'une couleur brune assez trouble avec une composition et une qualité qui varient selon la variété et la qualité de la canne.

Le vesou qui contient un grand nombre d'impuretés est d'abord épuré par tamisage pour enlever les particules ligneuses, et ensuite par chauffage et par ajout de chaux (chaulage). Une alcalinisation progressive du vesou jusqu'à un pH supérieur à 8 a donc lieu.

Après le chaulage, le vesou est porté à ébullition (105°C) dans des réchauffeurs afin de favoriser l'insolubilisation du floculat. Dans le clarificateur, le vesou décante et les impuretés noires (ou boues) se déposent au fond. Le jus clair obtenu en surface contient de nombreux sucres réducteurs, car l'épuration ne les détruit pas.

Les boues récupérées au fond du décanteur sont mélangées avec la fine bagasse (adjuvant de filtration) et sont filtrés sur des filtres rotatifs sous vide. Le jus obtenu est renvoyé en épuration, tandis que la boue (ou écumes) devient un sous-produit.

L'étape d'évaporation/cristallisation du jus consiste à amener celui-ci à ébullition. Le dégagement de vapeur d'eau va entraîner la concentration du jus sous forme de sirop (60% à 70% de matières sèches) qui va entrer dans le processus de cristallisation. Pour cela, il est alimenté dans une chaudière sous-vide à une pression d'environ 0,2 bar et maintenu à une température inférieure à 80°C (ce qui évite la caramélisation et permet l'évaporation). Le sirop continue à se concentrer jusqu'à formation des cristaux. Afin d'accélérer le processus, on peut introduire des cristaux de sucre (souvent du sucre glace) d'une taille de cinq à dix microns dans la chaudière (c'est l'étape dite de grainage).

Afin de contrôler le niveau de grossissement des cristaux de sucre et leur quantité, le mélange est remué sans interruption et du sirop est ajouté au fur et à mesure de l'opération.

Une fois que les cristaux ont atteint la taille et la quantité désirées, le mélange (appelé masse-cuite) passe dans des essoreuses afin de séparer les cristaux de l'eau mère. Cette eau mère ou égout pauvre sert à effectuer un deuxième voire un troisième jet de cristallisation. Les cristaux obtenus sont lavés par pulvérisation d'eau (clairçage). L'eau obtenue après clairçage est également appelée égout riche. Les cristaux de sucre blanc obtenus au cours du premier jet sont finalement séchés puis stockés dans des silos. Ils contiennent 99,9% de saccharose.

Lors des deuxième et troisième jets, le sucre encore présent est récupéré par cristallisation. Le sirop final est qualifié de jet d'épuisement (mélasse). Le sucre obtenu lors des deuxième et troisième jets peut être décoloré par adsorption sur du charbon actif ou dans des échangeurs d'ions afin de répondre aux exigences de qualité commerciale du sucre.

Après extraction, une tonne de canne produit environ 250 à 300 kg de sous produits, soit entre 25 et 30% de la matière première.

I.1.6. Les sous-produits de la canne à sucre

I.1.6.1. La mélasse

La mélasse contient 35% de saccharose, des sucres réducteurs et d'autres produits comme des minéraux et des vitamines. Elle est produite à raison de 30 kg/tonne de canne soit 3% de la matière première. Une bonne partie de la mélasse produite par les sucreries est utilisée pour la production du rhum industriel. Une autre fraction est destinée vers l'alimentation animale.

I.1.6.2. Les boues

Les boues d'épuration renferment une grande quantité de substances organiques dont des cires et des graisses. Dans certains pays elles sont utilisées pour fertiliser les sols cultivables.

I.1.6.3. La bagasse de canne à sucre

La bagasse (figure I.7), est le résidu fibreux issu de l'extraction du jus de sucre. Il s'agit donc d'une biomasse lignocellulosique formée par de fibres végétales broyées, et peut présenter jusqu'à 30% de la matière issue de la canne (Therdyothin, 1992). La bagasse est fortement générée (figure I.8) par les industries sucrières plus ou moins partout dans le monde avec une production mondiale annuelle de 234 millions de tonnes (Liu *et al.*, 2008).

Sa grande disponibilité, son faible coût et sa biodégradabilité, rendent la bagasse une bonne candidate pour une valorisation et une meilleure exploitation (Orlando *et al.*, 2002b ; Pandey *et al.*, 2000b).

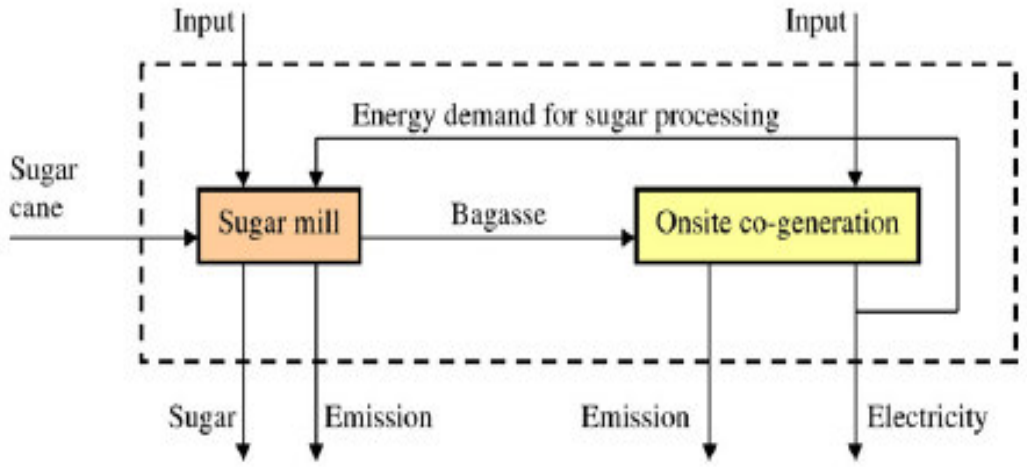
Figure I.7. *Bagasse de canne à sucre*

Figure I.8. *Photo illustrant la forte abondance de la bagasse de canne à sucre*

Dans le procédé typique de l'industrie sucrière (figure I.9), la bagasse est brulée dans les chaudières et sert à la génération de la vapeur sous-pression nécessaire au fonctionnement de la sucrerie. Dans certains pays comme la Thaïlande ou en France (la Réunion) l'excès de bagasse est utilisé comme combustible dans des centrales électiques alimentées en biomasse, c'est le cas par exemple de la centrale bagasse-charbon (Buddadee *et al.*, 2008). Cette valorisation de la bagasse peut contribuer à augmenter les émissions de gaz à effet de serre générées par les industries sucrières de façon générale. Ceci a donc un impact environnemental négatif et nécessite d'urgence la mise en œuvre des voies alternatives de valorisation des quantités énormes de bagasse générées tous les jours. De plus, à la sortie des moulins, la bagasse est à l'état humide, elle est donc microbiologiquement très instable et nécessite une étape de séchage pour être conservée avant d'être brulée. Ceci pénalise économiquement son utilisation. Une alternative de l'utilisation de la

bagasse sous son état humide, directement à la sortie des moulins, pourrait donc être intéressante et permettrait d'éviter cette étape de séchage.

La bagasse peut également être destinée à une autre industrie de transformation comme le cas de l'industrie papetière où elle peut être utilisée comme complément pour la fabrication de la pulpe ou de la pâte à papier. Cependant, son utilisation actuelle ne concerne qu'une faible partie de toute la bagasse produite. D'autres voies de valorisation de ce sous-produit ont été réalisées notamment pour la production de composés à haute valeur ajoutée (Rewell et Keany, 1991).



Figue I.9. *Diagramme simplifié d'un procédé typique de l'industrie sucrière (Buddadee et al., 2008)*

Afin de mieux conduire et de comprendre les mécanismes d'action qui peuvent être impliqués au cours de la transformation de la bagasse, des données théoriques sur les composants de la paroi végétale de façon générale et ceux de la bagasse de canne à sucre de façon particulière ainsi que la connaissance de certains procédés de transformation de l'un de ces composants majeurs de la biomasse (les hémicelluloses) nous sont parus nécessaires et seront détaillés dans ce qui suit.

I.2. Composition lignocellulosique de la biomasse de canne à sucre

Les composants majeurs de la bagasse de canne à sucre sont les composants macromoléculaires de la paroi cellulaire végétale. Elle renferme en moyenne 46-52% d'eau, 43-52% de fibres (incluant 50% cellulose, 25% hémicellulose et 25% de lignine) et de 2,5% de matière

dissoute principalement de sucre (Pandey et Soccol, 1998). La bagasse présente une grande hétérogénéité morphologique constituée de paquets de fibres et d'autres éléments de structure comme des vaisseaux, le sclérenchyme (cellules à parois épaisses souvent lignifiées : fibres), du parenchyme et des cellules épithéliales (Sanjuan *et al.*, 2001). On note que le sclérenchyme et le tissu des vaisseaux sont les tissus les plus lignifiés. Une étude microscopique a révélé que les parois cellulaires des entre-nœuds (des tiges) sont composés d'épiderme (5 à 7%), de sclérenchyme (25 à 27%) et de parenchyme (65 à 69%) (Müller, 1960).

Les parois végétales sont des structures complexes dont la composition varie en fonction de l'espèce botanique, de l'âge de la plante et du tissu considéré.

Des descriptions rigoureuses des sucres contenus dans la biomasse lignocellulosique et la base chimique pour extraire ces sucres ont été données par Shleser (1994) et le département de l'énergie US (2003) (d'après Hamelinck *et al.*, 2005).

De façon générale, La biomasse lignocellulosique est composée de polysaccharides (cellulose et hémicellulose), de lignine (figure I.10), et en faible proportion de résidus extractibles, acides, et sels minéraux.

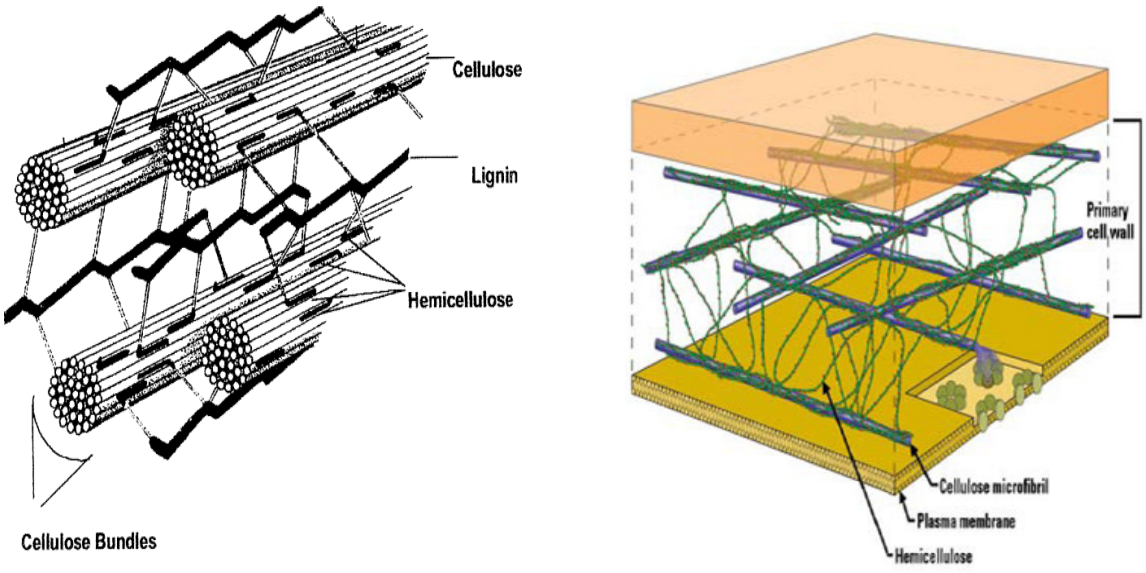


Figure I.10. *Représentations schématiques des composants de la paroi cellulaire végétale (Shleser, 1994).*

I.2.1. La cellulose

La cellulose (40-60% de la biomasse sèche), homopolymère linéaire d'unités D-glucopyranose reliés par des liaisons β(1-4) (figure I.11), C'est le biopolymère le plus abondant dans la nature. L'orientation de ses liaisons ainsi que les liaisons hydrogène intermoléculaires rendent le polymère rigide et difficile à se déstructurer. Ces liaisons permettent aux chaînes de β-glucanes de s'aggréger pour former des microfibrilles de 10 à 30 nm de diamètre. Ces microfibrilles constituent des unités structurales de la fibrille élémentaire qui constitue l'unité de base de la cellulose.

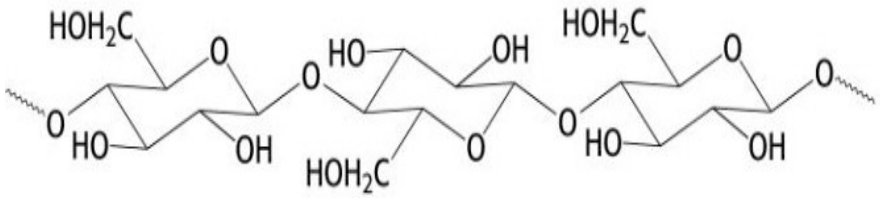


Figure I.11. *Structure chimique partielle de la cellulose*

I.2.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses (20-40%), le second matériel renouvelable le plus abondant après la cellulose, sont des hétéropolysaccharides qui se trouvent associés dans la paroi végétale avec la cellulose et les lignines. Il s'agit de polymères non-cellulosiques à structure branchée constitués de différentes unités de sucres neutres présents à différentes proportions et avec différents substituants. Les sucres monomères majeurs sont le D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, D-mannose, acide glucuronique, acide 4-O-methyl-D-glucuronique, acide galacturonique et à plus faible proportions, le L-rhamnose, L-fucose et une variété de sucres neutres O-méthylés (Sun *et al.*, 1996). A cause de cette hétérogénéité de leurs constituants chimiques, les hémicelluloses, dans leur état natif, sont de nature amorphe non cristallisable et sont des polymères branchés à faible poids moléculaire (avec un degré de polymérisation entre 80 et 200) ce qui rend leur hydrolyse relativement plus facile que celle de la cellulose.

Les hémicelluloses peuvent être classifiées en 4 groupes de polysaccharides de structure de la paroi cellulaire : les xylanes, les mannanes, les β-glucanes et les xylo-glucanes. Leurs variations structurales résident dans la nature des chaînes latérales, dans la distribution, la localisation et la

nature des liaisons glycosidiques de la chaîne de macromolécule. La chaîne principale peut être constituée d'un seul type d'unité (homopolymère) comme les xylanes ou de deux types ou plus d'unités (hétéropolymère) comme les glucomannanes. Les chaînes principales des hémicelluloses sont plus courtes que celles de la cellulose et possèdent des groupements latéraux, dans certains cas elles sont branchées.

I.2.2.1. Les xylanes

Les xylanes constituent la principale hémicellulose des Graminées et de façon générale, ils sont les plus abondants des hémicelluloses trouvés dans les paroi cellulaires secondaire des plantes où ils peuvent constituer plus que 30% de leurs masses sèches (Sun *et al.*, 2004). Chez les dicotylédones (bois durs et plantes herbacées) ils varient de 20-30% et peuvent atteindre les 50% dans certains tissus des monocotylédones (herbes et céréales).

Les hétéroxylanes sont des hétéropolymères formés par une chaîne d'unités de xylose reliées par des liaisons glycosidiques de type β(1-4), et qui sont ramifiés par des chaînes latérales, comme l'acide D-glucuronique ou son 4-*O*-méthyle éther, L-arabinose et/ou de différents oligosaccharides comprenant le xylose, le L-arabinose, D ou L-galactose et de D-glucose.

Les polysaccharides de type xylane peuvent être divisés en homoxylane ou hétéroxylane incluant les arabinoxylanes, les glucuronoxylanes, les (arabino)glucuronoxylanes, (glucurono)arabinoxylanes, les et les hétéroxylanes complexes.

Les homoxylanes sont constitués de chaînes de résidus xylopyranose reliés par des liaisons glycosidiques de type β(1-3) et/ou β(1-4). On les retrouve chez les algues comme les *Palmariales* et les *Nemaliales.*

Les (arabino)glucuronoxylanes (AGX) et les glucuronoarabinoxylanes (GAX) possèdent des résidus simples d'acide uronique 4-*O*-méthyl-α-D-glucopyranosyl (MeGA) et de α-L-arabinofuranose attachés respectivement en position C2 et C3 au niveau des résidus β-(1,4)-D-xylopyranose et qui peuvent être également faiblement acétylés.

Les AGX constituent l'hémicellulose dominante de la paroi cellulaire des tissus lignifiés chez les céréales et les herbes, et possèdent généralement, des chaînes considérablement plus substituées par des MeGA que les MGX des bois durs, avec 5 à 6 résidus par groupement d'acide uronique. Un exemple de structure des AGX est représenté dans la figure I.12 (a et b). Contrairement aux AGX, les GAX sont constitués d'une chaîne d'arabinoxylane mono ou di-substituée par des chaînes latérales de α-L-arabinofuranose et par peu d'acide uronique (10 fois moins). Les GAX

sont localisés au niveau des tissus non endospermiques des graines de céréale comme ceux de blé, de maïs et de son de riz ainsi que chez la canne à sucre. Leur degré de substitution et leur conformation dépendent fortement de leur origine.

La plupart des glucuronoxylanes, possèdent des résidus simples d'acide uronique 4-*O*-méthyl-α-D-glucopyranosyl (MeGA) attachés, en position C2, à la chaîne principale de xylopyranose. Ce type de xylane est appelé 4-*O*-methyl-D-glucurono-D-xylane (MGX). L'acide glucuronique peut être présent au niveau des chaînes latérales sous sa forme 4-*O*-méthylée ou non méthylée. Les MGX représentent le composé majeur des bois durs avec un rapport xylose/MeGA qui varie de 4/1 à 16/1 avec une moyenne de 10/1. Le xylane à son état natif et stable a été supposé acétylé.

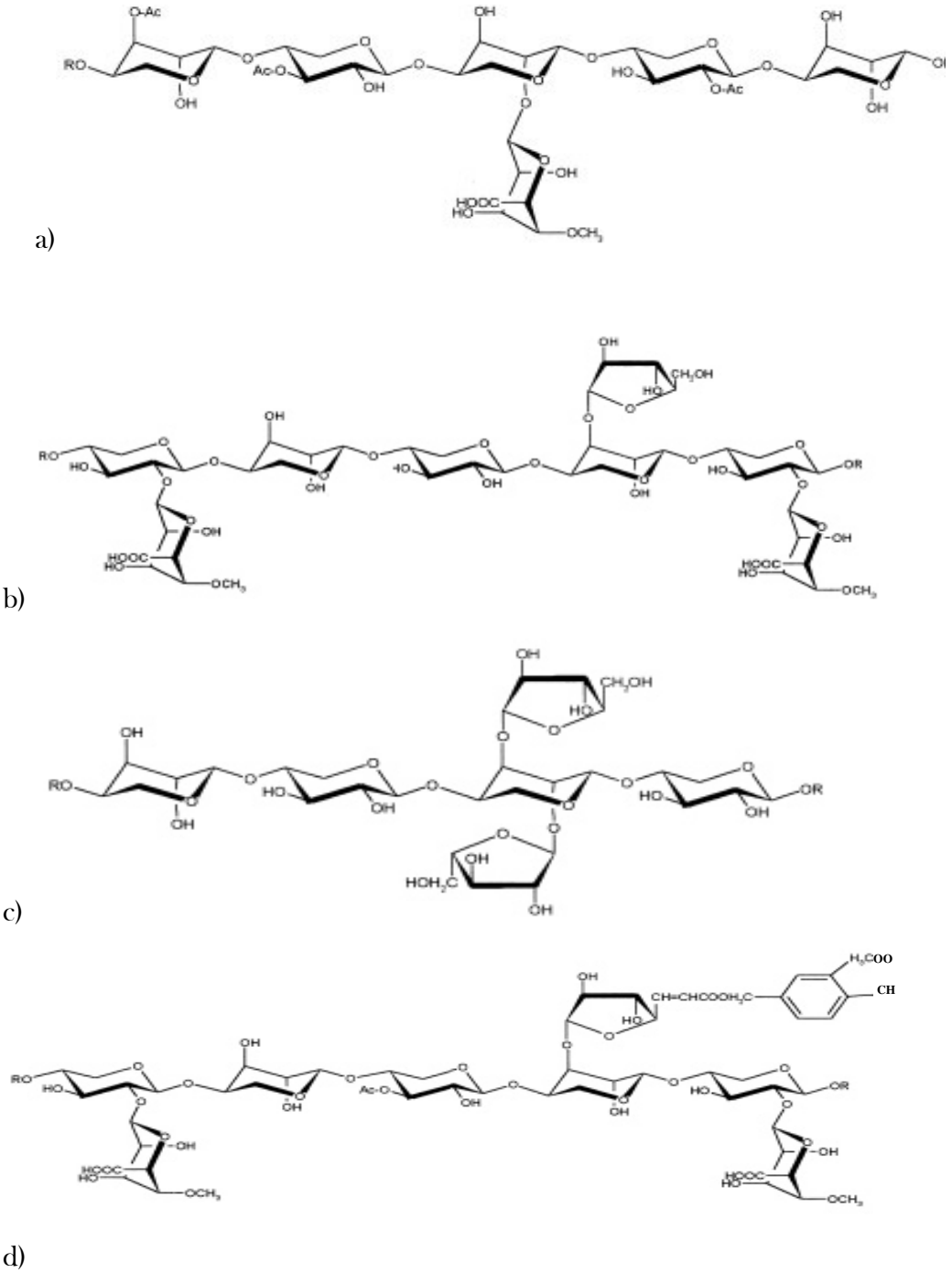
Les arabinoxylanes ont été détectés chez une variété de céréale comme le blé, le seigle, l'orge, l'avoine, le riz, le maïs, le sorgho et aussi chez la canne à sucre, ainsi que chez d'autres plantes. Ils représentent le composé majeur de l'hémicellulose des parois cellulaires de l'endosperme amylacé (farine) et dans les enveloppes (son) des graines (figue 12, c et d).

Les arabinoxylanes sont des polymères neutres ou faiblement acides, leur chaîne linéaire est en partie substituée par des résidus α-L-arabinofuranose en position *O*-2 et/ou *O*-3. Des acides phénoliques comme l'acide férulique et p-coumarique ont été trouvés estérifiés en position *O*-5 au niveau des résidus d'arabinofuranose.

Les hétéroxylanes complexes, sont présents chez les céréales, les graines, les exsudats et les mucilages, et sont constitués d'une chaîne principale de β(1-4)-D-xylopyranose décorée par une variété de chaînes latérales de mono et d'oligo-glycosyl.

Les travaux de Sun *et al.*, (2004) ont montré que les hémicelluloses de la bagasse de canne à sucre sont de type L-arabino-(4-O-méthyle-Dglucurono)-D-xylane, formées de chaînes de résidus xylose reliées par des liaisons β(1-4) qui sont branchées principalement par des arabinofuranosyl et des unités 4-O-methylglucuropyranosyl. Des acides p-coumarique et ferulique ont été trouvés estérifiés aux polysaccharides et à la lignine, respectivement.

Les travaux de Xu *et al.* (2004) ont montré que les hémicelluloses de la bagasse de canne à sucre sont constituées de 88,6% de pentosanes, 1,8% d'acide uronique et de 1% de lignine (lignine résiduelle). L'analyse des sucres a montré que le xylose est le sucre prédominant (80,9% de la totalité des sucres. L'arabinose (9,3%) et le galactose (5,6%) sont respectivement le second et le 3ème constituants majeurs.



a)

b)

c)

d)

Figure I.12. *Structure chimique partielle de a) O-acéthyl-4-O-methylglucuronoxylane de bois dur ; b) Arabino-4-O-methylglucuronoxylane de bois tendre ; c) arabinoxylane de son de blé ; d) arabinoxylane d'herbe (Nabarlatz, 2006)*

Les acides uroniques (1,8%), principalement de l'acide 4-O-méthyle-α-D-glucopyranosyluronique (MelcA), le glucose (1,5%) et le mannose (0,8%) sont les constituants mineurs. Les ratios molaires de xylose/arabinose /galactose/MelcA/glucose/mannose sont 83/10/5/1/1/0,7.

I.2.3. La lignine

La lignine représente 10-25% de la biomasse lignocellulosique sèche, elle constitue un complexe polymérique aromatique hétérogène formé par des unités de phénylpropane reliées principalement par des liaisons β-O-4 aryle éther et de groupements méthoxy. Ce sont des substances polyphénoliques qui s'incrustent dans la paroi cellulaire pour cimenter les cellules végétales entre elles, ce qui confère à la lignine son rôle protecteur et de rigidité cellulaire. La lignine est le constituant majeur des parois secondaires des tissus conducteurs et de soutien. Sa teneur est variable selon l'espèce d'origine, le tissu considéré et l'âge de la plante (He et Terashima., 1991).

La macromolécule de lignine ne peut pas être décrite par une simple combinaison d'une ou de quelques unités monomériques comme la cellulose et l'hémicellulose. Plusieurs études avec du carbone marqué (^{14}C) ont confirmé que les alcools p-hydroxy-cinnamyl, p-coumaryl, coniferyl, et synapyl, sont des précurseurs primaires de l'édifice de toute la lignine (Fengel et Wegener, 1989). La structure de lignine a fait l'objet de plusieurs modèles, un modèle de structure est donné dans la figure I.13.

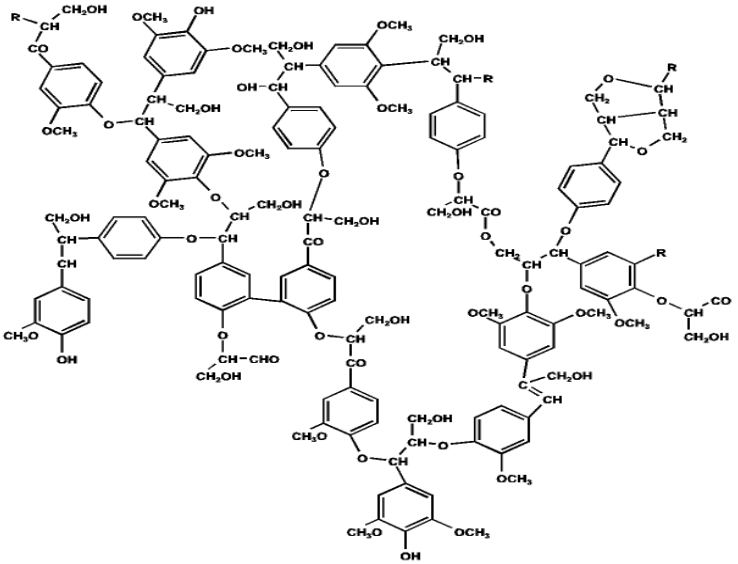


Figure I.13. *Schéma structural de la lignine*

I.2.4. Composants mineurs

Parmi les composants mineurs qui peuvent exister dans la paroi végétale et particulièrement celle des graminées, il y a les acides phénoliques (Hartley *et al.*, 1981).

Les principaux acides phénoliques les plus rencontrés chez les graminées sont les acides appelés hydroxycinnamiques (Bunzel *et al.*, 2002) et qui sont : l'acide férulique et l'acide p-coumarique. Ils peuvent se trouver sous leurs formes cis ou trans mais ils sont majoritairement présents sous la forme trans la plus stable.

Les acides féruliques sont sous forme monomérique ou dimérique et sont reliés par des liaisons ester aux résidus arabinosyl en position O-5. Les diférulates réticulent les polysaccharides de la paroi cellulaire et influencent l'intégrité de cette dernière (Bunzel *et al.*, 2001). Il agissent également en tant que site de nucléation pour la lignificaion (Hatfield *et al.*, 1999).

L'existence des acides férulique et p-coumarique dans les parois cellulaires de la bagasse a été reportée par Kato *et al.* (1987) dans leur étude du complexe lignine-hémicellulose. Les auteurs ont montré que l'acide férulique et l'acide p-coumarique sont estérifiés aux hémicelluloses et à la lignine, respectivement, dans la paroi cellulaire de la bagasse. Les mêmes auteurs ont montré que le site de féruloylation des hémicelluloses de la bagasse est exclusivement en O-5 du résidu L-arabinofuranosyl qui est attaché à la chaîne de xylane en position O-3. D'ailleurs, Kato *et al.* (1983) ont pu isoler un trisaccharide feruloylé (O-[5-O-(trans-feruloyl)-α-L-arabinofuranosyl]-(1-3)-O-β-D-xylopyranosyl-(1-4)-O-β-D-xylopy-ranosyl-(1-4)-D- xylopyranose) à partir un hydrolysat enzymatique du complexe lignine-polysaccharides de la bagasse.

I.2.5. Les liaisons interpolymères chez les graminées

Les divers constituants pariétaux sont reliés entre eux par plusieurs types de liaisons : covalentes, ioniques, hydrogène, etc.

La lignine semble ne pas être déposée de façon simple entre les polysaccharides pariétaux, mais reliée et associée en partie avec eux et forme ce qu'on appelle un complexe polysaccharide-lignine. Ce complexe rend les composés difficilement séparables par des traitements chimiques sélectifs ou par une séparation spécifique ou par des techniques de purification.

Dans le modèle courant de la structure de la lignocellulose, les fibres lignocellulosiques sont imbriquées dans une matrice lignine-polysaccharide. Les hémicelluloses (particulièrement les xylanes) jouent un rôle significatif dans l'intégrité des parois cellulaires par des liaisons covalentes et non covalentes (Thomson, 1993).

I.2.5.1. Les liaisons covatentes

I.2.5.1.1. Les liaisons diphénoliques

Ces liaisons caractérisent les parois des graminées à cause de la présence des acides hydroxycinnamiques. Ces molécules sont bi-fonctionnelles et interviennent dans l'établissement des liaisons intra-polymères entre les arabinoxylanes par des liaisons de type ester (Lam *et al.*, 1992), et entre arabinoxylanes et lignines par des liaisons de type éthers (liaisons éther 4-O ou éther 4-O-β (Scalbert *et al.*, 1985 ; Iiyama *et al.*, 1990).

I.2.5.1.2. Les liaisons glycosidiques

Des liaisons de type glycosidiques peuvent exister entre l'hydroxyle hémiacétalique des sucres et les groupements hydroxyles des glycoprotéines (Sakai *et al.*, 1993) ou des lignines (Joseleau et Kesraoui, 1986).

I.2.5.1.3. Les liaisons ester

Des liaisons ester peuvent également exister entre les fonctions carboxyliques des glucuronoarabinoxylanes et les fonctions alcools des monomères de lignines (Erikson *et al.*, 1980).

I.2.5.1.4. Les liaisons éther

Des liaisons covalentes de type éther sont responsables de l'association entre les polymères de lignine et d'arabinoxylanes, en faisant intervenir la fonction hydroxyle phénolique des lignines et les fonctions hydroxyles en C2 et C3 des arabinoxylanes (Watanabe *et al.*, 1989).

La figure I.14 résume les différents types de liaisons covalentes qui peuvent exister entre la lignine et les différents composants pariétaux. Il est à noter que les liaisons éther sont stables en milieu alcalin) alors que les liaisons ester sont alcalino-labiles.

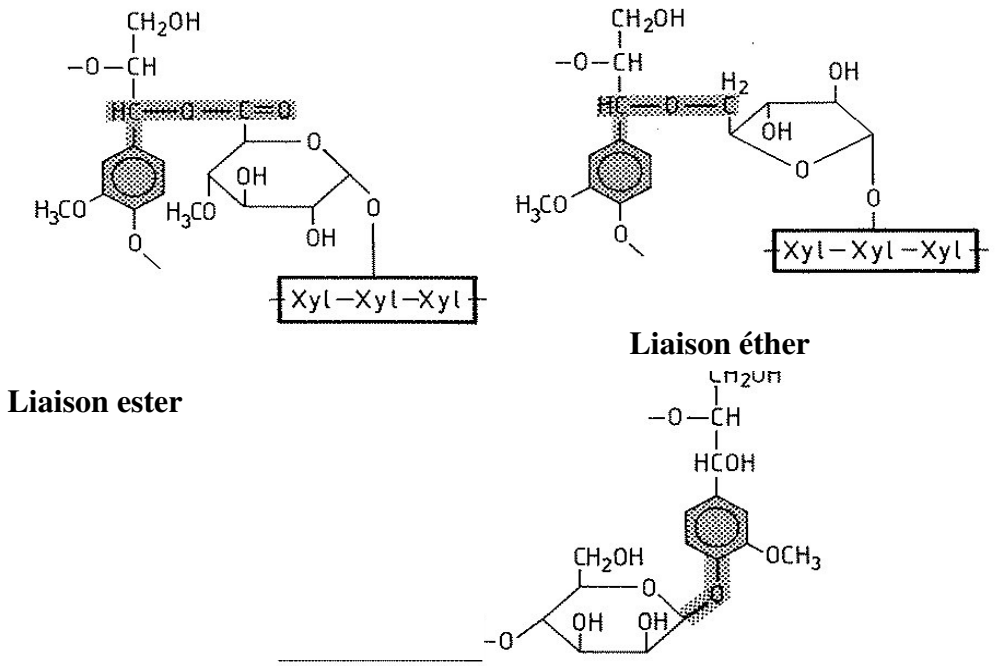


Figure I.14. *Les types de liaisons lignine-polysaccharide les plus suggérés (Fengel et Wegener, 1989)*

I.2.5.2. Les liaisons non-covatentes : Les liaisons Hydrogènes

Des liaisons hydrogène intermoléculaires se créent afin de permettre la stabilisation des chaînes de cellulose. Ces mêmes liaisons contribuent également à la formation des microfibrilles de cellulose. Les liaisons hydrogène assurent l'interaction entre les chaînes d'arabinoxylnanes et aussi entre celles-ci et la cellulose (Valent et Albersheim, 1974 ; Hayashi, 1989).

L'interaction entre les arabinoxylanes dépend de leur degré de substitution par l'arabinose. En effet, seuls les arabinoxylanes peu ramifiés établissent des liaisons hydrogène entre eux et avec la cellulose. Des liaisons hydrogène peuvent également se former entre la lignine et les polysaccharides dans le réseau pariétal (Houteman *et al.*, 1995).

I.3. Intérêts technico-économiques des hémicelluloses

Les hémicelluloses ont attiré de plus en plus un grand intérêt en tant que biopolymères à potentiel d'utilisation technico-économique. En effet, elles constituent d'une part, une source de polymères à applications chimique et pharmaceutique, comme la production des biopolymères cationiques (Ebringerová *et al.*, 1994) les hydrogels (Gabrielli *et al.*, 2000) et des dérivés de chaînes alkyl ester (Fang *et al.*, 1999), et d'autre part, elles peuvent être une source renouvelable pour la

production d'un certain nombre de composés chimiques qui peuvent être utilisables dans divers domaines.

Les xylanes représentent une source importante de composés chimiques dont la nature dépend largement de l'étendue de l'hydrolyse de ces polymères lors de leur extraction. En effet, par hydrolyse on obtient soit des sucres monomères fermentescibles, tels que le xylose, l'arabinose ou des acides féruliques, soit des oligomères ou xylo-oligosaccharides solubles non digestibles.

Le xylose, pentose ($C_5H_{10}O_5$) (figure I.15) de PM de 150,131 g/mole, utilisé comme un édulcorant et/ou stabilisant dans différents produits alimentaires (Hoopman *et al.*, 1993). Il peut être converti biotechnologiquement en xylitol (Winkelhausen et Kuzmanova, 1998).

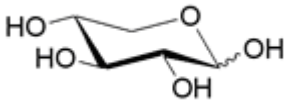


Figure I.15. *Structure du xylose*

Le xylitol ($C_5H_{12}O_5$) c'est un polyol qui possède des propriétés intéressantes ce qui fait sa haute valeur pour les industries pharmaceutique, odontologique et alimentaire. Il s'agit d'un composé qui a un pouvoir sucrant similaire au saccharose (Manz *et al.,* 1973), non-cariogène qui est déjà exploité en industrie alimentaire comme ingrédient dans le chewing-gum et le dentifrice (Pepper et Olinger, 1988). De plus il peut être utilisé par les personnes obèses ou diabétiques (Ylikahri, 1979). Sa production par voie fermentative permet l'utilisation des résidus agroindustriels, comme la bagasse de canne à sucre et offre une alternative au procédé conventionnel d'hydrogénation catalytique du xylose (Farmos-Yhtymä Öy, 1988).

L'arabinose, est utilisé dans des diagnostics bactériologiques (Gibson et Friedman, 1978) et médicauxet (Dorado et Pueyo, 1988) et est un agent antiviral.

Selon les directives de l'Union Européenne (EC directives 88/338), ces composés, quand ils sont produits par conversion enzymatique du matériel végétal, sont classés dans la catégorie des produits naturels.

Les xylooligosaccharides ont des propriétés de prébiotiques en améliorant la croissance des bifidobactéries (Fooks *et al.*, 1999 ; Modler, 1994).

Par ailleurs, l'acide férulique ayant potentiellement diverses applications commerciales (Graf, 1992) comme un agent antioxydant, conservateur, antimicrobien, anti-inflammatoire et un précurseur de flaveur alimentaire (vanille).

I.4. Méthodes d'extraction des hémicelluloses

L'extraction des hémicelluloses consiste à les libérer de la matrice lignocellulosique. Cependant, la libération des composés hémicellulosiques à partir des parois cellulaires végétales est restreinte par la présence du réseau de lignine, en plus des liaisons ester et éther du complexe lignine-hémicellulose. De plus l'étendue des liaisons hydrogène entre le polysaccharide individuel des composants pariétaux peut gêner l'isolement des hémicelluloses (Ebringerová *et al.*, 2000).

L'extraction des hémicelluloses à partir de substrats végétaux a fait l'objet de nombreux travaux et différents méthodes d'extraction ont été proposées. Ces méthodes peuvent être chimique, physico-chimique et enzymatique.

I.4.1. Méthodes chimiques

Dans les procédés d'hydrolyse chimique des matériaux lignocellulosiques, un ou plusieurs réactifs chimiques sont utilisés en général dans le but d'hydrolyser à la fois les hémicelluloses et la cellulose. Dans ce type de traitement, les hémicelluloses à structure hétérogène et de degré de polymérisation relativement plus faible que celui de la cellulose, sont les premières à être hydrolysées (Gong *et al.*, 1981 ; Grethlein, 1985).

I.4.1.1. Hydrolyse acide

Des acides concentrés comme l'acide sulfurique (H_2SO_4) et l'acide chlorhydrique (HCl) sont utilisés pour traiter les matériaux lignocellulosiques. Malgré leur nature d'agents forts préconisés pour une hydrolyse complète, leur faible rentabilité a entraîné leur abandon. En effet, les acides concentrés sont toxiques, corrosifs, non spécifiques et nécessitent des réacteurs résistants à la corrosion. En plus, l'acide concentré doit être récupéré après hydrolyse pour que ce procédé soit économiquement faisable (Sivers et Zacchi, 1995).

L'hydrolyse à l'acide dilué a été développée avec succès pour traiter les matériaux lignocellulosiques. En effet, un prétraitement à l'acide sulfurique dilué peut permettre un rendement de réaction élevé et une amélioration significative de l'hydrolyse de la cellulose (Esteghlalian, 1997). Plus récemment, des procédés d'hydrolyse à l'acide dilué utilisant des

conditions moins sévères, ont été développés avec de forts rendements de conversion des xylanes en xylose (Sun et Cheng, 2002).

Deux types de prétraitements à l'acide dilué existent :

- un procédé continu à haute température (>160°C) pour de faibles concentrations de solides (5-10% m/m) (Brennan *et al.,* 1986 ; Converse *et al.*, 1989).
- et un procédé « batch » discontinu à faible température (<160°C) pour les fortes concentrations de solides (10-40% m/m) (Cahela *et al.*, 1983 ; Esteghlalian, 1997).

Le prétraitement par de l'acide dilué à haute température permet toujours l'hydrolyse de l'hémicellulose en ses sucres monomères (xylose, arabinose, et autres sucres) (Bungay, 1992). Le résidu solide contient la cellulose et le plus souvent de la lignine.

L'utilisation des acides pour libérer l'hémicellulose a été testé sur une large gamme de matières lignocellulosiques allant des bois durs aux herbes et aux résidus de l'agriculture (Knappert *et al.*, 1981 ; Converse et Grethlein, 1985 ; Grous *et al.*, 1985 ; Lee *et al.*, 1978 ; Grohmann *et al.*, 1985 ; Torget *et al.*, 1990, 1991, 1992).

Des prétraitements de bois de peuplier et de paille de blé ont été réalisés pour des concentrations élevées de solides de l'ordre de 20 à 40% dans des tubes à essai chauffés dans des blocs en aluminium à des températures de 140 et 160°C (Grohmann *et al.*, 1986).

Ce procédé a été appliqué à la production de furfural par hydrolyse à l'acide dilué des noyaux d'olives, et a abouti à 50-65% de rendements théoriques (Montané *et al.*, 2002).

Cheng *et al.* (2008) ont procédé à une hydrolyse acide de la fraction hémicellulosique de la bagasse de canne à sucre (10% w/w) avec de l'acide sulfurique (1,25% w/w) à 121°C pendant 2 heures. Une concentration de xylose de 17,1 g/L a été obtenue dans la première étape d'hydrolyse. En plus du xylose, l'hydrolysat acide obtenu contient le glucose (7,2 g/L), l'arabinose (2 g/L), le cellobiose (0,5 g/L), le galactose (0,9 g/L), le mannose (0,3 g/L), l'acide acétique (4 g/L) et le furfural (1,4 g/L).

Les avantages des procédés d'hydrolyse à l'acide dilué sont liés d'une part à l'utilisation d'une concentration élevée en biomasse, d'où une concentration en sucre plus importante dans les hydrolysats (Parisi, 1989), et d'autre part à l'absence de recyclage de l'acide nécessaire dans le cas de l'utilisation des acides forts.

Cependant, l'hydrolyse à l'acide dilué s'accompagne toujours d'une perte de matériel liée à la dégradation des sucres et à la formation de nombreux composés inhibiteurs : furfural,

hydroxyméthylfurfural, acide acétique, etc. ; ce qui rend les hydrolysats difficiles à fermenter. En plus des réactions de réversion des sucres pourraient se produire, et qui se traduisent par une repolymérisation en oligosaccharides non fermentescibles (Shah *et al.*, 1984). Malgré le fait que le prétraitement à l'acide dilué peut améliorer significativement l'hydrolyse de la cellulose, son coût reste généralement plus élevé que celui de certains procédés de prétraitements physico-chimiques comme l'explosion à la vapeur ou l'AFEX (voir plus loin). En effet, une étape de neutralisation du pH est toujours nécessaire pour une hydrolyse enzymatique ou pour des procédés de fermentation ultérieurs.

I.4.1.1.1. Mécanisme de l'hydrolyse acide des hémicelluloses

En plus de l'hydrolyse enzymatique, l'hydrolyse chimique acide des liaisons glycosidiques constitue la réaction de dégradation essentielle et la plus typique des oligo- ou des polysaccharides. Le mécanisme moléculaire principal de l'hydrolyse acide est représenté dans la figure suivante :

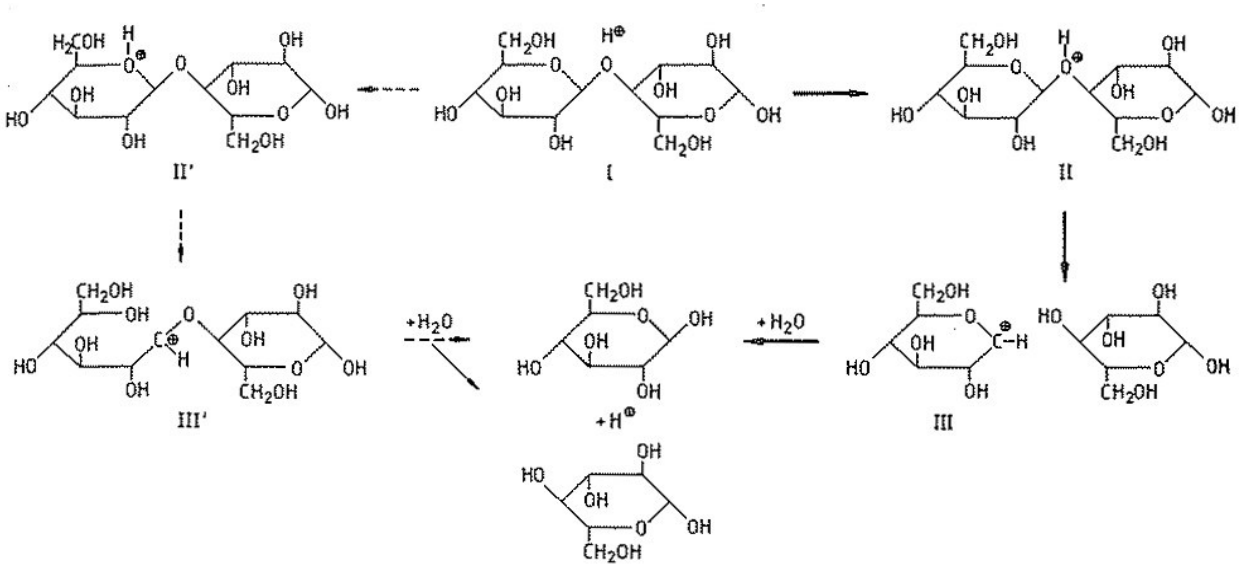


Figure I.16. *Mécanisme de l'hydrolyse acide des liaisons glycosidiques (→ Réaction dominante)*

Le mécanisme de l'hydrolyse acide aboutissant à la rupture des liaisons glycosidiques se déroule en trois étapes. Dans la première étape, le proton du catalyseur acide interagit rapidement avec l'oxygène de la liaison glycosidique reliant deux unités de sucre (I), formant ce qu'on appelle un acide conjugué (II). Cette étape est suivie d'un faible clivage des liaisons C-O donnant naissance à un cation carbonium cyclique (III). La protonation peut également se produire au niveau de

l'oxygène inclus dans le cycle (II'), résultant en une ouverture du cycle et à la formation d'un cation carbonium non cyclique (III'). Ce n'est pas très clair lequel des ions carbonium est le plus abondant, mais il est fort probable que les deux modifications de la protonation puissent avoir lieu.

L'ion oxocarbonium tautomérique se trouve sous la conformation demi-chaise comme le montre la figure I.17 et le cation carbonium initie une addition finale rapide d'une molécule d'eau, résultant en la formation d'un produit final stable et la libération d'un proton.

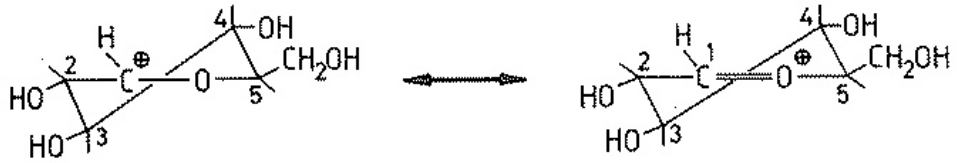


Figure I.17. *Conformation demi-chaise de l'ion tautomérique oxocarbonium (Fengel et Wegner, 1989)*

Les cinétiques de l'hydrolyse et le temps nécessaire à la dégradation sont influencés par la nature du milieu acide et les caractéristiques du substrat. En effet, le milieu réactionnel peut être caractérisé par le type de l'acide, le pH, la force de l'acide, la température et la pression. En ce qui concerne le substrat, les facteurs les plus importants sont : son état de phase, ses propriétés physiques, son accessibilité (dans le cas de l'hydrolyse homogène ou hétérogène), sa conformation, sa structure et ses substituants. Les réactions d'hydrolyse des liaisons glycosidiques sont généralement des réactions de premier ordre, mais le taux d'hydrolyse dépend fortement de l'acide et du substrat.

Par ailleurs, des réactions de déshydratation qui se produisent typiquement durant les traitements thermiques des polysaccharides, ces réactions se produisent également et inévitablement dans les conditions d'hydrolyse acide provoquant la décomposition des sucres hydrolysés. La déshydratation catalysée par l'acide, dans des conditions modérées, mène à la formation des sucres anhydres avec des liaisons glycosidiques intramoléculaires résultant de l'élimination d'une molécule d'eau à partir de deux groupements hydroxyl (comme par exemple le 1,6 glucose anhydre). Puisque ces liaisons sont facilement hydrolysables, une série de produits de dégradation supplémentaires peuvent se former dont certains sont des composés aromatiques condensables. Les produits de dégradation les plus importants sont : le furfural, formé à partir des pentoses et des acides uroniques, et l'hydroxyméthylfurfural (HMF) formé à partir des hexoses

comme le glucose (figure I.18). L'utilisation des acides concentrés à hautes température favorise considérablement la formation de ces composés.

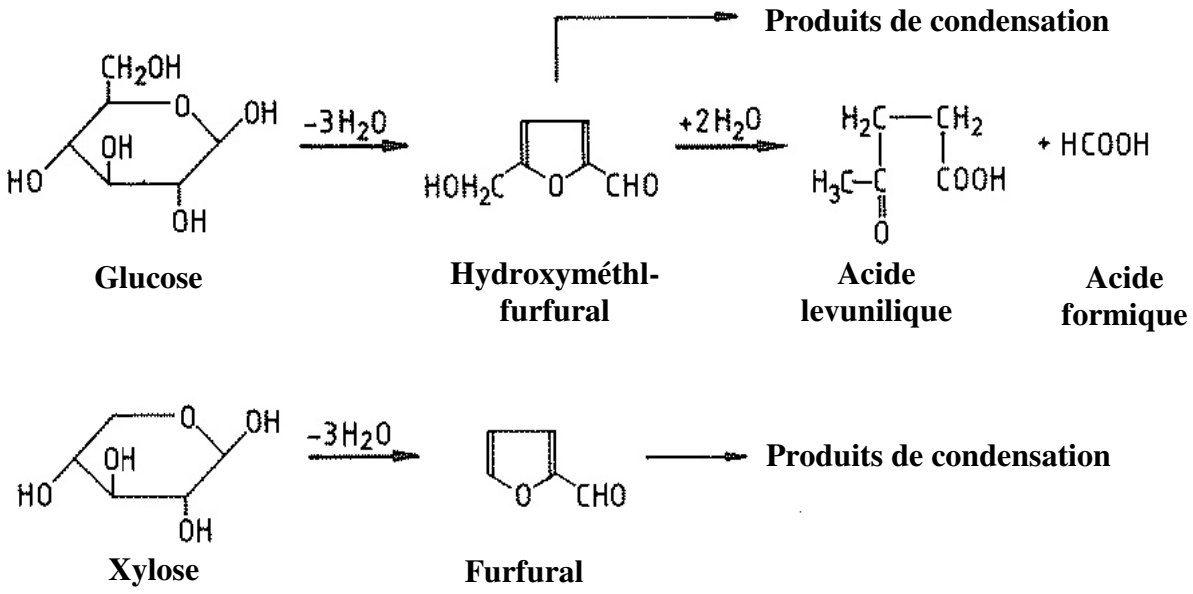


Figure I.18. *Formation en milieu acide du furfural, hydroxymethlfurfural, l'acide levulinique et l'acide formique à partir des monosaccharides (Nabarlatz, 2006)*

I.4.1.2. Hydrolyse alcaline

Les prétraitements en milieu alcalin se rapprochent des procédés papetiers, et ont, pour la plupart, été développés avec des pilotes de l'industrie papetière.

De nombreuses études ont été réalisées, soit avec uniquement de la soude, soit avec de la soude et d'autres produits (Ogier *et al.*, 1999). Les conditions habituelles des ces prétraitements sont : NaOH à 8-12% (massique/matière sèche), temps de séjour de 30 à 60 min et une température entre 80 et 120°C (Pourquié et Vandecasteele, 1993).

L'extraction des hémicelluloses dans les conditions alcalines implique l'hydrolyse des liaisons ester pour les libérer de la matrice lignocellulosique. Ce traitement permet la solubilisation de presque la totalité de lignine et une partie des hémicelluloses.

Le résidu obtenu présente une excellente susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique. L'efficacité du traitement alcalin dépend de la nature du substrat et des conditions de traitement : il est plus efficace sur des résidus agricoles tels que les bagasses et les pailles que sur des co-produits du bois (McMillan, 1994).

Il a été suggéré que les xylanes contenant un haut degré de substitution à l'intérieur de la chaîne sont plus solubles en milieu alcalin et sont moins reliés à la cellulose, tandis que des molécules faiblement substituées sont moins solubles en milieu alcalin et sont plus étroitement reliés à la cellulose.

Plusieurs solutions alcalines (NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ et $Ba(OH)_2$) ont été testées en faisant varier la concentration d'alcalin, le temps et la température de réaction pour déterminer l'optimum des conditions d'extraction d'hémicelluloses à partir de l'herbe du vétiver. Le meilleur rendement (35%) a été obtenu avec le traitement par NaOH 4M, à température ambiante et pendant 8 heures (Methacanon *et al.,* 2003).

Un traitement alcalin pour le fractionnement des matériaux hémicellulosiques à partir de la paille de blé a été également proposé par Sun *et al.* (1995) qui ont obtenu 60% et 80% de lignine et d'hémicellulose. Du xylane hautement pur (94%) a été extrait par différentes solutions alcalines comme l'hydroxyde d'ammonium, l'hydroxyde de calcium et l'hydroxyde de potassium (Hespell, 1998).

Les travaux de Sun *et al.* (2004) sur le fractionnement et l'extraction alcaline des hémicelluloses de la bagasse de canne à sucre, ont montré que des traitements successifs de la bagasse par un alcalin et un peroxyde alcalin ont permis de libérer 90,4% des hémicelluloses et 89% de la lignine totale de la paroi cellulaire de la bagasse. Les auteurs ont montré que les hautes concentrations d'alcalins et de peroxyde alcalins (2 M NaOH et 3% de peroxyde d'hydrogène) ont été les plus efficaces sur le clivage des liaisons α-éther entre la lignine et l'hémicellulose de la bagasse.

L'efficacité du traitement alcalin s'accompagne toujours d'une perte de 30 à 35% de la matière sèche initiale (Pourquié et Vandecasteele, 1993). De plus, dans certains cas, ce traitement peut engendrer une hydrolyse partielle de la cellulose et donc la libération du glucose dans les fractions hémicellulosique récupérées (Sun *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 2003)

D'autre part, le coût actuel des réactifs chimiques, tels que la soude, pénalise fortement le procédé. La nécessité de lavage et de neutralisation du résidu solide pourrait engendrer des coûts supplémentaires dans certains procédés (Pourquié et Vandecasteele, 1993).

I.4.1.3. Procédé Organosolv

Le principe de cette technique, venant de l'industrie papetière, consiste à rajouter un solvant organique (méthanol, éthanol, acétone, éthylène glycol, triéthylène glycol et l'alcool tétrahydrofurfuryl) (Cham *et al.*, 1988 ; Thring *et al.*, 1990) (ou un mélange de solvants aqueux et organique avec des catalyseurs acides inorganiques (HCl ou H_2SO_4)), au procédé de prétraitement, afin de rompre les liaisons internes de lignine et d'hémicellulose. Des acides organiques comme les acides oxalique, acétylsalicylique, et salicylique peuvent également être utilisés comme catalyseurs dans les procédés Organosolv (Sarkanen, 1980).

Ce traitement aboutit à la solubilisation de la lignine et de la fraction hémicellulosique avec de bons rendements de récupération de sucres (Cham *et al.*, 1985). Dans ce procédé, le solvant organique est extrait par évaporation, puis recyclé et la lignine précipitée est récupérée par simple filtration ou centrifugation.

Pour la production des glucuronoarabinoxylanes à partir du son de blé, Hollman et Lindhauer (2005) ont proposé un procédé organosolv à l'échelle pilote comprenant une étape de purification (ébullition dans l'éthanol à 70%) suivie d'une extraction à l'eau des arabinoxylanes solubles. Le produit final obtenu par précipitation à l'éthanol était de 70-80% de pureté.

Lawther *et al.*, (1995) ont obtenu des produits hémicellulosiques à partir de la paille de blé par combinaison d'une extraction par le diméthylsulfoxide (DMSO) suivie d'une extraction à l'hydroxyde de potassium et de borate de sodium.

Les parois cellulaires des arbustes chinois *Haloxylon ammodendron* et *Elaeagnus angustifolia* ont été fractionnées dans des conditions acides par deux étapes d'extraction successives au moyen d'un mélange eau/éthanol (60 :40 v/v), ce qui a permis la solubilisation de 84 et 88% respectivement, des hémicelluloses initiales (Sun *et al.*, 2002).

Le procédé organosolv donne une cellulose presque dépourvue aussi bien d'hémicellulose que de lignine (Puls *et al.*, 1985a).

Le principal inconvénient de cette technique demeure le coût élevé du solvant. La nécessité de recycler le solvant condamne économiquement l'utilisation de ce procédé pour fractionner la biomasse lignocellulosique (Ogier *et al.*, 1999).

I.4.2. Méthodes physico-chimiques

I.4.2.1. Traitements hydrothermiques

Les traitements hydrothermiques se réfèrent à l'utilisation de l'eau, sous son état de liquide ou de vapeur, et de la chaleur pour traiter la biomasse lignocellulosique (Laser *et al.*, 2002). Ces traitements sont désignés dans la littérature par les termes suivants: autohydrolyse (Lora et Wayman, 1978; Conner, 1984; Carrasco, 1989; Tortosa *et al.*, 1995), hydrothermolyse (Bonn *et al.*, 1983; Hörmeyer *et al.,* 1988; Kubikova et *al.*, 1996), extraction ou liquéfaction aqueuse (Heitz et *al.*, 1986; Saska et Ozer, 1995), aquasolv (Kubikova *et al.*, 1996), préhydrolyse à l'eau (Conner, 1984), et traitement à la vapeur ou extraction à la vapeur (Ramos *et al.*, 1992).

Certains auteurs classent ce type de traitement dans la catégorie des traitements physico-chimiques. D'autres ne le font pas du fait qu'il s'agit d'un traitement qui n'utilise pas de réactif chimique.

De nombreuses technologies basées sur les traitements hydrothermiques qui ont été utilisées pour le fractionnement de la biomasse lignocellulosique, possèdent toutes leurs antécédents dans les procédés thermomécaniques développés par les industries papetières (dans la fabrication des pulpes et de pâtes à papier) (Overend et Chornet, 1987). En effet, une pré-hydrolyse en phase aqueuse est utilisée dans le procédé Kraft (lors de la fabrication de pâte à papier de type chimique) pour éliminer toute l'hémicellulose et l'obtention de cellulose à haute pureté (Wenzl, 1970). Un traitement à la vapeur est aussi utilisé pour prétraiter les bois dans la plupart des procédés thermomécaniques pour la fabrication des pâtes à papier.

Les traitements à l'eau et à la vapeur semblent être les plus efficaces parmi les procédés thermomécaniques connus, permettant une hydrolyse sélective de l'hémicellulose et par conséquent de séparer la biomasse lignocellulosique en deux fractions : un extrait aqueux composé principalement des dérivés de l'hémicellulose avec une fraction de lignine soluble, et une pulpe solide composée de cellulose presque intacte et de résidu de lignine facilement extractible (Van Walsum *et al.*, 1996 ; Garrote *et al.*, 1999).

La pulpe solide peut subir d'autres traitements comme la délignification pour séparer cellullose et lignine (Biermann *et al.*, 1984 ; Lora et Wayman, 1978 ; Heitz *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 1989) ou une hydrolyse enzymatique de la cellulose (Biermann *et al.*, 1984 ; Poutanen et Puls, 1984 ; Miceli *et al.,* 1996 ; Ramos *et al.*, 1983; Weil *et al.*, 1997 ; Weil *et al.*, 1998).

Le procédé de traitement à la vapeur consiste à porter le végétal rapidement à haute température (180°C-240°C) par injection de vapeur sous pression. Quand l'arrêt du traitement

s'effectue par décompression brutale, il s'agit de l'explosion à la vapeur (Pourquié et Vandecasteele, 1993). Les temps de séjour varient de 10 secondes à quelques minutes, pour des pressions allant de 10 à 50 bars.

Quant au traitement en phase aqueuse, le procédé consiste en une simple cuisson à l'eau sous forte pression (qui fait maintenir l'eau sous son état liquide à température élevée), et le procédé fonctionne comme un simple autoclave (procédé discontinu).

I.4.2.1.1. Mécanisme de réaction de thermohydrolyse

La réaction se déroule à des températures qui peuvent varier de 150 à 230°C. A ces températures, la lignocellulose subit des réactions d'hydrolyse en présence des ions hydronium générés par l'autoionisation de l'eau et qui jouent le rôle de catalyseurs. Les liaisons éther hétérocycliques des hémicelluloses sont les liaisons les plus susceptibles à ce type de réaction conduisant à la fois à la génération des oligosaccharides solubles et à la libération de l'acide acétique par réaction de saponification des groupements acétyles présents dans la fraction hémicellulosique. A des stades plus avancés de la réaction des ions hydroniums sont également générés suite à l'autoionisation de l'acide acétique et qui catalysent à leur tour la dégradation des oligomères en monomères (xylose ou glucose).

Dans les conditions de thermohydrolyse généralement utilisées, la formation des ions hydronium à partir des acides acétiques est plus importante que celle à partir de l'eau (Heitz *et al.*, 1986 ; Carrasco, 1989), le rôle de l'autoionisation de l'eau est limité aux étapes initiales de réaction.

Les acides uroniques peuvent également être libérés et contribuer à la génération des ions hydronium, mais leurs effets ne sont pas bien établis (Garrote *et al.*, 1999).

On note que durant le traitement hydrothermique l'arabinose est facilement libéré de la chaîne de xylane.

Dans les conditions de cette réaction, les monomères libérés de xylose ou de glucose peuvent se déshydrater respectivement, en furfural et en hydroxymethylfurfural.

Les produits majeurs des réactions d'autohydrolyse dans les conditions de température et de pression les plus modérées, sont des xylooligosaccharides qui peuvent présenter une large distribution de poids moléculaires. Cette distribution dépend de la nature du substrat utilisé ainsi que des conditions opératoires. En effet, les traitements à sévérité croissante provoquent la diminution des degrés de polymérisation mais aussi l'augmentation de la dégradation des xylooligosaccharides en xylose.

Les fractions de la matière lignocellulosique autres que l'hémicellulose, peuvent également réagir en présence de l'eau. En effet, la cellulose et la lignine peuvent partiellement se dépolymériser par les mêmes réactions de thermohydrolyse. De plus, des réactions de condensation impliquant le furfural, la lignine et/ou des réactions intermédiaires ont été reportées (Lora et Wayman, 1978; Dekker et Wallis, 1983; Muzzy *et al.,* 1983; Aoyama *et al.*,1995). Carrasco *et al.* (1987) ont déterminé la génération de CO_2 à partir des acides uroniques suite à la décomposition des groupements carbonyle.

I.4.2.1.2. Conditions opérationnelles utilisées dans les traitements hydrothermiques

L'efficacité des traitements hydrothermiques dépend fortement de nombreux paramètres expérimentaux. Les paramètres qui semblent avoir le plus d'influence sont : la température et le temps de traitement, la concentration (exprimée en rapport liquide/solide) ainsi que la composition et certaines propriétés physico-chimiques des substrats utilisés.

Plusieurs conditions opérationnelles de traitements hydrothermiques ont été employées dans de nombreux travaux. Le tableau I.3 résume quelques conditions utilisées.

Dans les traitements hydrothermiques, les températures sont généralement comprises entre 150 et 230°C. Cet intervalle a été fixé d'une part, par la faible vitesse des réactions hydrolytiques observée aux alentours de 100°C (Abatzoglou *et al.*, 1992 ; Tortosa *et al.*, 1995) et d'autre part, par le fait que les réactions de dégradation de la cellulose commencent à être importantes à 210-220°C (Heitz *et al.*, 1986 ; Rubio *et al.*, 1994). Biermann *et al.*, (1984) ont reporté que la cellulose a été affectée de façon significative à 270°C, alors que Bonn *et al.*, (1983) ont employé les traitements hydrothermiques à 260-270°C pour la saccharification de la cellulose.

Le rapport liquide/solide, un paramètre opérationnel important et qui a varié d'une étude à une autre de 1 à 40 g/g avec une valeur très utilisée de 10 g/g (tableau I.3). Des variations modérées de ce rapport ont eu peu d'effet sur le procédé hydrothermique du matériel lignocellulosique (Lamptey *et al.*, 1985 ; Aoyama, 1996).

Le temps de réaction dans les traitements hydrothermiques reporté dans la littérature varie dans une large gamme allant de quelques secondes à haute température (Biermann *et al.*, 1984 ; Capek-Ménard *et al.*, 1987 ; Barnet *et al.*, 1989) jusqu'à plusieurs heures dans des conditions les plus modérées (Conner, 1984 ; Saska et Ozer, 1995).

Tableau I.3. *Conditions opérationnelles utilisées dans des traitements hydrothermiques des matériaux lignocellulosiques*

Substrat	Température (°C)	Temps (min)	Taille de particules	Ratio liquide/solide (g/g)	Référence
a) Bois					
Bois d'Eucalyptus	160	60	-	8	Kabel *et al.* (2002)
Eucalyptus	230	2	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
peuplier	230	4	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
peuplier	215-225	3-7	1 mm	-	Muzzy *et al.* (1983)
Populus tremoloides	180-230	0.7-4	20 mm	-	Heitz *et al.* (1991)
Populus tremoloides	220-245	0.42-1.47	20-40 mesh	7.1-10	Capek-Ménard *et al.* (1987)
Populus tremoloides	180-235	2	-	-	Bouchard *et al.* (1991)
Pin (Pinus silvestris)	210	4	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
Pin (Pinus pinaster)	190	8	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
Mélange de bois durs (chêne et gomme)	160-280	1	6 mm	-	Biermann *et al.* (1984)
Chêne	230	4	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
Mélange de bois	200-230	2.08-2.23	0.5 mm	20	Abatzoglou *et al.* (1990)
Tremble	187-240	0.5-5	2 mm	-	Kuznetsov *et al.* (1996)
b) Résidus d'agriculture					
Rafle de maïs	160	75	-	8	Kabel *et al.* (2002)
Rafle de maïs	216		8 mm	8	Garrote *et al.* (2001a)
Rafle de maïs	180-223	3-5	-	-	Ropars *et al.* (1992)
Feuille et tige de Maïs	120-190	15-120	35-200 mesh	2-10	Lamptey *et al.* (1985)
Enveloppe de graines de tournesol	200	5	1 mm	-	Dekker et Wallis (1983)
Bagasse de canne à sucre	185-208	20-29	-	4	Fontana *et al.* (1995)
Son de blé	155	60	-	10	Kabel *et al.* (2002)
Paille de blé	190	8	4 mm	10	Carrasco et al. (1994)
Drêches de brasserie	150	60	-	8	Kabel *et al.* (2002)
Drêches de brasserie	150	60	-	8	Kabel *et al.* (2002)
Pousse de vigne	190	8	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
Biomasse de chardon	210	2	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
Bagasse de sorgho à sucre	230	0.5	4 mm	10	Carrasco *et al.* (1994)
Coquille d'amande	180-200	1-68	60 mesh	3	Martinez *et al.* (1995)
Tige de maïs	190-230	10-20	0.5 mm	25	Tortosa *et al.* (1995)
Bagasse de canne à sucre	150-170	-	0.8 mm	5-10	Saska et Ozer (1995)
Paille de blé	120	15-300	60 mesh	38	Lawther *et al.* (1996)
Herbe de Bambou	169.6-206.2	10	0.5 mm	-	Aoyama (1996)
Paille de blé	205-230	2	-	-	Montané *et al.* (1997)
Coquille d'amande	180-240	12-25	60 mesh	14.3	Montané *et al.* (1994)

Le temps de chauffage dans les traitements réalisés à haute température, pourrait être plus long que le temps effectif de la réaction isothermique. Ceci pourrait conduire à une conversion substantielle de l'hémicellulose au cours de la mise en température (Carrasco et Roy, 1992). Le

tableau I.4 présente quelques données sur des exemples de temps de réaction et de temps de chauffage reportés dans la littérature.

En ce qui concerne les temps de refroidissement, pour lesquels la vitesse de refroidissement est supérieure à 30°C/min, très peu d'effets comparatifs ont été observés (Martínez *et al.*, 1995, 1997).

Tableau I.4. *Quelques données sur les conditions de chauffage utilisées dans les traitements hydrothermiques*

Vitesse de chauffage (°C/min)	*Temps de mise en température (min)*	*Temps de réaction d'autohydrolyse (min)*	*Température finale*	*Références*
-	7	5	200	Dekker et Wallis, 1983
-	0.67	1	105	Biermann *et al.*, 1984
-	2.2-3.5	5	200	Playne, 1984
-	10-12	15-20	120-190	Lamptey *et al.*, 1985
2-3	-	2	135	Carrasco *et al.*, 1987
-	1	10	169.6-206.2	Aoyama, 1996
-	20-29	20-29[a]	185-208[b]	Fontana *et al.*, 1995
5-9.7	-	1-68	180	Martínez *et al.*, 1995
8.8-10.3	-	3-44	200	Martínez *et al.*, 1995
-	15-30	-	150-170	Saska et Ozer, 1995
-	0.67	0.5-7	220	San Martin *et al.*, 1995
-	5	15-300	120	Lawther *et al.*, 1996
-	41-57	15	185-215	Anglès *et al.*, 1997
5.0-10.3	-	1-44	180-200	Martínez *et al.*, 1997

[a] opération non-isothermique
[b] température maximale

Un autre paramètre passé en revue dans quelques travaux, est la taille des particules de substrat. Dans les traitements en phase aqueuse, la réduction de la taille de la biomasse à traiter semble ne pas être nécessaire car la cuisson à l'eau à haute température aboutit à la destruction de la biomasse (Kohlman *et al.*, 1993 ; Weil *et al.*, 1997). En effet, Van Walsum *et al.* (1996) n'ont pas observé de différences entre des substrats de taille réduite ou non dans le taux de conversion de la bagasse, de la farine de bois dur et des copeaux de peuplier. Ce qui a permis aux auteurs de suggérer que les prétraitements à l'eau nécessitent moins la réduction de la taille des particules que d'autres comme, par exemple, les traitements à base d'acide.

Par ailleurs, une approche de la thermohydrolyse avec un contrôle de pH en utilisant l'hydroxyde de potassium a été proposée par Kohlmann *et al.* (1993) dans le but prévenir la chute du pH en dessous de 4 et/ou pour contrôler les réactions chimiques qui peuvent se produire au cours du traitement, en plus pour mieux favoriser l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Ces auteurs ont utilisé des temps de réaction compris entre 50 et 60 minutes et ont obtenu des rendements d'hydrolyse enzymatique de la cellulose proche du maximum.

Sasaki *et al.* (2003), dans le but de fractionner la bagasse de canne à sucre, ont montré que le traitement à des températures de 200-230°C permet un rendement de 60% de solubilisation de l'hémicellulose; au delà de 230°C le rendement n'est plus que 30%.

Laser *et al.*, (2002) ont comparé l'efficacité des traitements à la vapeur et à l'eau chaude pour la bioconversion de la bagasse de canne à sucre en éthanol. Les auteurs ont montré que le traitement à l'eau a permis une meilleure récupération de xylane. Une étude réalisée par Allen *et al.* (1996, 2001) sur le fractionnement de différentes biomasses notamment la bagasse. a montré qu'à une température entre 190 et 230°C, un traitement en phase aqueuse a permis la solubilisation de toute la fraction hémicellulosique alors que la cellulose est restée entièrement dans la phase solide, et la lignine n'a pas été complètement liquéfiée.

Dans le cas des rafles de maïs, l'autohydrolyse dans des conditions non isothermiques a permis de solubiliser jusqu'à 94% du xylane existant, alors que la cellulose a été retenue dans la phase solide et une délignification partielle a été achevée (jusqu'à 26%) (Garrote *et al.*, 2002).

Pour les drêches de brasserie, Carvalheiro *et al.* (2004), pour les températures (150, 170 et 190°C) et avec un rapport liquide/solide de 8 g/g, ont obtenu un maximum de xylo-oligosaccharides (61% du total de xylane) à 190°C après 5 minutes de réaction. Ce rendement est réduit par une prolongation du temps de traitement. La composition des hydrolysats obtenus était dépendante des conditions utilisées.

A titre indicatif la composition (en oligosaccharides et en sucres monomères) des hydrolysats des drêches obtenus dans les conditions du traitement hydrothermique étudiées, est donnée dans le tableau I.5.

Tableau I.5. *Composition (en g/L) des liqueurs obtenues par hydrolyse hydrothermique des drêches de brasserie à 150, 170 et 190°C (Carvalheiro et al., 2004)*

Temps (min)	pH	xylooligosaccharides	Xylose	arabinoe	glucose	Acide acétique	Acide formique	Acide levulinique	furfural	Hydroxy-méthylfurfural
150°C										
0	4.81	5.60	0.46	1.53	0.49	0.36	0.15	0.00	0.01	0.01
5	4.82	7.33	0.53	1.72	0.51	0.37	0.16	0.00	0.03	0.01
20	4.78	9.71	0.69	2.21	0.49	0.48	0.24	0.06	0.05	0.02
30	4.78	9.78	0.67	2.28	0.47	0.57	0.29	0.08	0.10	0.03
45	4.83	11.42	0.78	2.68	0.54	0.69	0.39	0.10	0.13	0.03
60	4.77	11.75	0.82	2.72	0.56	0.73	0.40	0.11	0.14	0.04
120	4.35	13.81	1.29	3.14	0.70	1.13	0.29	0.15	0.52	0.08
180	4.41	13.93	1.26	2.98	0.65	1.25	0.85	0.13	0.49	0.08
300	4.13	11.47	2.79	2.33	0.83	1.83	1.37	0.16	0.78	0.17
420	3.97	8.70	3.23	1.76	1.02	1.81	1.61	0.17	1.07	0.26
170°C										
0	4.74	11.08	1.04	2.55	0.60	0.44	0.06	0.04	0.16	0.06
5	4.69	12.61	1.17	2.91	0.60	0.49	0.06	0.04	0.24	0.06
10	4.61	13.42	1.45	3.19	0.67	0.62	0.10	0.05	0.35	0.10
20	4.3	14.33	1.75	3.21	0.76	0.98	0.15	0.04	0.66	0.15
30	4.13	13.94	2.17	3.11	0.93	1.22	0.19	0.04	0.74	0.19
45	3.95	9.54	3.49	2.30	1.02	1.4	0.30	0.06	0.91	0.30
60	3.9	7.7	3.69	1.93	1.05	1.55	0.35	0.06	0.95	0.35
190°C										
0	4.71	15.84	1.71	4.19	-	0.75	0.07	-	0.19	0.07
2.5	4.67	16.28	2.03	4.49	1.38	0.99	0.08	-	0.42	0.08
5	4.45	16.59	2.59	4.6	1.44	1.14	0.11	-	0.74	0.11
7.5	4.33	16.28	3.14	4.57	1.49	1.28	0.16	-	0.90	0.16
10	4.19	14.57	3.50	4.25	1.53	1.64	0.16	-	0.88	0.16
15	4.05	10.12	4.82	3.37	1.7	1.86	0.14	0.30	1.05	0.14
20	3.91	6.75	5.17	2.57	1.93	2.19	0.39	0.37	1.16	0.39

Le traitement par explosion à la vapeur a souvent été décrit comme une des méthodes les plus efficaces pour le fractionnement de la biomasse lignocellulosique (Saddler *et al.*, 1993 ; Eklund *et al.*, 1990; Mamers et Menz; 1984) du fait de sa simplicité de mise en oeuvre dans le cas d'un procédé batch, de l'absence de réactifs chimiques ajoutés et de son adaptation au traitement de particules de grandes tailles (copeaux). Cependant, le taux de solubilisation des hémicelluloses reste souvent inférieur à 60% du rendement théorique (Excoffier *et al.*, 1991 ; Heitz *et al.,* 1991; Jollez *et al.,* 1994; Montané *et al.*, 1993). En outre, les hémicelluloses, majoritairement hydrolysées sont sous forme de dimères ou d'oligomères, le sont peu sous forme de monomères. Quant aux rendements d'hydrolyse enzymatique de la cellulose, ils n'excèdent pas les 50% dans la plupart des cas.

L'efficacité du traitement par explosion à la vapeur peut être améliorée par l'ajout de l'acide, ce qui en général, permet une solubilisation plus complète des hémicelluloses (Morjanoff et Gray, 1987). Lorsque l'explosion à la vapeur est appliquée sur un substrat préalablement acidifié avec H_2SO_4, elle conduit à une solubilisation et une hydrolyse totale des hémicelluloses en leurs monomères (Ogier *et al.*, 1999). L'utilisation d'un catalyseur acide permet de diminuer la température du procédé (150 à 200°C contre 250°C pour l'explosion à la vapeur sans catalyseur) et ainsi de minimiser la formation de composés de dégradation.

Morjanoff et Gray (1987), en utilisant un procédé d'explosion à la vapeur catalysé par l'acide, ont pu déterminer les conditions optimales pour traiter la bagasse de canne à sucre qui sont : température de 220°C, temps de séjour de 30 s, rapport liquide/solide de 2, et 1% d'acide sulfurique. L'hydrolyse enzymatique du matériel prétraité a permis un rendement en sucre de 65.1 g/100 g de bagasse prétraitée. On note que l'explosion à la vapeur, opérant à des températures élevées peut conduire à des réactions de pyrolyse de la cellulose, et à la formation de composés inhibiteurs (Wright, 1988). Des temps de réaction courts et des températures faibles sont favorables à la récupération des pentoses, mais le taux d'hydrolyse enzymatique de la cellulose reste toujours faible (Brownell et Saddler, 1984). Les pertes de matières sèches au cours du procédé peuvent avoir lieu et de façon importante qui, en fonction des conditions opératoires, peuvent aller de 10 à 30 % de la matière sèche initiale. Puls *et al.*, (1985a) ont comparé le traitement à la vapeur et le procédé Organosolv (utilisant un mélange éthylène glycol/eau) pour la production de la cellulose à partir de la paille de blé. Les auteurs ont montré que l'extraction à la vapeur produit une cellulose riche en lignine et à faible taux d'hémicellulose qui est plus sensible aux traitements enzymatiques.

I.4.2.1.3. Composition chimique des matériaux lignocellulosiques les plus favorables pour les traitements hydrothermiques

Traditionnellement l'autohydrolyse a été appliquée aux bois durs et aux sous-produits agricoles, dans lesquels les hémicelluloses sont principalement constituées de xylanes.

Les bois durs sont plus favorables que les bois tendres pour un traitement hydrothermique, à cause de leur teneur plus élevée en groupements acétyle ce qui favorise des concentrations en catalyseur plus élevées dans le milieu réactionnel. Les bois tendres sont moins susceptibles de se solubiliser dans ce genre de traitement pour des raisons par très bien comprises (Mosier *et al.*, 2005). En effet, les traitements à l'eau des bois durs ont été considérés par de nombreux auteurs alors que peu d'informations existent sur l'application de ce traitement sur les bois tendres.

Plusieurs résidus lignocellulosiques de l'agriculture ont été soumis à des traitements hydrothermiques à cause de leurs concentrations en hémicelluloses et en groupements acétyle favorables. A titre comparatif, les tableaux I.6 et I.7 donnent la composition (en polymères et en monomères) de bois et de résidus d'agriculture sélectionnés.

Mok et Antal (1992) ont testé dix substrats (ligneux et herbacés) avec ce procédé de thermohydrolyse (15 minutes à 200-230°C) et dans tous les cas, les hémicelluloses étaient entièrement solubilisées, et l'hydrolyse enzymatique de la cellulose aboutissait à des rendements en sucres monomères de l'ordre de 95%.

De nombreux travaux utilisant le traitement hydrothermique ont été réalisés dans le but de produire des xylooligosaccharides. Plusieurs sous-produits agricoles riches en xylane tels que le son de blé, les drêches de brasserie, les rafles de maïs, le bois d'*Eucalyptus* (Kabel *et al.*, 2002) et également les enveloppes des grains de riz et d'orge (Parajó *et al.*, 2004), ont été l'objet d'un traitement hydrothermique modéré pour la dégradation du xylane.

Nabarlatz *et al.* (2007) ont étudié la production de xylooligosaccharides à partir des sous produits agricoles (rafle de maïs, noyaux d'olives, coques d'amande, enveloppe de riz, paille de blé et paille d'orge) et ont obtenu un rendement maximal de 60% avec les rafles de maïs et 55% avec les coques d'amandes (tableau I.8). Les auteurs, en comparant les hydrolysats obtenus ont montré que ce sont les caractéristiques du substrat qui déterminent le rendement et la composition des xylooligosaccharides obtenus. Les rendements étaient proportionnels à la teneur en groupements acétyles dont le clivage permet de libérer des acides acétiques catalyseurs de l'hydrolyse.

Tableau I.6. *Composition en cellulose, hémicellulose et lignine (en % de la masse sèche de biomasse) des différents matériaux lignocellulosiques*

Matière végétale	*Cellulose*	*Hémicellulose*	*Lignine*	*Références*
a/ les bois durs				
White birch	41.0	36.2	18.9	Holtzapple (1993a)
Poplar/aspen	50.8-53.3	26.2-28.7	15.5-16.3	Holtzapple (1993a); Schaffeld (1994a)
Red maple	44.1	29.2	24.0	Holtzapple (1993a)
Hybrid poplar	41.7	20.2	29.3	Torget et Tsu (1994)
Eucaluptus viminalis	41.7	14.2	31.0	Ramos *et al.* (1992)
Eucalyptus globulus	42.3-54.0	16-36.6	17.9-23.3	Parajó *et al.* (1993) ; Pereira (1988) ; Schaffeld (1994a); Vázquez *et al.* (1991)
Populus deltoides	46	19	24	Fan *et al.* (1987)
Populus tremoloides	48	23	17	Fan *et al.* (1987)
Chêne	40.4	35.9	24.1	Schaffeld (1994a)
Chêne rouge	38.9	23.8	21.5	Conner (1984)
b/ les bois tendres				
Pinus banksiana	41.6	25.6	28.6	Holtzapple (1993a)
Pinus banksiana	41	13	27	Fan *et al.* (1987)
Pinus pinaster	42.9	17.6	30.2	Parajó *et al.* (1993)
Pinus radiata	42-50	24-27	20	Schaffeld (1994a)
sapin	43.9	26.5	28.4	Schaffeld (1994a)
Sapin blanc	44	11	27	Fan *et al.* (1987)
Sapin rouge	43	12	27	Fan *et al.* (1987)
c/résidus d'agriculture				
Rafles de maïs	33.7-41.2	31.9-36	6.1-15.9	Ropars *et al.* (1992) ; Schaffeld (1994a)
Bagasse de canne à sucre	35-41.3	27-37.5	10-20	Playne (1984) ; Schaffeld (1994a); Sasaki *et al.*, 2003)
Paille de blé	32.9-50	24-35.5	8.9-17.3	Blanch et Wilke (1983) ; Bjerre *et al.* (1996), Carrasco *et al.* (1994) ; Fan *et al.* (1987) ; Jiménez et López (1993) ; Ranganathan *et al.* (1985), Schaffeld (1994a)
Paille de riz	36.2-47	19-24.5	9.9-24	Blanch et Wilke (1983) ; Fan *et al.* (1987) ; Patel et Bhatt (1992)
Tiges de maïs	35-39.6	16.8-35	7-18.4	Barrier *et al.* (1985) ; Blanch et Wilke (1983) ; Lamptey *et al.*, 1985
Paille d'orge	33.8-37.5	21.9-24.7	13.8-14.5	Blanch et Wilke (1983) ; Fan *et al.* (1987)
Paille de seigle	37.6	30.5	19.0	Fan *et al.* (1987)
Paille d'avoine	39.4	27.1	17.5	Fan *et al.* (1987)
Lin	34.9	23.6	22.3	Fan *et al.* (1987)
Rafle de soja	34.5	24.8	19.8	Fan *et al.* (1987)
Tiges de tournesol	38.1-42.1	19.5-29.6	11.0-13.4	Jiménez et López (1993) ; Jiménez *et al.* (1996)
Pousses de vigne	35.6-38.3	20.6-35.0	22.8-23.4	Jiménez et López (1993) ; Jiménez *et al.* (1996)
Tiges de coton	38.4-42.6	20.9-34.4	21.45	Jiménez et López (1993) ; Jiménez *et al.* (1996)
Enveloppe de graine de tournesol	24.1	28.6	29.4	Dekker et Wallis (1983)
Chardon	31.1	12.2	22.1	Jiménez et López (1993)

Tableau I.7. *Composition en sucres monomères de différents matériaux lignocellulosiques (en % de la masse sèche de l'échantillon)*

Matière première		Arabinose	galactose	mannose	Sucres hémicellulosiques	référence
a) Bois tendre						
Sapin baumier	4.8	0.5	1	12.4	18.7	Holtzapple (1993b)
sapin	7.2	0.9	1.2	9.8	19.1	Schaffeld (1994b)
Pinus banksiana	7.1-7.4	1.9-1.8	1.4-2.2	9.4-10.6	20.5-20.8	Holtzapple (1993b); Eberhardt et young (1996)
Pinus radiata	6.2	2.1	3.3	9.5	21.1	Schaffeld (1994a)
Pinus resinosa	7.9	2.0	2.0	10.7	22.6	Eberhardt and young (1996)
Pinus taeda	6.5	1.5	2.4	10.5	20.9	Eberhardt and young (1996)
Epinette blanche	6.8	1.6	1.2	11.6	21.2	Holtzapple (1993b)
a) Bois dur						
Eucalyptus	12.0-21.5	0.8-1.8	1.3-2.5	0.7-1.2	15.3-27.0	David *et al.* (1988) ; Schaffeld, (1994a)
Peuplier hybride	14.8-15.6	0.5-1.2	1.0	2.8-3.0	19.1-20.8	Torget et Tsu (1994)
Chêne	21.7	1.6	2.1	2.4	27.8	Schaffeld (1994a)
peuplier	16.0-17.3	0.4-2.0	0.0-0.8	2.2-2.3	19.5-21.5	Holtzapple (1993b)
Erable rouge	17.3	0.5	0.6	3.5	21.9	Holtzapple (1993b)
Bouleau blanc	24.6	0.5	0.6	1.5	27.2	Holtzapple (1993b)
c) résidu d'agriculture						
Herbe de bambou	21.6	2.9	-	0.40	24.9	Aoyama *et al.* (1995)
Paille d'orge	15.00	4.00	1.71	1.26	21.97	Blanch et wilke (1983)
Rafle de maïs	29.1	2.8	0.0	0.00	31.9	Ropars *et al.* (1992)
Tige de maïs	13.00-21.1	2.80-3.7	0.75-0.8	0-0.25	16.8-26.7	Blanch et wilke (1983)
Envoloppe de grain de riz	12.3	2.6	0.1	2.7	17.7	Blanch et wilke (1983)
Paille de riz	13.0	4.0	0.4	1.6	19.0	Blanch et wilke (1983)
Paille de sorgho	15.0	3.0	0.2	0.8	19.0	Blanch et wilke (1983)
Paille de blé	21.5	2.7	-	0	24.2	Blanch et wilke (1983) ; Schaffeld, (1994a)
Bagasse de canne à sucre	16.9-18.5	2.1-1.6	0.72-16	0-0.72	20.8-21.88	Blanch et wilke (1983) ; Schaffeld, (1994a)

Tableau I.8. *Taux de récupération des xylooligosaccharides à partir de différents substrats lignocellulosiques obtenus dans les mêmes conditions opératoires (Nabarlatz et al., 2007)*

Substrat	***Rapport liquide/solide (g/g)***	***Température (°C)***	***Temps (min)***	***Rendement (%)***
Rafles de maïs	8	179	23	60
Coques d'amande	8	179	23	55
Noyaux d'olives	8	179	23	43
Enveloppe de grain de riz	8	179	23	30
Paille de blé	8	179	23	43
Paille d'orge	8	179	23	43

Les mêmes auteurs ont signalé l'effet de la densité du substrat qui semble jouer un rôle important dans le procédé d'autohydrolyse, comme c'est le cas pour les coques d'amandes et les

noyaux d'olives qui possèdent des parois cellulaires denses et très lignifiées ce qui limite la libération de produit de dégradation de lignine et la formation de glucooligosaccharides durant l'autohydrolyse, permettant ainsi de produire des xylooligosaccharides plus purs. De plus, la haute densité de substrat comme les coques d'amandes permet de traiter des suspensions de solides à densité moyenne (15 à 20% de solides) durant l'autohydrolyse, ce qui permet d'obtenir des hydrolysats plus concentrés.

Sur le plan théorique, un autre facteur a été considéré et qui a été invoqué pour expliquer la composition et la nature ainsi que le rendement des produits de l'autohydrolyse. Il s'agit de l'existence au niveau des xylanes de deux fractions différentes en composition et en réactivité vis à vis de l'autohydrolyse. La fraction qui contient le plus d'arabinose et de groupements acétyles est celle qui est la plus réactive et se dépolymérise le plus rapidement.

I.4.2.1.4. Procédés industriels basés sur les traitements hydrothermiques

La technologie basée sur le contact direct entre les matériaux lignocellulosiques et la vapeur d'eau saturée, notamment l'explosion à la vapeur, est beaucoup plus connue que les systèmes en phase aqueuse car elle a été utilisée pendant des décades au niveau industriel dans l'industrie papetière.

La technique d'explosion à la vapeur a été appliquée à l'échelle industrielle (Montané, 1998). Cette technique a été mise en œuvre soit en discontinu (procédé Iotech issu du procédé papetier Massonite), soit en continu (Stake II).

D'une manière générale, il existe deux conceptions de technologies particulières qui ont été testées à l'échelle industrielle. La première est un procédé discontinu (« batch ») appelé « Masonite Gun », ce procédé est basé sur un digesteur batch, dans lequel des vapeurs saturées sont introduites sous une pression allant jusqu'à 64 bars. Les conditions typiques de ce procédé sont des températures allant de 180°C à 260°C et le temps de traitement à la vapeur est de 2 à 15 minutes selon la biomasse à traiter.

Le second procédé repose sur le même principe que le premier, appelé réacteur « Stake » qui consiste en une unité continue et qui est disponible dans l'industrie pour traiter à la vapeur la biomasse lignocellulosique. Il s'agit d'une modification du procédé « Masonite » permettant une opération en continu.

La technologie Stake II a été appliquée par Heitz *et al.* (1991) pour prétraiter à la vapeur le bois de *Populus tremuloides* à l'échelle pilote, afin de récupérer les hémicelluloses et la lignine et

pour préparer la cellulose pour un traitement enzymatique ultérieur. Les auteurs ont pu récupérer 65% de la totalité des hémicelluloses et 80% de la lignine. Le même protocole a été appliqué à la bagasse de canne à sucre et a permis de séparer 62% de l'hémicellulose totale et 72% de la lignine totale.

L'hydrolyse rapide à la vapeur/extraction continue (Rapid Steam Hydrolysis/Continous Extraction (RASH)) utilise également l'explosion à la vapeur, mais les produits solubles de réaction sont drainés du réacteur de façon continue afin de minimiser les réactions de dégradation (Biermann *et al.*, 1984 ; Schultz *et al.*, 1984). Les conditions opérationnelles ordinaires sont des températures entre 160-260°C et des temps de réaction d'environ 1 minute.

Le procédé « Iotech » utilise également un réacteur batch avec explosion à la vapeur, mais le résidu solide est traité par des solvants organiques pour libérer jusqu'à 90% de la lignine initiale (Rijkens, 1984 ; Marchessault *et al.*, 1983).

Le « Siropulper » est similaire au procédé Iotech sauf que, un gaz inerte non condensable est introduit dans le digesteur pour augmenter la pression totale jusqu'à 70 bars à des températures modérées (Wallis et Wearne, 1985 ; Schaffeld, 1994b). Les résidus solides obtenus sont favorables à une décoloration et la lignine peut être extraite par des solvants organiques ou par des solutions alcalines.

Quant au traitement à l'eau chaude, il a été initialement développé par l'équipe de Bobleter en Autriche (Bobleter *et al.*, 1989), puis expérimenté par Bouchard *et al.* (1990 et 1991) et Walch *et al.* (1992). Cependant, cette méthode n'a été testée sur pilote industriel que par Bobleter *et al.*, (1989) qui ont travaillé avec un réacteur batch de 50 L. Son intérêt économique n'a donc pas encore été validé.

Il existe trois configurations de réacteurs pour un traitement en phase liquide: co-courant, contre-courant et en écoulement continu (figure I.19).

Dans les prétraitements en co-courant (figure I.19-a), la boue de biomasse/eau est chauffée à une température entre 140-180°C et le temps de séjour est de 15-20 min. Les fibres prétraitées sont dépourvues d'amidon et la cellulose est complètement digestible par hydrolyse enzymatique.

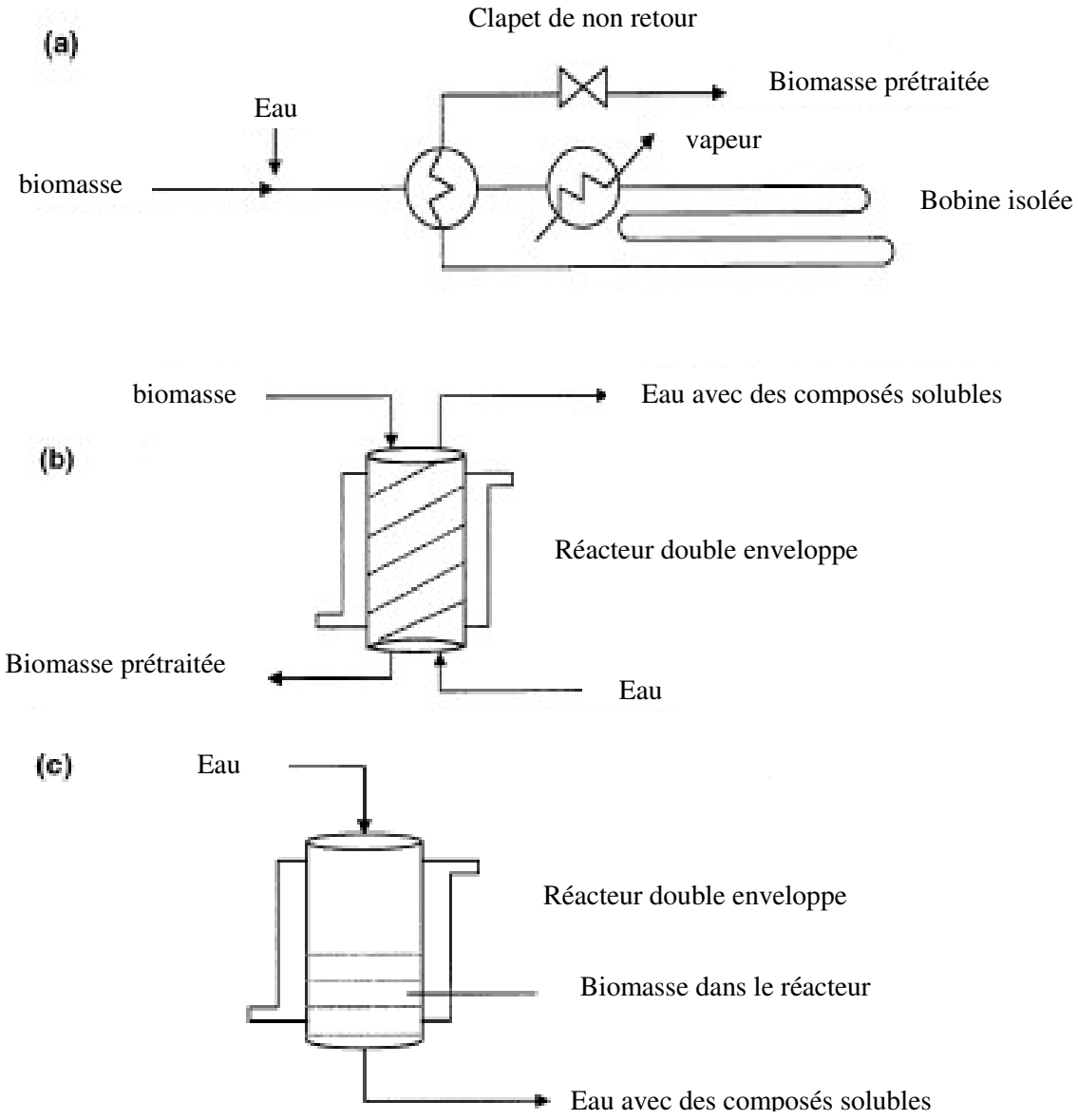


Figure I.19. *Représentation schématique de trois configurations de réacteurs pour traitement hydrothermique en phase aqueuse : co-courant (a), contre-courant (b) et en écoulement continu (c)*

Ce procédé est utilisé dans l'industrie de l'éthanol pour prétraiter les fibres de maïs (Mosier *et al.*, 2005). La configuration contre-courant (figure I.19-b) est conçue pour faire mobiliser l'eau et la biomasse en sens opposé tout au long du réacteur.

Dans le réacteur en écoulement continu (figure I.19-c), l'eau chaude (température 180-220°C et pression 350-400 psig) traverse un lit fixe de matériau lignocellulosique pour hydrolyser et dissoudre les composés lignocellulosiques avant de les transporter jusqu'en dehors du réacteur. Le rendement de conversion est de 96% mais dans ce type de configuration le rendement de récupération des sucres hémicellulosiques est faible (0.6-5.8 g/l). Les solides récupérés possèdent une meilleure susceptibilité aux hydrolyses enzymatiques et une partie significative de lignine est solubilisée.

I.4.2.2. Prétraitement AFEX (explosion à l'ammoniaque)

Le procédé AFEX (Ammonia Fiber/Freeze Explosion), consiste en un traitement de la matière lignocellulosique avec de l'ammoniaque liquide sous pression modérée (15 bar), suivi d'une décompression brutale dans le but d'évaporer l'ammoniac et d'exploser le substrat. Cette technique est une variante de l'explosion à la vapeur, mais utilise des conditions de température nettement plus faible grâce à l'emploi de l'ammoniac. Dans le procédé AFEX typique, la concentration de l'ammoniac est de 1-2 kg ammoniac/kg de biomasse sèche, la température est de 90°C et le temps de séjour est de 30 min.

Une variété de matières lignocellulosiques a été traitée par ce procédé. Ce sont surtout des substrats agricoles : luzerne, paille de blé (Mes-Hartree *et al.,* 1988), paille d'orge, tiges de maïs, paille de riz (Vlasenko *et al.*, 1997), ou des résidus ménagers, des déchets de papier (Holtzapple *et al.*, 1992), des herbes de Bermuda, des herbes de *Panicum virgatum* (Reshamwala *et al.*, 1995), des copeaux de peuplier (Tengerdy et Nagy, 1988) et la bagasse de canne à sucre (Holtzapple *et al.*, 1990).

Comparé au traitement acide et à l'explosion à la vapeur catalysée par l'acide, le traitement AFEX ne solubilise pas de façon significative la fraction hémicellulosique (Mes-Hartree *et al.*, 1988 ; Vlasenko *et al.*, 1997). Mes-Hartree *et al.* (1988) ont comparé les traitements à la vapeur et à l'ammoniac pour l'hydrolyse enzymatique de bois de peuplier, de paille de blé et de tige de luzerne. Les auteurs ont montré que le traitement AFEX n'a pas permis la solubilisation de l'hémicellulose.

L'hydrolyse de 90% de cellulose et d'hémicellulose a été obtenue après prétraitement AFEX de l'herbe de Bermuda (5% de lignine) et de bagasse (15% de lignine) (Holtzapple *et al.*, 1991). Cependant, ce type de traitement était inefficace sur des substrats ligneux (McMillan, 1994), et les rendements d'hydrolyse de l'hémicellulose étaient généralement faibles. Les rendements

d'hydrolyse enzymatique de la cellulose n'ont pas dépassé 50% du rendement théorique sur des copeaux de bois de peuplier (25% de lignine) (Ogier *et al.*, 1999), ou 40% sur des substrats provenant de déchets de papier (Holtzapple *et al.*, 1990).

De façon générale, les résidus herbacés et d'agriculture sont les plus convenables pour l'AFEX. Cette méthode n'est pas très efficace pour les bois durs et n'est pas attractive pour les bois tendres (McMillan, 1994).

Les inconvénients de cette technique sont liés aux concentrations élevées en ammoniac, avec nécessité de recycler plusieurs fois par compression, et les pertes non négligeables d'ammoniac qui sont préjudiciables sur le plan économique (Schell *et al.*, 1991). De plus l'ammoniac est un produit très dangereux et les installations devront être parfaitement étanches afin d'éviter les fuites.

I.4.2.3. Explosion au CO_2

L'explosion au CO_2 a été utilisée comme l'explosion à la vapeur et à celle à l'ammoniac pour prétraiter des matériaux lignocellulosiques. Il a été suggéré que le CO_2 pourrait contribuer à la formation de l'acide carbonique améliorant ainsi les taux d'hydrolyse. Dale et Moreira (1982) ont utilisé cette technique pour prétraiter la luzerne (5,58 MPa de pression, et en présence de 4g de CO_2/g de fibre). Après 24 h d'hydrolyse enzymatique, 75% de rendement théorique a été atteint.

Comparativement au traitement par explosion à la vapeur et à l'ammoniac, les rendements sont relativement faibles, mais sont supérieurs à ceux obtenus par hydrolyse enzymatique sans prétraitement. Zheng *et al.* (1998) ont comparé l'explosion au CO_2 et l'explosion à la vapeur et à l'ammoniac pour traiter un mélange de papier recyclé, de bagasse de canne à sucre et déchets de repulpage de papier recyclé, et ont montré que l'explosion au CO_2 était plus efficace que l'explosion à l'ammonium et ne libère pas de composés inhibiteurs qui pourraient se former par explosion à la vapeur. Cependant, cette technique n'a jamais connu de développement (Ogier *et al.*, 1999).

I.4.3. Hydrolyse enzymatique

Les principales enzymes capables de dégrader les hémicelluloses sont des hydrolases appelées enzymes hémicellulolytiques ou hémicellulases. Dans le cas des xylanes, ceux sont les xylanases.

En raison de la complexité structurale des xylanes, leur dégradation complète implique tout un système xylanolytique comprenant une variété d'enzymes dont les unes hydrolysent la chaîne principale et les autres clivent les liaisons entre les substituants et les résidus xylose de la chaîne principale (Coughlan *et al.*, 1993 ; Puls et Schuseil, 1993) (Figure I.20).

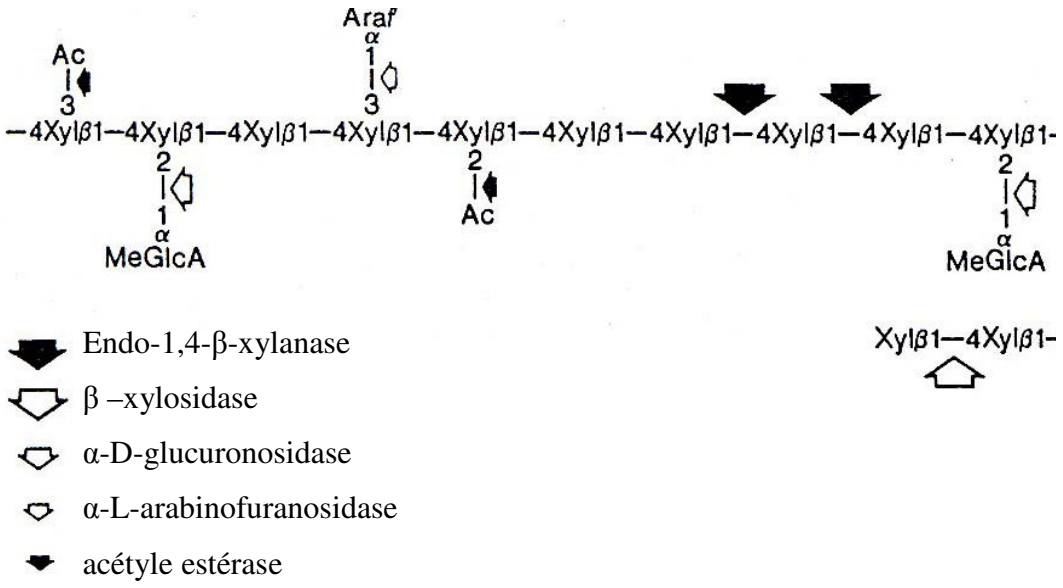


Figure I.20. *Fragment d'hétéroxylane hypothétique et des sites d'attaque possibles par des enzymes xylanolytiques (Ac : groupement acétyl ; Araf : L-arabinofuranose ; MeGlc A : acide 4-O-méthyl-D-glucuronique ; Xyl : D-xylose) (Biely, 1993)*

I.4.3.1. Les enzymes de dégradation de la chaîne principale des xylanes

I.4.3.1.1. Les endo-β-1,4-xylanases (EC 3.2.1.8)

Les endoxylanases sont des enzymes qui dégradent les liaisons glycosidiques β-(1,4) internes entre deux résidus xyloses de la chaîne principale des xylanes.

- ***Origine***

Les endoxylanases peuvent d'être d'origine fongique ou bactérienne. Les endoxylanases d'origine fongique sont les mieux étudiées et caractérisées, parmi lesquelles celles d'*Aspergillus niger* (Poutanen, 1988) et de *Trichoderma* (Biely, 1985 ; Hrmova *et al.*, 1986 ; Wong *et al.*, 1986 ;

Wood et Mc Crae, 1986). Des endo-β-1,4-xylanases bactériennes ont été également isolées et caractérisées notamment celles du genre *Bacillus* (Panbangred *et al.*, 1983 ; Debeire-Gosselin *et al.*, 1992). Des xylanases extracellulaires peuvent être produites par des levures, telles que les xylanases de *Cryptococcus* qui ont été étudiées notamment par Biely *et al.* (1980).

- ***classification***

Les endoxylanases peuvent être classées en différentes catégories selon un certain nombre de critères, notamment leur structure protéique (structure primaire), leur spécificité vis à vis du substrat (vis à vis de la chaîne principale ou des substituants) et la nature des produits d'hydrolyse qu'elles libèrent.

Spécificité vis à vis de la chaîne principale : Certaines xylanases peuvent être bifonctionnelles et avoir une activité secondaire endoglucanasique en plus de leur activité xylanasique principale. Cependant, la majorité des endoxylanases sont à spécificité restrictive et ne peuvent agir que sur les xylanes.

Spécificité vis à vis des substituants : Les endoxylanases coupent au hasard les chaînes de xylanes non substituées. Lorsqu'une substitution (arabinose ou acide glucuronique) est présente sur les chaînes de xylane, elles peuvent agir de deux manières:

- certaines clivent la liaison glycosidique à proximité d'un résidu de xylose substitué, ce sont les endoxylanases de la famille 10, (Biely *et al.*, 1997).
- d'autres, coupent la liaison glycosidique entre deux résidus adjacents non substitués (les endoxylanases de la famille 11) (Biely *et al.*, 1997).

Par ailleurs, selon la capacité de libérer un résidu arabinose, on distingue les xylanases, dites débranchantes, qui sont capables de libérer l'arabinose en plus de leur activité catalytique sur la chaîne principale de xylane. Les endoxylanases sont dites non débranchantes quand elles ne libèrent pas l'arabinose.

Produits d'hydrolyse : Les sites de coupures des endoxylanases dépendent de la longueur et du niveau de substitution du substrat (Reilly, 1981). Leur action sur la chaîne de xylane induit une diminution du degré de polymérisation du polymère en libérant des xylooligosaccharides ayant des degrés de polymérisation et de substitution variables.

Parmi les xylooligosaccharides non substitués libérés, le xylobiose et le xylotriose sont majoritaires. Certaines endoxylanases sont capables de libérer le xylose sous forme monomérique

(*Aspergillus niger* (John *et al.*, 1979), *Talaromyces byssochlamydoides* (Yoshioka *et al.*, 1981). Les travaux de Kanda *et al.*, (1985) ont montré que le xylose libéré proviendrait de l'action de l'endoxylanase sur les xylooligosaccharides libérés après dégradation des xylanes et non pas directement à partir du xylane. Certains auteurs (Panbangred *et al.*, 1983 ; Beldman *et al.*, 1989 ; Debeire *et al.*, 1990) ont attribué la formation du xylose à des réactions de transglycosylation.

- ***Réaction catalytique***

Les xylanases comme toutes les glycanases et les glycosidases catalysent des hydrolyses stéréosélectives selon un mécanisme acide/base impliquant deux résidus catalytiques. Le premier résidu protone l'oxygène de la liaison glycosidique (acide-base) et le second résidu agit en tant que nucléophile. Ces résidus ont été trouvés localisés à l'opposé l'un de l'autre dans le site actif de certaines enzymes (Wakarchuk *et al.*, 1994).

La réaction d'hydrolyse peut se faire par simple déplacement ou par réaction double déplacement. Dans le premier cas, la réaction est suivie d'une inversion de la configuration du carbone anomérique et dans le cas du double déplacement la configuration reste conservée.

La plupart des xylanases agissent selon un mécanisme de double déplacement. Ce mécanisme implique l'attaque nuléophile (don d'un H^+) par un résidu Glu ou Asp non ionisé, sur le carbone C-1 d'un sucre réducteur (Figure I.21a). Le fragment glycosyl résultant diffuse ensuite loin du centre actif (figure I.21b). L'ion oxocarbonium intermédiaire qui est le fragment résiduel est stabilisé par des interactions covalentes avec le résidu Glu ou Asp ionisé (figure I.21c).
La réaction est par la suite continuée par l'addition d'un groupement hydroxyle, à partir d'une molécule d'eau, sur l'ion carbonium et d'un proton sur le nucléophile (figure I.21d).

Dans le cas du mécanise d'hydrolyse par simple déplacement, un acide (Glu ou Asp non ionisé) et une base (Glu ou Asp ionisé) sont impliqués dans la catalyse avec l'attaque d'une molécule nucléophile d'H_2O (Figure I.22) (Mc Cleary et Matheson, 1983).

On note que d'autres résidus tels que le tryptophane, proline et thréonine ont été trouvés dans le site actif de certaines xylanases, leur rôle a été probablement associé à la fixation du substrat.

La présence de résidu cystéine au niveau du site actif de certaines xylanases bactériennes a été également démontrée (Keskar *et al.*, 1989), et on lui a contribué un rôle important dans la conformation de la protéine enzymatique. Ce rôle est déterminant de l'activité xylanolytique, en effet, la modification de ce résidu entraine la perte de cette activité.

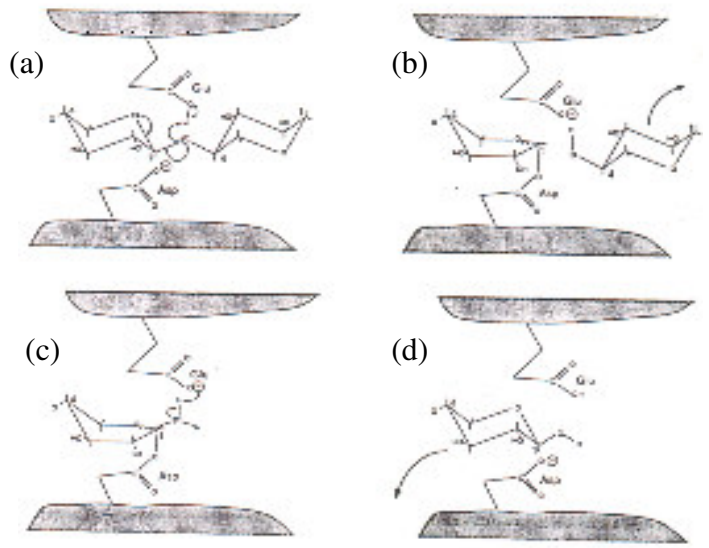


Figure I.21. *Représentation schématique du mécanisme de l'hydrolyse de xylane par réaction double déplacement (Coughlan et al., 1993)*

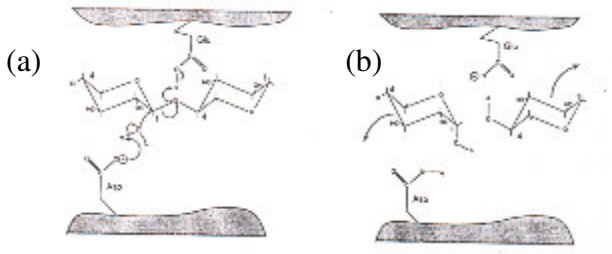


Figure I.22. *Représentation schématique du mécanisme de l'hydrolyse de xylane par réaction simple déplacement (Coughlan et al., 1993)*

I.4.3.1.2. Les β-xylosidases (EC 3.2.1.37)

Les β-xylosidases sont des exoglycosidases qui hydrolysent les xylooligosaccharides de faible degré de polymérisation à partir de leur extrémité réductrice. Le meilleur substrat de ces enzymes étant le xylobiose. L'affinité au substrat diminue avec l'augmentation de la longueur de chaîne des xylooligosaccharides (Van Doorslaer *et al.*, 1985). De manière générale, les polymères de xylanes ne sont pas attaqués par les β-xylosidases. Cependant de rares exemples montrent la

capacité de certaines β-xylosidases à libérer très lentement du xylose à partir du xylane (Dekker et Richards, 1976).

La plupart des β-xylosidases n'étant pas capables d'agir sur les polymères de xylanes, l'action des β-xylosidases nécessite l'action préliminaire d'une endo-β-1,4-xylanase. En effet, l'action combinée de β-xylosidase et d'endo-β-1,4-xylanase pourrait aboutir à la bioconversion totale du xylane (Benamrouche-Stitou, 2002).

I.4.3.2. Les enzymes de dégradation de la chaîne latérale

Les hétéroxylanes sont des polysaccharides complexes présentant une chaîne principale de xylose ramifiée par différents substituants. Afin d'obtenir une dégradation complète du polymère, l'action concertée de différentes enzymes est nécessaire. En effet, l'action préalable d'enzymes hydrolytiques débranchantes favorise la création de nouveaux sites d'action nécessaires aux endoxylanases afin de terminer la dégradation d'arabinoxylanes fortement branchés.

I.4.3.2.1. Les α-L-arabinofuranosidases (EC 3.2.2.55)

Les α-L-arabinofuranosidases sont des exo-enzymes capables d'hydrolyser les groupements α-L-arabinofuranosyl de la chaîne latérale des arabinanes, des arabinogalactanes et des arabinoxylanes (Kaji, 1984). Elles agissent principalement sur des oligosaccharides de faible degré de polymérisation et rarement sur des polymères (Poutanen *et al.*, 1988).

Greve *et al.* (1984) ont montré que l'arabinose pourrait limiter la dégradation des arabinoxylanes par les endoxylanases. L'action de l'arabinofuranosidase est indispensable à l'obtention de l'hydrolyse complète de la chaîne principale de xylose.

I.4.3.2.2. Les α-D-glucuronosidases (EC 3.2.1.139)

Les α-D-glucuronosidases sont aussi des exo-enzymes capables de cliver les liaisons entre l'acide glucuronique (ou son dérivé 4-O-méthyle) et le résidu xylose des xylanes. Elles agissent principalement sur des glucuronoxylo-oligomères de faible degré de polymérisation. Cependant, certaines α-D-glucuronosidases peuvent à partir de glucuronoxylanes, libérer de l'acide 4-O-méthylglucuronique (Johnson *et al.*, 1989).

Il est à noter que l'endoxylanase peut agir en synergie avec l'α-glucuronosidase en libérant des xylooligosaccharides acides, qui deviennent par la suite un substrat de l'α-glucuronosidase (Biely, 1985).

I.4.3.2.3. Les acétyles estérases (EC 3.1.16)

Les acétyles estérases libèrent les groupements acétyles liés en position C-2 ou C-3 à des résidus xyloses. Certaines acétyles estérases nécessitent l'action préalable des endoxylanases afin d'assurer une pré-solubilisation du substrat. L'endoxylanase agit au niveau des régions faiblement acétylées, permettant la libération des xylooligosaccharides acétylés qui constituent par la suite le substrat de l'acétyle estérase. Blum *et al.* (1999), ont montré que l'action combinée d'une endoxylanase et d'une acétyle estérase permet d'augmenter d'un facteur trois le taux de libération de groupements acétyles à partir du xylane de bouleau.

I.4.3.3. Mécanisme de l'hydrolyse enzymatique des hémicelluloses

Comme la plupart des polysaccharides hydrolases, les hémicellulases agissent au niveau de leurs substrats selon deux modes d'action : exo et endohydrolytique (Popa, 1998). Une exoenzyme dégrade les polyosides par séparation successive des unités mono- ou oligosaccharidiques. Généralement, la coupure se produit progressivement à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne de polysaccharide. Les endoenzymes agissent de façon aléatoire induisant une hydrolyse multiple qui s'accompagne d'une réduction prononcée du degré de polymérisation du substrat. Le polymère est donc dégradé progressivement en courtes chaînes jusqu'aux produits finaux qui ne peuvent plus se dégrader (généralement des mono ou disaccharides).

Un exemple de mécanisme d'action des enzymes fongiques sur des hémicelluloses est donné dans la figure I.23, incluant les étapes suivantes :

- L'attaque des exoglycosidases se produit avant celle des hémicellulases permettant de débrancher les chaînes de glycanes ce qui leur rend plus accessibles par les endo-xylanases dont l'action sera facilitée par la réduction de l'encombrement stérique des chaînes latérales.
- Action des endoxylanases sur les chaînes de xylanes devenues non branchées ou avec un branchement réduit. Les oligosaccharides ainsi générés sont par la suite dégradés aussi bien par les exoglycosidases que par les endoxylanases.

L'efficacité et l'étendue de l'hydrolyse des xylanes nécessitent les interactions synergiques ou coopératives d'une variété d'enzymes capables de dégrader aussi bien la chaîne principale que les chaînes latérales avec leur différentes spécificités (Coughlan *et al.*, 1993).

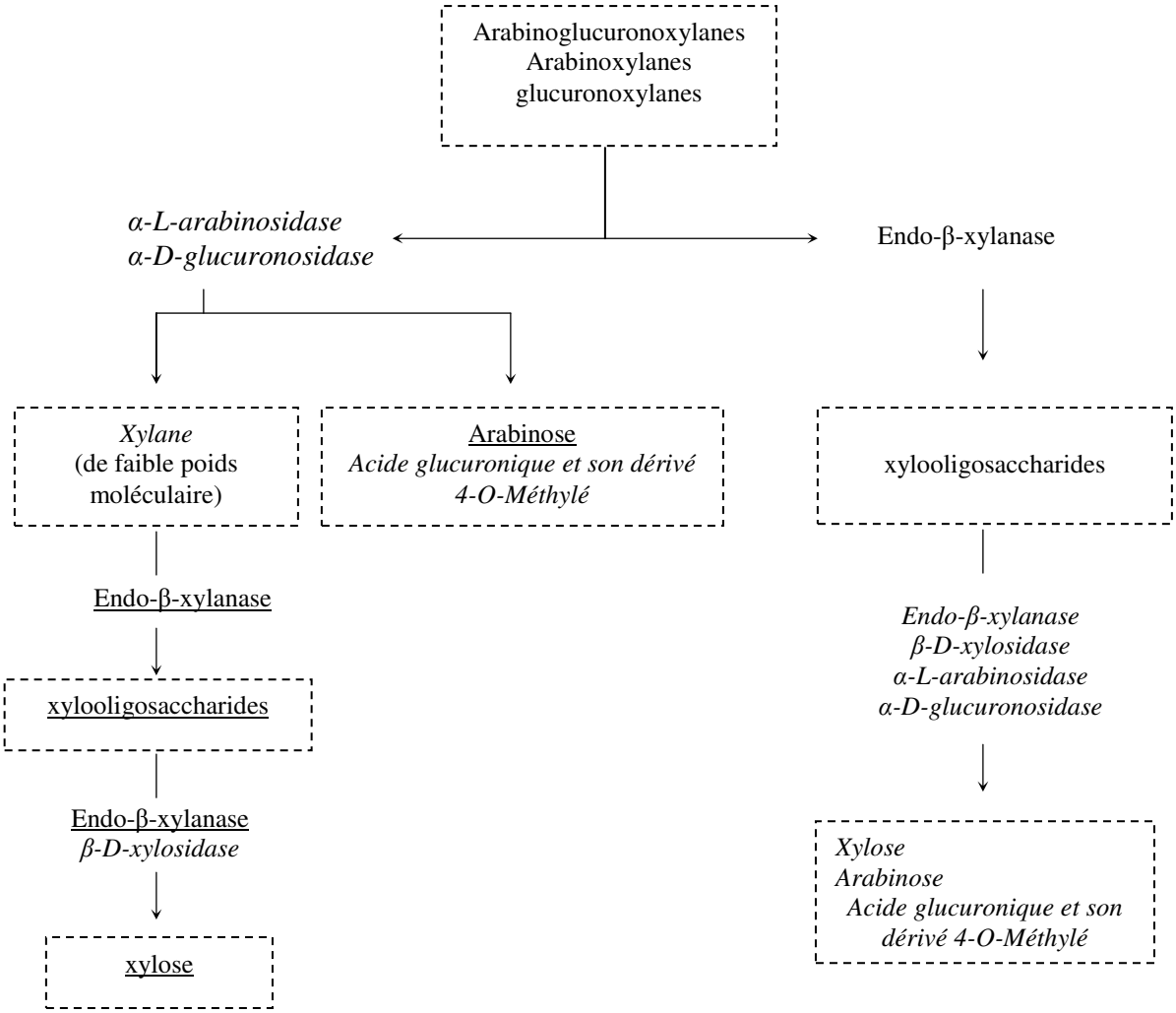


Figure I.23. *Mécanisme d'action de plusieurs enzymes sur l'arabinoglucuronoxylane, arabinoxylane et glucuronoxylane (Popa., 1998)*

I.4.3.4. Dégradation enzymatique des polysaccharides pariétaux

Vu sa structure complexe, la paroi végétale demeure résistante à l'hydrolyse enzymatique. Sa dégradation *in situ* dépend de plusieurs paramètres qui la rendent beaucoup plus complexe qu'une dégradation de polymères isolés. En effet, les liaisons entre les polymères pariétaux ainsi que l'insolubilité de toute la paroi rendent difficile l'accessibilité des enzymes à leur substrat spécifique à l'intérieur du réseau pariétal.

L'hydrolyse enzymatique des parois cellulaires végétales et donc des substrats lignocellulosiques correspond à un processus de catalyse hétérogène faisant intervenir plusieurs étapes pré-requises dont les caractéristiques sont différentes d'un processus de catalyse homogène.

La plupart des études de l'hydrolyse enzymatique en phase hétérogène étaient surtout réalisées sur des cellulases, et peu d'études ont porté sur la dégradation des parois par des hémicellulases.

Les travaux de Lee et Fan (1982) sur la modélisation de la catalyse hétérogène de la cellulose insoluble, ont permis d'établir un modèle de mécanisme décrivant les différentes étapes d'une dégradation de la paroi cellulaire végétale, substrat insoluble, par des enzymes solubles.

Les différentes étapes du mécanisme proposées sont les suivantes :

- diffusion de l'enzyme du milieu aqueux à la surface du substrat
- formation du complexe enzyme-substrat suite à l'adsorption de l'enzyme sur le substrat insoluble
- transfert des autres réactants du macro-environnement vers les sites actifs du complexe enzyme-substrat
- réaction d'hydrolyse enzymatique à la surface du substrat
- transfert du produit de réaction de la surface de substrat au milieu aqueux
- hydrolyse en monomères des oligosaccharides solubles libérés dans le milieu aqueux

I.4.3.5. Facteurs limitant l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides pariétaux en phase hétérogène

Dans le processus de la catalyse enzymatique en phase hétérogène, plusieurs paramètres physico-chimiques peuvent limiter l'hydrolyse enzymatique des polysaccharides pariétaux tels que l'adsorption de l'enzyme sur son substrat, les caractéristiques des parois ainsi l'accessibilité des polysaccharides pariétaux déterminé par la porosité des parois et leurs surfaces disponibles ainsi que par la présence de lignine.

L'hydrolyse enzymatique de substrat insoluble dépend fortement du processus d'adsorption de l'enzyme et la vitesse de l'hydrolyse est conditionnée par la quantité d'enzyme adsorbée sur le substrat lignocellulosique. Les paramètres intervenant dans la fixation des hémicellulases en phase hétérogène sont peu connus à cause de la complexité structurale du réseau pariétal et des interactions interpolymères qui rendent difficile l'étude *in situ* des interactions entre l'enzyme et le substrat lignocellulosique. Des études sur ce paramètre ont surtout ciblé des cellulases et des

substrats autres que la paroi végétale. Certains travaux ont attribué à la lignine un rôle dans l'efficacité de l'adsorption de l'enzyme sur son substrat et a été suggéré qu'elle serait responsable à l'adsorption non spécifique de l'enzyme sur le substrat, ce qui diminue de taux d'adsorption spécifique de cette dernière sur la lignocellulose. En effet, Zilliox *et al.* (1998) ont montré une augmentation importante de l'adsorption d'une xylanase purifiée sur la paille de blé après une délignification chimique.

Par ailleurs, la présence des chaînes latérales, substituant les polymères, crée un encombrement stérique empêchant la fixation de l'enzyme sur son substrat inhibant ainsi son hydrolyse. Dans ce contexte, les travaux de White *et al.* (1993) ont montré que la présence de nombreux substituants (comme l'arabinose et l'acide glucuronique) au niveau des chaînes de glucuronoarabinoxylanes a empêché la reconnaissance de plusieurs sites de coupure par une endoxylanase.

Parmi les autres facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique, il y a la porosité du substrat et sa surface disponible. En effet, la porosité des parois est variable en fonction de la nature de leurs polymères constitutifs, de la nature des liaisons intra et inter-moléculaires ainsi que de la fréquence et de la répartition de ces liaisons au sein du réseau pariétal. Elle constitue un facteur important pouvant influencer négativement la diffusion des enzymes à travers la paroi et ainsi limiter la dégradation des tissus. L'augmentation de la taille des pores du substrat facilite la diffusion de l'enzyme à l'intérieur du substrat et l'augmentation de la vitesse de la réaction enzymatique.

La diffusion des produits de réaction est un paramètre aussi déterminant de l'étendu de l'hydrolyse enzymatique. En effet, un problème de diffusion du produit de réaction favorise la concentration de ce dernier à la surface du substrat. Certains produits de réaction peuvent inhiber la réaction enzymatique comme le glucose ou le cellobiose dans le cas de la dégradation de la cellulose par les cellulases.

La lignine et le degré de lignification des parois constituent un facteur principal dans la limitation de la dégradation pariétale. De nombreuses hypothèses ont été émises concernant le rôle des lignines et des composés phénoliques durant l'hydrolyse enzymatique des polysccharides pariétaux. Zilliox *et al.* (1998) ont montré que la délignification chimique a permis de multiplier par 4 le rendement de dégradation des xylanes de la paille de blé par une endoxylanase purifiée.

Des études ont montré que ce sont les liaisons covalentes établies entre la lignine et les polysaccharides qui limitent l'hydrolyse enzymatique plus que la présence de lignine (Hartley et Jones, 1977; Chesson, 1993).

I.4.3.6. Hydrolyse enzymatique des matériaux lignocellulosiques et nécessité de prétraitements

Etant donnée la structure complexe des parois cellulaires constituant la biomasse lignocellulosique, cette dernière n'est pas directement accessible aux enzymes. Elle nécessite une phase de prétraitement préalable dont l'objectif est d'améliorer la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique aussi bien de la cellulose que de l'hémicellulose en vue de l'obtention de sucres monomères ou d'oligomères. Ce prétraitement peut être mécanique, thermique ou chimique, ou bien la combinaison de deux ou trois de ces types d'action.

Ces prétraitements altèrent les propriétés physiques telles que la cristallinité et la surface disponible des substrats alors que les prétraitements chimiques agissent par destruction du substrat lignocellulosique (destructuration du complexe polysaccharide-lignine) et réduction de la teneur en lignine.

Les traitements physiques comme le broyage et le concassage ont été trouvés efficaces pour améliorer l'accessibilité des enzymes. Cependant, ces traitements nécessitent tous une quantité importante d'énergie. En effet, les coûts d'opération et de l'énergie de chaque traitement deviennent de plus en plus inabordables pour des tailles de particules de plus en plus fines (Datta, 1981).

La combinaison des traitements enzymatiques avec l'autohydrolyse ou les traitements à la vapeur d'eau a été fréquemment utilisée pour la production des milieux de fermentation. En effet, un milieu de fermentation contenant le xylose a été obtenu par post-hydrolyse enzymatique des oligomères de rafle de maïs produits par autohydrolyse, avec un rendement de conversion de 80% du xylane initial (Vazquez *et al.*, 2001).

Walch *et al.* (1992) ont également procédé à une saccharification par des préparations commerciales de xylanase des liqueurs obtenues par traitement hydrothermique (à 200°C) de la bagasse de canne à sucre utilisant deux types de procédés : à écoulement direct (flow through) et de recirculation. Les auteurs ont montré que le rendement de la saccharification enzymatique varie selon le type de procédé de traitement hydrothermique. Le procédé en recirculation a donné de meilleurs rendements, ce qui a été attribué à la possibilité de l'inhibition des xylanases par le xylose dans le cas du procédé « flow-through ». Les mêmes auteurs, afin d'étudier l'effet inhibiteur des tanins, ont réalisé une thermohydrolyse de bois de hêtre utilisant un procédé à deux étapes. La première consiste à traiter le végétal à 120°C et qui va servir à libérer les tanins. La deuxième étape (à 200°C) consiste à faire extraire les hémicelluloses. La saccharification des liqueurs obtenues a

montré des rendements supérieurs à ceux obtenus par traitement hydrothermique en une seule étape. En effet, les tanins peuvent se fixer sur les protéines et les précipiter ce qui inhibe les activités enzymatiques. Un procédé de traitement hydrothermique multi-étapes permettrait donc la libération sélective des tanins inhibiteurs rendant les hydrolysats hémicellulosiques plus purs pour des procédés ultérieurs comme une hydrolyse enzymatique ou une fermentation microbienne.

Laser *et al.* (2002) ont comparé l'effet d'une explosion à la vapeur et d'un traitement en phase aqueuse de la bagasse de canne à sucre sur l'efficacité de la saccharification et de la fermentation simultanées des hydrolysats hydrothermiques obtenus. Dans tous les cas, le traitement en phase aqueuse a donné le meilleur rendement de conversion.

Dans d'autres cas, une imprégnation de coques d'amandes dans l'acide sulfurique a été combinée à une explosion à la vapeur suivie d'une hydrolyse enzymatique pour la production de xylose ; 90% d'hémicelluloses ont été solubilisées après 135 s à 227°C, mais uniquement 50% de xylose a été récupéré. Ce procédé a été trouvé plus efficace qu'un traitement ordinaire à l'acide utilisé pour l'obtention du xylose (Pou-Ilinas *et al.,* 1990).

Heitz *et al.* (1991) ont rapporté l'occurrence d'un maximum d'hydrolyse enzymatique (65%) et de récupération de pentosanes à partir de bois durs traité par explosion à la vapeur en utilisant la technologie Stake II.

De la même manière, Martínez *et al.* (1997) ont utilisé une autohydrolyse combinée à une hydrolyse acide pour améliorer la dégradation enzymatique de la cellulose pour une production ultérieure de glucose ou d'éthanol à partir d'échantillons de bois tendre et de coques d'amande.

La combinaison de prétraitement à la vapeur suivi d'une hydrolyse enzymatique de bois de bouleau (Puls *et al.*, 1985b), de bois de peuplier (Brownell et Saddler, 1987) ou de *Brassica carinata* (Ballesteros *et al.*, 2002) a été utilisée pour améliorer l'hydrolyse enzymatique et la conversion aussi bien de la cellulose que de l'hémicellulose.

Un procédé totalement intégré (Shimizu *et al.*, 1998) a été utilisé pour le fractionnement de plusieurs échantillons de bois durs, et qui a consisté en une étape de traitement à la vapeur des échantillons pour la solubilisation des hémicelluloses. Ces dernières, sont ensuite purifiées puis hydrolysées par des enzymes immobilisées pour leur conversion d'abord en xylose puis en xylitol. Le résidu fibreux obtenu est par la suite extrait plusieurs fois par le dioxane (90%) afin de séparer la lignine de la cellulose. Cette dernière est hydrolysée pour la production de glucose pour être fermenté en éthanol.

Par ailleurs, Saha et Bothast (1999) ont évalué plusieurs prétraitements (à l'eau chaude, traitement alcalin et à l'acide dilué) suivis d'une saccharification pour la conversion des fibres de maïs en sucres fermentescibles. Les auteurs ont trouvé que le traitement à l'eau à 121°C pendant 1 heure a facilité la saccharification enzymatique de l'amidon et de la cellulose mais pas de l'hémicellulose. L'hydrolyse par une hémicellulase des fibres de maïs prétraitées avec des alcalins (10/1 m/m) à 121°C pendant 3 heures, a donné des résultats similaires (Saha, 2003). Par contre, l'hémicellulose et l'amidon sont convertis en sucre simple par un traitement à l'acide dilué et la cellulose est convertie en glucose en utilisant des enzymes commerciales. Cette procédure a consisté en un prétraitement de la fibre (15% m/v de solide) avec de l'acide dilué H_2SO_4 0.5% v/v) à 121°C pendant une heure, une neutralisation du pH, et une saccharification des fibres de maïs prétraitées par des préparations commerciales de cellulase et de β-glucosidase. Le rendement en sucres monomères était de 85 à 100% du rendement théorique. Cette procédure n'a pas généré des inhibiteurs comme le furfural et l'hydroxyméthyl furfural, qui sont généralement des inhibiteurs pour des microorganismes fermentatifs.

En effet, le prétraitrement à l'acide dilué à des températures relativement faibles (pour minimiser la formation de composés inhibiteurs) suivi d'une saccharification enzymatique de la portion cellulosique a été considéré efficace pour la production de sucres fermentescibles à partir des fibres de maïs (Saha, 2003).

Un autre procédé utilisant le traitement à la vapeur a été étudié par Yang *et al.* (2005) sur les rafles de maïs et en combinaison avec un traitement à l'acide sulfurique et de l'action de l'enzyme. Le rendement en xylo-oligosaccharides obtenus est près de 68% avec une pureté de 70% du total des sucres de l'hydrolysat.

I.5. Conclusions et présentation du sujet

Dans ce chapitre on a pu passer en revue les travaux et les connaissances acquises sur la valorisation des ressources végétales lignocellulosiques. La canne à sucre étant la source de la bagasse, faisant l'objet de notre étude, a été présentée en début du chapitre, ainsi que les étapes de sa transformation en sucre jusqu'à la génération des sous-produits notamment la bagasse. La composition de la fraction lignocellulosique des parois végétales et son organisation structurale ont été aussi détaillées.

La matière lignocellulosique, étant fortement abondante, a fait l'objet de nombreux travaux et études en vue de mettre en place des protocoles adéquats assurant sa valorisation et sa transformation. Le son de blé, les rafles de maïs et bien d'autres sous-produits végétaux telle que la bagasse de canne à sucre ont fait l'objet de ces travaux.

La base bibliographique reporte l'utilisation de plusieurs méthodes mises en œuvre pour l'extraction de la fraction hémicellulosique à partir des résidus lignocellulosiques. L'hydrolyse à l'acide dilué permet l'obtention des rendements d'extraction élevés, mais le caractère chimique de la méthode, la nécessité de neutralisation et la dégradation des monomères obtenus diminuent la fiabilité de la technique. L'hydrolyse alcaline a aussi été utilisée, mais elle s'accompagne toujours d'une perte de 30 à 35% de matière sèche initiale, et, dans certains cas, peut engendrer une hydrolyse partielle de la cellulose et donc la libération de glucose dans les fractions hémicellulosiques récupérées. D'autre part, le coût des réactifs chimiques, telle que la soude pénalise fortement le procédé. L'étape de neutralisation nécessaire dans ces procédés engendre des coûts supplémentaires élevés. Les procédés Organosolv, présentent l'inconvénient du coût élevé des solvants utilisés ainsi que les étapes de leur élimination en fin d'extraction. L'explosion à l'ammoniac ou au CO_2 ont été aussi étudiées, mais restent toujours sans application industrielle et cela à cause de la difficulté de leur mise en œuvre. Des extractions sélectives par hydrolyse enzymatique ont été aussi décrites mais les rendements atteints sont généralement faibles et sont limités par la complexité de la matière végétale nécessitant ainsi un prétraitement avant de faire agir les enzymes.

Les traitements hydrothermiques constituent une alternative de méthodes d'extraction des hémicelluloses et permettent d'atteindre des rendements comparables à ceux obtenus par une hydrolyse acide. Le traitement hydrothermique est présenté sous deux variantes : l'explosion à la vapeur et l'extraction à l'eau chaude maintenue à son état liquide en travaillant sous pression.

Les traitements hydrothermiques présentés dans la littérature sont réalisés à des températures allant de 180 à 230°C, considérées relativement élevées, ce qui peut constituer un frein pour une éventuelle utilisation industrielle. L'explosion à la vapeur est une méthode efficace mais elle reste assez délicate à conduire pour le fractionnement de la biomasse lignocellulosique du fait de l'existence d'une étape de détente brutale de pression pouvant rendre complexe le matériel mis en œuvre et augmenter le coût du procédé. Le traitement à l'eau paraît être le moyen le plus efficace pour fractionner l'hémicellulose sans recours à l'utilisation de réactifs chimiques.

Dans ce cadre, et durant ces travaux de thèse nous proposons une étude de valorisation de la bagasse de canne à sucre par extraction de sa fraction hémicellulosique au moyen d'une hydrolyse enzymatique seule ou combinée à un traitement hydrothermique. Sa composition riche en xylanes et en groupement acétyle (catalyseurs de la réaction de thermohydrolyse), sa forte disponibilité, son faible coût et l'absence quasi totale de coût de transport du fait de l'implantation possible des unités de valorisation au sein de la sucrerie, font de la bagasse un substrat de choix.

Des étapes d'optimisation de cette extraction ont été réalisées. Afin de mieux comprendre et maîtriser les conditions opérationnelles du traitement hydrothermique, une étude comparative de l'effet direct de plusieurs paramètres sur la rentabilité et l'efficacité du traitement a été conduite. Pour assurer une extraction dans des conditions modérées applicables à une échelle industrielle et permettant d'atteindre de bons rendements, les barèmes de traitement (temps, température) ont été optimisés. En effet, travailler à des températures modérées permettrait de réduire les coûts de chauffage et de prévenir de la dégradation des sucres extraits. Pour le facteur temps, il s'agit de tester plusieurs durées en suivant la solubilisation de l'hémicellulose. Un temps minimal pour libérer des fragments de xylane de taille relativement grande est nécessaire.

Une étape d'optimisation de l'étape de l'hydrolyse enzymatique a été aussi réalisée en utilisant des enzymes dégradant les dérivés du xylane solubilisés par thermohydrolyse pour les transformer en monomère de xylose. Des préparations enzymatiques et une enzyme purifiée ont été testées. L'utilisation d'un jus de culture enzymatique permettrait de réduire le coût d'utilisation des enzymes purifiées.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Le matériel végétal

La bagasse de canne à sucre a été fournie par le Centre d'Essai De Recherche et de Formation sur la canne à sucre (CERF), 97494, Sainte Clotilde- La Réunion. Il s'agit d'une bagasse issue d'un procédé d'extraction mixte moulins-diffusion et qui a été broyée à une granulométrie inférieure à 1cm par un broyeur Retsch (SM 100 ; Article N° 20.734.0001 ; Série N° : 82506003).

II.2. Les enzymes

II.2.1. L'endoxylanase purifiée de Thermobacillus xylanilyticus

L'endo-β-1,4-xylanase purifiée [EC 3.2.1.8] est fournie par l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) de Reims. Elle est produite et purifiée à partir du surnageant de culture de *Thermobacillus xylanilyticus* D3. Ce *Bacillus* est un mutant catabolique obtenu par mutagenèse chimique (éthyle méthane sulfonate) d'un *Bacillus* XE isolé par Samain *et al.* (1991 ; 1992) et est capable de produire jusqu'à 1000 UI de xylanase par ml de culture en 10 heures de fermentation. L'activité spécifique (AS) est de 1800 UI/mg protéine à 60°C.

II.2.2. Le surnageant de culture d'Humicola insolens

Le surnageant de culture d'*Humicola insolens* est fourni par la société Roquette Frères (sous le numéro d'identification NS28096) et a été utilisé pour son activité endoxylanase.

II.2.3. Le surnageant de culture de Trichoderma Reesei

Le surnageant de culture de *Trichoderma Reesei* est fourni par la société Roquette Frères (sous le numéro d'identification NS28097) et a été utilisé pour son activité ß-xylosidase.

II.3. Les souches fongiques

Deux souches fongiques fournies par le Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryote du Centre de Biotechnologie de Sfax ont été testées :

- La souche AX4 de *Talaromyces thermophilus* (Guerfali, 2008).
- La souche RutC30 : un mutant de *Trichoderma reesei,* surproducteur de cellulases (Amouri, 2003).

L'étude a consisté à suivre la cinétique de production des activités enzymatiques : activités hémicellulasiques (xylanase), et activités cellulasiques (Carboxymethylcellulase ou CMCase, β-glucosidase (pNPGase) et pf (papier filtre ou activité cellulase totale)) par les souches étudiées cultivées en milieu liquide et solide. Les cultures ont été réalisées dans des erlenmeyers à 50°C pour la souche AX4 et à 30°C pour la souche RutC30, sous agitation à 150 rpm.

L'inoculation des souches a été faite soit directement par des spores collectées à partir du mycélium ou par une préculture préparée à l'avance. Lors de la culture, des échantillons de 10 ml sont prélevés stérilement à des intervalles de temps réguliers puis centrifugés à 5000 trs/min. Les surnageants soigneusement récupérés vont par la suite être analysés par dosage des différentes activités enzymatiques.

II.4. Les réacteurs

II.4.1. Les réacteurs enzymatiques

II.4.1.1. Les petits réacteurs (20 ml)

Les réactions enzymatiques ont été réalisées dans des petits réacteurs en verre à double paroi, thermostatés à la température désirée par un bain-marie à circulation d'eau.

II.4.1.2. Le réacteur d'agitation-mélange instrumenté (2L)

Les systèmes LR-2.ST et LR 2000 commercialisés par IKA, sont des réacteurs de laboratoire conçus pour l'optimisation et la reproduction de processus de réactions chimiques et enzymatiques, et de processus de malaxage, de dispersion et d'homogénéisation à l'échelle du laboratoire.

Le réacteur est muni d'une sonde de température et d'un agitateur à hélice disperseur et est commandé par PC avec un logiciel spécifique.

Ce système dispose d'un récipient en verre à double paroi qui a une capacité de 2L et qui est thermostable par un bain marie à circulation (figure II.1).

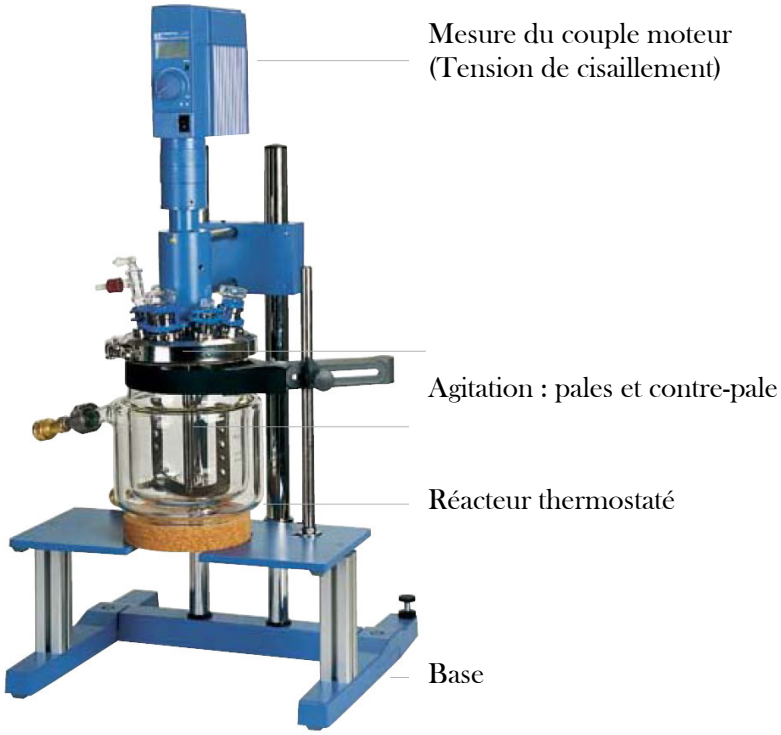


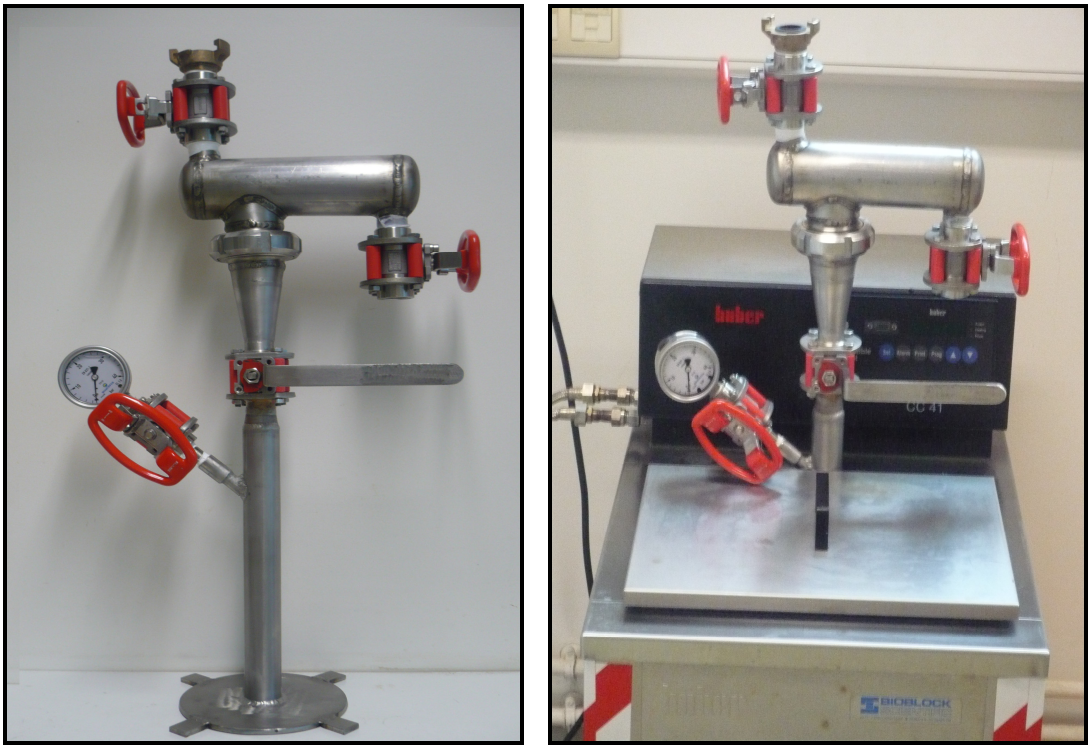
Figure II.1. *Le réacteur pilote d'agitation-mélange*

Les expériences peuvent être effectuées sous vide partiel grâce à une pompe reliée au réacteur. L'étanchéité et la résistance aux solvants permettent de travailler dans des conditions extrêmes (230°C, avec solvants). Dans ce système, l'agitation qui s'effectue à l'aide d'une pâle et contre pâle, peut être comprise entre 8 et 290 rpm.

Ce réacteur permet le suivi de la variation du couple résistant (TAU en $N.cm^{-2}$) mesuré au niveau du moteur de l'agitateur et dû à la viscosité du milieu réactionnel au cours de l'hydrolyse enzymatique.

II.4.2. Le réacteur du traitement hydrothermique

Les traitements hydrothermiques ont été réalisés dans un réacteur fermé (batch) fourni par la société Roquette Frères. Ce réacteur (figure II.2) est de forme cylindrique en acier inoxydable pouvant contenir 250 ml de volume réactionnel, relié par une vanne à une chambre de détente. Ce dispositif a été éprouvé à 25 bars et est muni d'un manomètre qui permet de contrôler la pression. Le réacteur est plongé dans un bain thermostaté (Bioblock scientific 06 Huber CC41) rempli d'huile de silicone stable jusqu'aux températures supérieures à 200°C (figure II.2 (b)).



(a) (b)

Figure II.2. *Photos du réacteur batch utilisé pour le traitement hydrothermique*

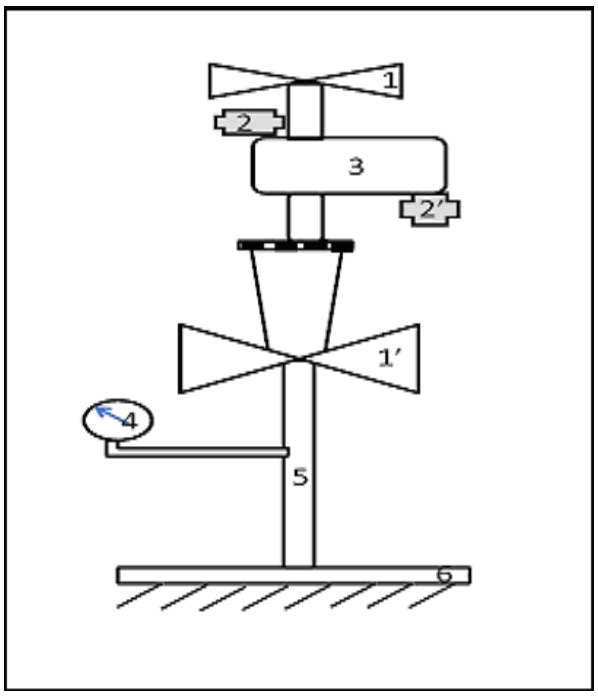


Figure II.3. *Représentation schématique du réacteur utilisé pour le traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre : ((1) et (1') vannes (2) et (2') Points d'évacuation (3) chambre de détente, (4) manomètre, (5) chambre sous pression, (6) support*

II.5. Méthodes préparatives

II.5.1. Traitement hydrothermique

Une suspension de bagasse à 5% masse sèche/volume (150 ml d'eau Milli-Q et 8,11 g de bagasse à 7,59% humidité) est introduite dans la chambre fermée du réacteur. Le traitement thermique commence en plongeant le réacteur dans le bain d'huile préalablement chauffé à la température désirée.

Plusieurs traitements thermiques ont été réalisés à différentes températures et à des intervalles de temps différents. L'arrêt du traitement a été fait par refroidissement progressif en dehors du bain thermostaté. Après refroidissement le réacteur est ouvert et la fraction solubilisée (hydrolysat hydrothermique) est séparée du résidu solide de la bagasse par filtration sous vide (par un dispositif Büchner à verre frité de porosité 2), puis le tout est placé à 4°C avant d'être analysé.

II.5.2. Hydrolyse acide

L'hydrolyse acide a été réalisée dans les mêmes conditions que le traitement hydrothermique mais en présence de l'acide sulfurique H_2SO_4 à 1% (v/v) et à 150°C qui va servir de référence tout au long de cette étude. L'hydrolyse acide a été également réalisée sur différents temps de traitement afin de déterminer le temps nécessaire à l'obtention du maximum de xylose extractible par l'acide.

II.5.3. Traitement alcalin (Délignification)

Le prétraitement alcalin a été réalisé par trempage de la bagasse dans une solution d'ammoniaque à 30% (v/v) avec un ratio solide/liquide de 1/7 dans des flacons hermétiquement fermés. Le mélange est incubé à température ambiante sous pression atmosphérique pendant 3 jours. Après trempage, la bagasse traitée est filtrée sur un verre frité de porosité 2, lavée plusieurs fois à l'eau jusqu'à obtention d'un pH neutre (Kim et Lee, 2005) et ensuite séchée à 105°C.

II.6. Méthodes analytiques

II.6.1. Dosage des activités enzymatiques

II.6.1.1. Activité xylanase

L'activité xylanase a été mesurée par l'apparition des sucres réducteurs libérés durant l'hydrolyse à 60°C des xylanes solubles de bouleau à 0,5% (m/v). Le tampon utilisé est l'acétate de

sodium à pH 5,8 pour la xylanase purifiée et à pH 5 pour le surnageant de culture d'*Humicola insolens*. La mesure de l'activité se fait dans les conditions de vitesse initiale de réaction. Dans ces conditions la quantité de sucres réducteurs libérés est proportionnelle à la concentration enzymatique. L'activité enzymatique est donc déduite de la pente de la droite (concentration des sucres réducteurs libérés= f (temps d'hydrolyse).

Une unité internationale (UI) d'activité xylanasique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'une micromole d'équivalent xylose par minute à 60°C. Les sucres réducteurs sont dosés selon la méthode de mesure de la réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure (Kidby et Davidson, 1973). La lecture de la densité optique se fait à 420 nm.

II.6.1.2. Activité β-xylosidase

Le paranitrophényl-β-D-xylopyranoside est un substrat synthétique contenant un groupement xylose lié en *para* à un nitrophénol. L'activité β-xylosidase a été déterminée à 55°C par la libération du paranitrophénol à partir d'une solution de paranitrophénol-β-D-xyloside dans du tampon citrate 50 mM pH 3,5.

La libération du para-nitrophénol par la dilution appropriée de l'enzyme est mesurée par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV - Visible modèle SHIMADZU uv-2101PC) à 401 nm. La cinétique enzymatique a été effectuée pendant une durée bien déterminée (cinétique en point final) et arrêtée par une interruption de l'incubation et par ajout de carbonate de sodium (Na_2CO_3), qui amène le pH du milieu réactionnel à 11 quel que soient le pH et le tampon initiaux. Dans ce cas, le para-nitrophénol (qui est sous forme de nitrophénoxide) est très coloré et son coefficient d'extinction molaire est constant et il est de 18312 M^{-1} cm^{-1} à 401 nm (Legin-Copinet, 1997).

II.6.1.3. Activité α-glucosidase (pNPGase)

L'activité α-glucosidase a été déterminée selon la méthode adoptée par Wood et Bhat (1988) à 50°C par la libération du paranitrophénol (pNP) à partir d'une solution de paranitrophényl-α-D-glucopyranoside dans le tampon citrate 5 Mm.

La réaction enzymatique a été effectuée pendant une durée bien déterminée (cinétique en point final) et arrêté par une interruption de l'incubation et par ajout de tampon glycine 400 mM pH 10,8.

La libération du para-nitrophénol par la dilution appropriée de l'enzyme est mesurée par spectrophotométrie à 430 nm par rapport à une gamme étalon de pNP allant de 0 à 20 µM.

II.6.1.4. Activité pf (papier filtre) ou cellulases totales

Les activités cellulases totales sont déterminée selon la méthode de Wood et Bhat (1988) en suivant la quantité de sucres réducteurs libérés à 50°C par l'action des enzymes (dilution appropriée) sur un disque d'antibiogramme (cellulose).

II.6.1.5. Activité CMCase

L'activité CMCase est déterminée selon la méthode de Wood et Bhat (1988) en suivant la quantité de sucres réducteurs libérés à 50°C par l'action de l'enzyme (dilution appropriée) sur une solution de Carboxyméthycellulose (CMC) à 2%.

II.6.2. Méthodes chimiques de caractérisation du substrat

II.6.2.1. Teneur en eau

Pour déterminer la teneur en eau, un échantillon de bagasse (2g) a été séché à 105°C jusqu'à un poids constant. Par pesée différentielle on détermine une teneur en eau exprimée en g d'eau pour 100g de matière sèche. Les analyses ont été répétées trois fois.

II.6.2.2. Teneur en cendre

La teneur en cendres de l'échantillon correspond à la masse résiduelle obtenue après 4 heures d'incinération à 500°C.

II.6.2.3. Dosage des lignines : Méthode au bromure d'acétyle

C'est une méthode spectrophotométrique qui a été développée par Johnson *et al.* (1961) puis modifiée par Iiyama et Wallis (1990). Le bromure d'acétyle permet la solubilisation des parois végétales. La teneur en lignine est alors estimée par la mesure de l'absorbance à 280 nm avec un coefficient d'extinction massique déterminé par une lignine de référence extraite d'épicéa (∑ massique= 20 $g^{-1}.L.cm^{-1}$).

Environ 10 mg d'échantillon et 5 mg de référence extraite d'épicéa sont placés dans des tubes à vis en verre de 25 ml. 5 ml d'une solution à 25% (p/p) en bromure d'acétyle dans l'acide acétique sont ajoutés aux échantillons et 0.2 ml d'acide perchlorique à 70% est ensuite ajouté.

Les tubes sont agités puis placés dans un bain-marie à 70°C pendant 30 minutes avec une agitation toutes les 10 minutes afin d'obtenir la solubilisation complète des échantillons. Après refroidissement dans la glace, un aliquote de chaque échantillon est transféré dans un tube gradué de 20 ml contenant 5 ml d'une solution de soude 2M et 6 ml d'acide acétique. Le volume de chaque tube est ensuite complété à 20 ml par de l'acide acétique. La solution est laissée pendant 45 minutes à l'obscurité, puis les mesures d'absorbances sont effectuées à 280 nm contre un témoin sans paroi traité de façon identique.

II.6.2.4. Dosage des composés phénoliques

L'identification des acides hydroxycinnamiques (férulique et p-coumarique) sous forme ester et éther a été déterminée après traitement alcalin de la bagasse.

II.6.2.4.1. Hydrolyse des liaisons ester et éther

Les acides hydroxycinnamiques liés par liaisons éthers et esters sont libérés en une seule étape en milieu alcalin concentré et à chaud (Iiyama et Wallis, 1990) : A 40 mg d'échantillon pesé dans des gaines en téflon sont ajoutés 10 ml de NaOH 4 N. L'hydrolyse est effectuée dans un autoclave à 170°C pendant 2 heures. Après refroidissement, on ajoute 1 ml d'étalon interne à 200 µg/ml (l'acide 3-4-5, triméthoxycinnamique). Les acides hydroxycinnamiques libérés sont extraits trois fois par 30 ml d'éther, après acidification du milieu par de l'acide chlorhydrique 6N (pH≈1). Les phases éthyliques sont ensuite évaporées à sec puis reprises par 1.5 ml d'un mélange méthanol/eau (v/v). Après filtration sur filtre PTFE 0.22 µm, l'échantillon est prêt à être analysé par HPLC.

II.6.2.4.2. Hydrolyse des liaisons ester

Les acides hydroxycinnamiques liés par liaisons esters sont libérés par hydrolyse alcaline douce (Scalbert *et al.*, 1985). A 40 mg d'échantillon pesés dans des flacons bruns (à l'abri de la lumière) sont ajoutés 10 ml de NaOH 2 M. L'hydrolyse est effectuée à 30°C pendant 4 heures sous agitation et sous atmosphère d'azote. A la fin de la réaction, on ajoute 1ml d'étalon interne à 200 µg/ml (l'acide 3-4-5, triméthoxycinnamique). Les acides hydroxycinnamiques libérés sont extraits trois fois par 30 ml d'éther après acidification du milieu par de l'acide chlorhydrique 6 N (pH≈1). Les phases éthyliques sont ensuite évaporées à sec puis reprises par 1.5 ml d'un mélange méthanol/eau (v/v). Après filtration sur filtre PTFE 0.22 µm, l'échantillon est prêt à être analysé en HPLC.

II.6.2.4.3. Conditions d'analyse en HPLC

Les acides hydroxycinnamiques libérés sont analysés par HPLC en phase inverse. Les échantillons sont injectés dans un appareil Waters équipé d'une colonne Waters Spherisorb S5ODS2 (4.6 * 250 mm) (Lamblin *et al.*, 2001). L'élution est réalisée par un gradient de polarité (tableau II.1) à un débit de 1 ml/min. Les chromatogrammes sont enregistrés en continu à l'aide d'un détecteur équipé d'une barrette de diodes. L'intégration est effectuée à 301.9 nm.

Tableau II.1. *Gradient utilisé pour le dosage des acides hydroxycinnamiques en HPLC*

	Temps (min)	% solvant A	% solvant B	% solvant C
Séparation	0	100	0	0
	6	92.5	5	2.5
	13.5	85	10	5
	27.5	60	20	20
	30	60	20	20
Nettoyage	35	0	50	50
Equilibrage	50	100	0	0
	55	100	0	0

Solvants :

- A : Acétonitrile 10%, H_2O 90%, Acide orthophosphorique 1/1000.
- B : Méthanol 80%, H_2O 20%, Acide orthophosphorique 1/1000.
- C : Acétonitrile 80%, H_2O 20%, Acide orthophosphorique 1/1000.

II.6.3. Méthodes physiques de caractérisation du substrat

II.6.3.1. Microscopie photonique

Des échantillons de bagasse broyée et non broyée (tout venant), placés dans une coupelle en verre, ont été observés par une binoculaire (Nikon) muni d'un objectif de grossissement maximal de 250 relié à une caméra et à un système d'acquisition d'image sur PC. Les images sont analysées par un logiciel LUCIA (*Laboratory Universal Computer Image Analysis*) qui est commercialisé par la société NIKON (Paris).

II.6.3.2. Détermination de la capacité d'absorption d'eau

La capacité de la bagasse à absorber l'eau a été déterminée selon la méthode de Gould *et al.* (1989) avec une légère modification. Un échantillon de bagasse sèche (3g) a été mélangé avec un excès d'eau Milli-Q puis laissé s'hydrater pendant 2 heures. L'excès d'eau est ensuite enlevé par drainage sur un tamis métallique de maille très fine. Un échantillon de bagasse mouillée est ensuite

prélevé, pesé, puis séché jusqu'au poids constant à 105°C. La capacité d'absorption d'eau (en g d'eau absorbée/ g masse sèche) est définie comme suit :

Masse mouillée – Masse sèche / Masse sèche (Sangnark et Noomhorm, 2003)

II.6.3.3. Détermination du volume de gonflement

Le volume occupé par un échantillon de bagasse complètement hydraté (appelé volume de gonflement) a été mesuré en mélangeant 1g de bagasse avec un excès d'eau bi-distillée dans une éprouvette. La suspension est mélangée de temps en temps pendant plusieurs heures pour assurer la complète hydratation de l'échantillon, on laisse décanter une nuit. Le volume occupé par les particules gonflées est le volume de gonflement en ml/g de bagasse sèche (Gould *et al.*, 1989).

II.6.3.4. Isotherme de sorption de la vapeur d'eau

II.6.3.4.1. Isotherme de sorption

Une isotherme de sorption de vapeur d'eau d'un échantillon de bagasse a été établie en utilisant la méthode des microclimats (Mathlouthi et Rogé, 2003), qui consiste à suivre l'évolution de la teneur en eau (ou humidité relative ERH) à l'équilibre de l'échantillon conditionné sous des atmosphères d'humidité relative fixes et croissantes. L'humidité relative est obtenue à l'aide d'une solution saline saturée placée dans l'enceinte thermostatée et hermétiquement fermé de l'aw-métre « thermoconstanter » NOVASINA modèle Humidat-TH200. Les solutions salines saturées utilisées sont données dans le tableau II.2 (AOAC, 1980). Un échantillon de bagasse séchée une nuit à 105°C est pesé dans une coupelle (1g) et maintenu à 20°C ; pour chaque solution saline on suit l'évolution de la masse de l'échantillon jusqu'au poids constant signifiant que l'équilibre est atteint. La différence de pesée entre l'échantillon avant et après adsorption d'eau (à l'équilibre) donne la quantité d'eau adsorbée par l'échantillon à analyser. On considère que l'équilibre entre l'échantillon et l'atmosphère qui l'entoure est atteint après 7 jours, on parlera alors d'Humidité Relative d'Equilibre (HRE).

Tableau II.2. *Humidité relative d'équilibre des solutions salines utilisées pour contrôler l'atmosphère lors de la sorption de la vapeur d'eau sur la bagasse de canne à sucre*

Solution salines	Humidité relative en %
LiCl	12
$MgCl_2$	33
K_2CO_3	42
Na_2CrO_7	52
$NaNO_2$	62
NaCl	76
KCl	84
K_2SO_4	96

II.6.3.4.2. Eau de la couche d'hydratation monomoléculaire

Une isotherme de sorption nous permet, en plus de suivre l'état d'hydratation d'un produit en fonction de l'activité de l'eau du milieu, de déterminer l'eau de la couche monomoléculaire d'hydratation graphiquement par la méthode de l'équation de B.E.T. (Brunauer *et al.*, 1938) suivante :

$$Aw / M (1-aw) = 1/M_1.C + aw (C - 1) / M_1.C)$$

Avec:

- aw: activité de l'eau
- M: teneur en eau du produit (g/100g de matière sèche)
- M_1 : teneur en eau correspondante à la couche monomoléculaire
- C : constante

La représentation graphique de l'équation de B.E.T. nous permet de déterminer M_1 comme le montre la figure suivante :

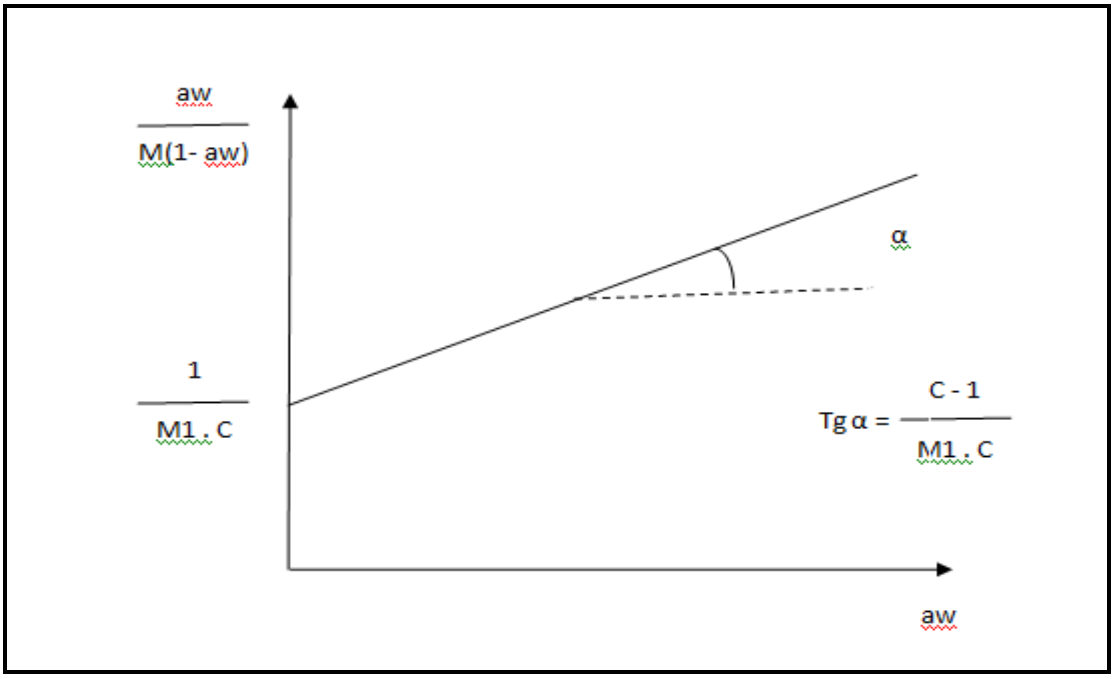


Figure II.4. *Détermination de l'eau de la couche monomoléculaire à partir de l'exploitation d'une courbe de sorption (Brunauer et al., 1938 ;)*

II.6.4. Méthodes de caractérisation des hydrolysats

II.6.4.1. Mesure de la coloration

Les hydrolysats issus des traitements hydrothermique et acide ont été dilués 2 fois puis leur coloration a été déterminée en mesurant l'absorbance à 420 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, modèle Shimadzu UV-2101PC.

II.6.4.2. Détermination des masses sèches

La masse sèche des fractions solubilisées par traitement hydrothermique a été déterminée par séchage de 10 ml d'hydrolysats à 105°C pendant une nuit. Le résidu obtenu est ensuite pesé (Bobleter *et al.*, 1989). L'écart entre la masse sèche de l'hydrolysat et sa teneur en xylose permettrait de donner une idée sur la teneur en impuretés.

II.6.4.3. Méthodes de dosage et de caractérisation des sucres

II.6.4.3.1. Dosage des sucres réducteurs

La mesure des extrémités réductrices libérées à partir de la bagasse lors des traitements hydrothermiques ainsi que lors des hydrolyses enzymatiques, a été réalisée par la mesure de la

réduction du ferricyanure (Kidby et Davidson, 1973). La lecture de l'absorbance à 420 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, modèle Shimadzu UV-2101PC. La quantité de sucres réducteurs est déterminée par rapport à une courbe étalon réalisée avec le xylose comme standard à différentes concentrations (de 0 à 400 µg/ml).

II.6.4.3.2. Dosage des sucres totaux

La quantité des sucres totaux des hydrolysats a été déterminée par la méthode au phénol sulfurique développée par Dubois *et al.* (1956) puis modifiée par Saha et Brewer (1994). En milieu acide concentré, les glucides se transforment en dérivés du furfural qui, en se complexant avec le phénol, donnent des composés de couleur orangée.

A 200 µl d'échantillon à doser sont ajoutés (brusquement) 200 µl d'une solution aqueuse de phénol à 5% (p/v), puis 1 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation, on laisse se refroidir le mélange pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La lecture des absorbances est effectuée à 480 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, modèle Shimadzu UV-2101PC. La concentration en sucres totaux est obtenue par référence à une gamme étalon en xylose (0 à 50 µg/ml).

II.6.4.3.3.Chromatographie Liquide Haute Performance d'échange d'ions (Dionex)

La composition monosaccharidique de la bagasse de canne à sucre ainsi que les hydrolysats a été déterminée après hydrolyse à l'H_2SO_4 par Chromatographie échangeuse d'ions (Dionex).

- *Préparation des échantillons : hydrolyse à l'H_2SO_4 (Seaman et al., 1954)*

- *Hydrolyse du solide*

A environ 10 mg d'échantillon de bagasse sèche, sont ajoutés 125 µl d'acide sulfurique 12 M , sous agitation pendant 2 heures. L'acide est ensuite dilué à 2M par ajout de 0.5 ml d'étalon interne (fucose 1 mg/ml) et 1ml d'eau. L'hydrolyse se poursuit ensuite pendant 2 heures à 100°C dans un bain d'huile de silicone. Après refroidissement, les échantillons sont filtrés sur membrane en nylon ou PTFE (13 mm de diamètre) de 0.22 µm de porosité.

- *Hydrolyse du soluble*

Les fractions solubles obtenues par traitements hydrothermiques et enzymatiques ont été hydrolysées par l'H_2SO_4 afin de transformer les dérivés du xylane solubilisés en sucre monomères

avant leur quantification. Pour ce faire, à 0,5 ml d'échantillon sont ajoutés 200 µl d'étalon interne (fucose à 1 mg/mL) et 700 µl d'acide sulfurique 2M. L'hydrolyse est effectuée pendant 1 heure à 100°C dans un bain d'huile de silicone. Après refroidissement, le volume est ajusté à 2 mL avec de l'eau Milli-Q, puis filtré sur membrane en nylon ou PTFE (13 mm de diamètre) de 0,22 µm de porosité avant d'être analysé.

- *Appareillage et protocole*

Les monosaccharides libérés lors de l'hydrolyse acide sont identifiés et quantifiés à l'aide d'un chromatographe ionique Dionex équipé d'une colonne d'échange anionique Carbopac PA1 (4*250mm) et d'un détecteur à impulsions ampérométriques avec une électrode de mesure en or (PAD2).

Les échantillons sont séparés par un gradient d'acétate de sodium 1M dans 0,1 M NaOH à un débit de 1 ml/min. Les monosaccharides (xylose, arabinose, glucose et galactose) ont été utilisés comme références et le fucose comme étalon interne.

II.6.4.3.4. Chromatographie sur Couche Mince

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur plaque de silice (K60, Merk) selon le protocole utilisé par Boussarsar *et al.*, (2007). Le xylose, xylobiose, xylotriose et xylotétraose ont été utilisés comme référence. La migration s'est déroulée pendant 6 heures dans le solvant n-butanol / acide acétique / eau (en proportion 2/1/1) (Benamrouche-Stitou, 2002). La révélation a été effectuée par pulvérisation d'une solution d'orcinol sulfurique (200 mg d'orcinol dans 100 ml d'acide sulfurique à 20% v/v), suivie d'un passage à l'étuve à 120°C pendant 5 minutes.

II.6.4.3.5. Chromatographie d'Exclusion stérique Haute Performance (HP-SEC)

- *Principe*

La chromatographie d'exclusion stérique est la technique la plus utilisée pour avoir des informations sur la masse moléculaire des polymères. Elle est spécialement adaptée dans le cas des échantillons polydisperses. L'utilisation en ligne d'une méthode de détection comme la diffusion de lumière à multi angles permet la détermination de la taille et la masse des molécules correspondante à chaque pic, ce qui permet de déterminer la distribution moléculaire de l'échantillon.

- *Appareillage et protocole*

Les mesures ont été réalisées par un système à multidétection constitué d'un détecteur UV (Waters 486), d'un détecteur d'indice de réfraction (Waters 410) et un détecteur de diffusion de lumière à multi angle (Dawn MALLS, 632,8 nm, Wyatt Corporation). Un logiciel ASTRA (Wyatt) a été utilisé pour l'enregistrement des données de diffusion de lumière durant l'élution. 100-200 µl d'échantillon sont injectés après filtration sur membrane PTFE de 0,45 µm de porosité. La séparation est réalisée par des colonnes Shodex OH pack 802, 803 et 805 M (chacun à 4,6 mm* 300 mm) thermostatiquement contrôlées, avec un débit de 1 ml/min utilisant une solution de $NaNO_3$ 50 Mm contenant 0,02% de NaN_3. Le système est calibré avec des solutions monodisperses de pullulanes à faibles poids moléculaires (20 000 et 11 000 g/mole). La masse moléculaire des particules est déterminée par la procédure « Berry plot » avec des équations de premier ordre fournies par le logiciel ASTRA.

II.6.4.3.6. Méthodes enzymatiques (Kit)

- *Dosage du xylose par la méthode enzymatique*

Le kit enzymatique spécifique au xylose est fourni par Mégazyme. Le principe de la technique est basé sur l'interconversion des formes anomériques (α et β) du D-xylose catalysée par la xylose mutarotase (XMR) (1).

(1) $$\alpha\text{-D-xylose} \xleftrightarrow{\text{(XMR)}} \beta\text{-D-xylose}$$

Le β-D-xylose est oxydé par NAD^+ en acide D-xylonique en présence de β-xylose déshydrogénase (β-XDH) à pH 7.5 (2).

(2) $$\beta\text{-D-xylose} + NAD^+ \xrightarrow{(\beta\text{-XDH})} \text{Acide D-xylonique} + NADH + H^+$$

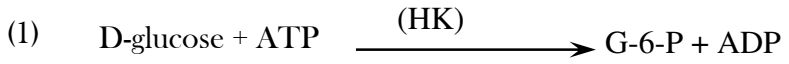
La quantité de NADH ainsi formée est dans des proportions stœchiométriques à la quantité de D-xylose introduite. Elle est mesurée à une absorbance de 340 nm. La liste des réactifs et la procédure expérimentale de dosage sont données dans le site www.megazyme.com.

- *Dosage du glucose par la méthode enzymatique*

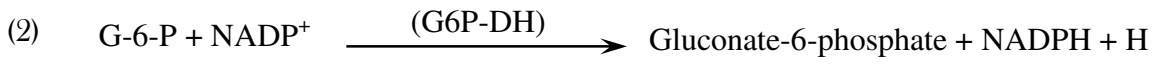
La quantité de glucose libérée a été déterminée par un kit enzymatique spécifique au glucose (produit Mégazyme)

Le principe de la méthode est le suivant :

En présence d'une hexokinase et de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G-6-P) avec la formation simultanée de l'adénosine-5'-diphosphate (ADP) (1).



En présence de l'enzyme glucose-6-déshydrogénase (G6P-DH), la G-6-P est oxydée par la nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate ($NADP^+$) en gluconate-6-phosphate avec la formation du nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) (2).



La quantité de NADPH formée par cette réaction est stœchiométrique à la quantité de glucose, et est mesurée à 340 nm. La liste des réactifs et la procédure expérimentale de dosage sont données dans le site www.megazyme.com.

II.6.5. Mesure viscosimétrique

II.6.5.1. Appareillage

Les mesures de la viscosité dynamique sont réalisées au moyen d'un viscosimètre rotatif de type Lamy, le Rhéomat 225. Il est piloté grâce à un logiciel de viscosimètrie Rheometrics, et thermostaté à l'aide d'un bain.

La cellule de mesure consiste en deux cylindres coaxiaux. Le corps de mesure entraîné par un moteur électrique, plonge dans la substance à étudier.

II.6.5.2. Principe

Le produit à étudier est cisaillé entre les deux cylindres. Le cylindre extérieur est fixe alors que le cylindre intérieur tourne à une vitesse contrôlée (Ω). Le couple résistant (C) dû au cisaillement du liquide dans l'entrefer est mesuré sur l'élément tournant. A chaque vitesse de rotation (Ω) correspond une vitesse de cisaillement (γ). Ces vitesses peuvent varier de façon continue ou discontinue. La contrainte de cisaillement (σ) est directement proportionnelle au couple résistant (C).

La relation entre vitesse imposée et contrainte résultante est exprimée par la viscosité dynamique η (Pa.s):

$$\eta=\sigma/\gamma$$

- σ est exprimée en Pa
- γ est exprimée en s^{-1}.

II.6.5.3. Protocole

La viscosité apparente des échantillons a été mesurée à une vitesse de cisaillement constante (300 s^{-1}) pendant 1 minute à température ambiante.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Caractérisation du substrat : La bagasse de canne à sucre

III.1.1. Morphologie de la bagasse de canne à sucre

L'accession de l'enzyme à son substrat peut être gênée par la taille et la forme des fibres de canne à sucre. Pour contrôler cet effet une comparaison a été faite entre bagasse broyée et non broyée. Des photos des échantillons de bagasse broyée (a) et non broyée (b) obtenues par microscopie photonique sont données dans la figure III.1. Cette observation microscopique montre bien l'aspect fibreux de la bagasse de canne à sucre. La photo réalisée à la même échelle correspondant à la bagasse broyée montre que le broyage n'affecte pas sa structure fibreuse, mais en diminue la taille des particules.

(a) (b)

Figure III.1. *Photos de bagasse de canne à sucre : (a) bagasse broyée, (b) bagasse non broyée*

III.1.2. Composition chimique

La composition chimique de la bagasse (en polysaccharides, sucres monomères, cendres, acides phénoliques ainsi que sa teneur en eau) a été déterminée et les résultats sont donnés dans les tableaux III.1, III.2 et III.3. Cette composition chimique confirme qu'il s'agit d'une biomasse lignocellulosique (tableau III.1) qui est majoritairement formée de cellulose, hémicelluloses et de lignine. Elle est peu hydratée puisqu'elle ne contient que 7,8% d'eau.

La teneur en hémicelluloses de la bagasse étudiée est 26% MS, avec le xylose comme sucre monomère prépondérant (92%) ce qui permet de suggérer que la fraction hémicellulosique de la bagasse est formée de xylanes. L'analyse de la composition monosaccharidique (tableau III.2) de la bagasse révèle la présence de l'arabinose ce qui montre que les xylanes de la bagasse sont de type arabinoxylanes.

La bagasse contient également une quantité relativement importante de lignine (20%MS) comparable à celle de la paille de blé (Rémond-Zilliox C., 1996). La lignine est responsable de la rigidité de la structure de la bagasse et influe sur sa texture en suspension dans l'eau. De plus la nature hydrophobe de la lignine réduit la facilité de la bagasse à s'hydrater. La composition en acides phénoliques de la bagasse est résumée dans le tableau III.3. On observe la prépondérance de l'acide *p*-coumarique, ce qui est typique des graminées.

Tableau III.1. *Composition chimique de la bagasse de canne à sucre*

Polysaccharides	Teneur (% MS)
Cellulose[1]	45
Hémicellulose (xylose)[1]	26 (92)
Lignine[2]	20
Cendre	2.1
Autres composés (tels que les sels)	9

[1] : déterminé par HPLC ; [2] : déterminée par la méthode au bromure d'acétyle

Tableau III.2. *Composition en sucres monomères de la bagasse de canne à sucre* déterminéé par HPLC

Sucres monomères	Teneur (% MS)	Teneur (% paroi)
Glucose	46.03	31.7
Xylose	24.98	19.4
Arabinose	3.435	2.01
Galactose	0.687	0.50
Mannose	0.13	0.00

Tableau III.3. *Composition en acides phénoliques de la bagasse de canne à sucre* déterminéé par HPLC

Acides phénoliques	Teneur (mg/g paroi)
Acide *p*-coumarique[1]	16.4
Acide férulique[1]	4.1
Dimères d'acides féruliques[1]	3

Les traitements étant réalisés en milieu aqueux, il est donc important d'étudier le comportement de la bagasse vis-à-vis de l'eau. Ainsi, nous avons déterminé l'aptitude à absorber l'eau et le volume d'un échantillon de bagasse complètement hydraté (volume de gonflement) ainsi que l'isotherme de sorption de la vapeur d'eau.

III.1.3. Absorption d'eau et volume de gonflement

Les résultats obtenus ont montré une faible aptitude de la bagasse étudiée à absorber l'eau. En effet l'absorbance d'eau a été seulement de 6,165 ± 0,6 g d'eau/g MS, avec un volume de gonflement ne dépassant pas les 1,5 ml/g bagasse sèche.

La faible densité de la bagasse (492 ± 15 kg/m^3 (Rasul *et al.*, 1999)) et le faible volume d'eau associée rendent nécessaire l'utilisation d'un ratio solide/liquide faible pour assurer un bon traitement thermique en milieu aqueux.

III.1.4. Isotherme de sorption

III.1.4.1. Isotherme de sorption de la bagasse

L'isotherme de sorption de vapeur d'eau décrit le comportement d'un échantillon vis-à-vis d'une atmosphère de plus en plus saturée en eau et sa faculté à s'hydrater. Le passage de l'eau de l'atmosphère à l'échantillon est d'autant plus facile que sa structure est accessible (surface spécifique élevée) et sa composition est faible en composés hydrophobes.

La figure III.2 montre l'isotherme de sorption de la vapeur d'eau de la bagasse de canne à sucre.

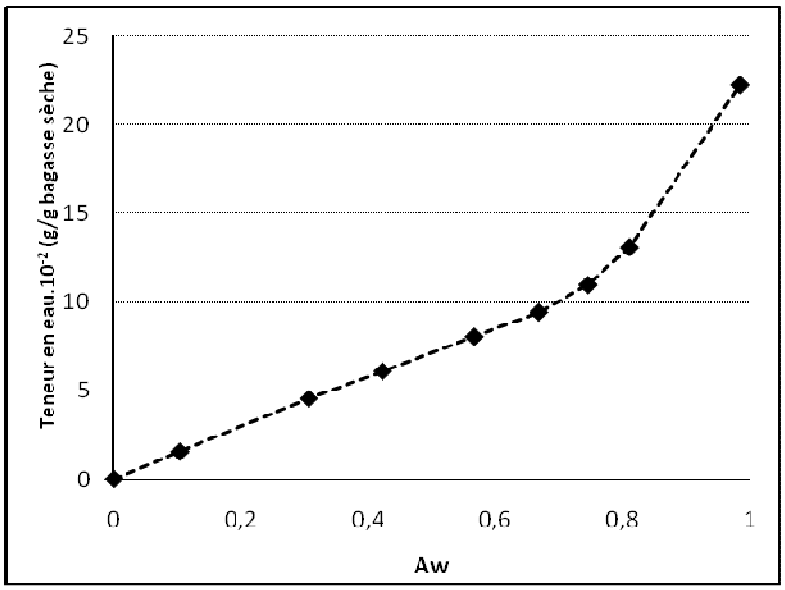


Figure III.2. *Isotherme de sorption de la bagasse de canne à sucre*

La teneur en eau maximale que peut fixer la bagasse est seulement de 0,27 g d'eau/g bagasse pour une atmosphère saturée en eau (aw=1). La forte teneur de la bagasse en lignine à caractère hydrophobe pourrait expliquer la tendance de la bagasse à ne pas fixer beaucoup d'eau. Ceci est en concordance avec les résultats précédents sur le volume de gonflement et la capacité d'absorption de l'eau.

En effet, pour des aw allant de 0 à 0,8 le niveau d'hydratation de la bagasse est faible (100 g de bagasse absorbe seulement 10 g d'eau pour une aw=0,8). Pour une valeur d'activité d'eau égale à 0.80, le gonflement de la bagasse favorise l'absorption de l'eau ce qui explique son hydratation rapide entre des activités d'eau allant de 0,8 à 1.

III.1.4.2. Eau de la couche monomoléculaire d'hydratation

La teneur en eau correspondant à la couche monomoléculaire d'hydratation est caractéristique de la nature des groupements à la surface des macromolécules. Cette teneur en eau désignée par M_1 est déterminée graphiquement par la méthode de l'équation de B.E.T. (Brunauer *et al.*, 1938).

L'exploitation de l'isotherme d'adsorption de vapeur d'eau de la bagasse selon la méthode de B.E.T. a permis d'obtenir la valeur suivante : M_1=0,022 g H2O/g bagasse à 20°C, cette teneur est très faible et pourrait être attribuée à la constitution des parois cellulaires de la bagasse à caractère hydrophobe (présence de lignine) et aussi insoluble (présence de cellulose).

La bagasse sèche est donc un substrat difficile à hydrater, d'où la nécessité de l'hydrater une nuit avant de procéder aux traitements hydrothermique ou enzymatique.

En effet, la bagasse à la sortie des moulins de sucrerie est saturée en eau d'où l'intérêt de l'intégrer directement dans un procédé de valorisation. L'implantation d'une unité de transformation au sein de la sucrerie permettant l'utilisation directe de la bagasse pourrait être intéressante d'un point de vue économique pour une éventuelle application industrielle : tout en évitant les charges de séchage d'une part et les coûts de sa réhydratation en cas de valorisation par traitement thermique en phase aqueuse d'autre part.

III.1.5. Utilisation de la bagasse de canne à sucre comme source de carbone dans les milieux de culture de plusieurs souches fongiques

La composition chimique du milieu de culture constitue un des paramètres les plus importants dans un processus de fermentation. En effet, la composition des milieux de culture utilisés est très variable selon les microorganismes et la nature de l'enzyme à produire. Les milieux de base contiennent essentiellement une source d'azote, une solution d'oligoéléments et une source de carbone qui est choisie selon l'enzyme à induire (Amouri, 2003). En général, la source de carbone peut être un substrat purifié comme le xylane pour la production d'activité xylanase ou la cellulose pour la production d'activité cellulasique. Ces substrats sont souvent chers et peu disponibles. La substitution de ces sources de carbone par des substrats bruts comme le son de blé constitue une alternative intéressante d'un point de vue économique. Cela permet également de trouver une voie de valorisation de la biomasse lignocellulosique comme inducteur de production d'enzyme par des microorganismes.

Dans cette optique, et dans le but d'étudier la capacité de la bagasse de canne à sucre à être utilisée comme source de carbone en milieu de culture des microorganismes en particulier de certaines souches fongiques pour la production d'enzymes xylanolytique et/ou cellulasique nous avons comparé le potentiel inducteur (d'activité enzymatique) de la bagasse avec des substrats purifiés (comme le xylane de bouleau ou la cellulose Avicel) et des substrats bruts tels que le son de blé qui est très utilisé et qui a été le substrat de choix dans de nombreuses études pour la production de cellulases et de xylanases par les champignons.

La mise en place d'une unité intégrée à l'usine pour la production des enzymes permet de réduire le coût des préparations enzymatiques et disposer de jus enzymatiques à activités ciblées. De plus, induire la production d'activité enzymatiques par des souches cultivées sur la bagasse elle même pourrait permettre l'expression d'enzymes mieux adaptées à sa transformation.

Dans un premier temps nous avons utilisé la bagasse, le son de blé et le xylane de bouleau comme ingrédients dans les milieux de culture des deux souches étudiées à une concentration de 2%. Les cinétiques de production d'activités β-glucosidase, xylanase et cellulases sont reportées respectivement dans les figures III.3, III.4 et III.5.

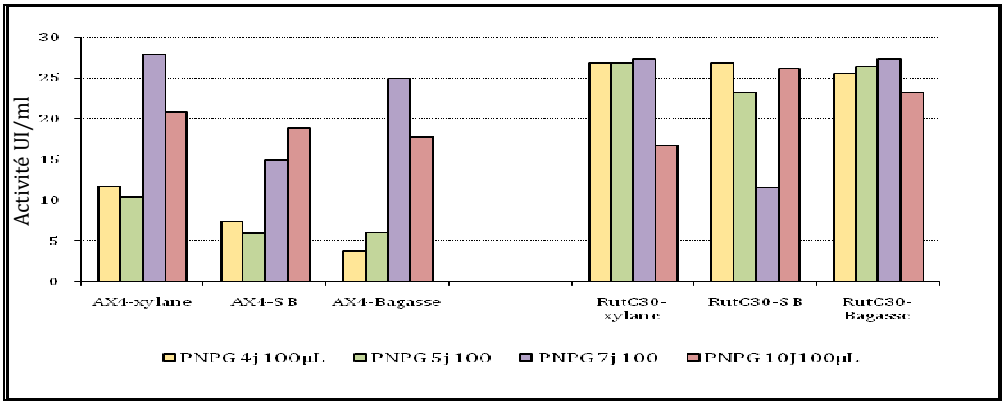


Figure III.3. *Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités pNPGase (exprimées en UI/ml) par les souches AX4 et RutC30*

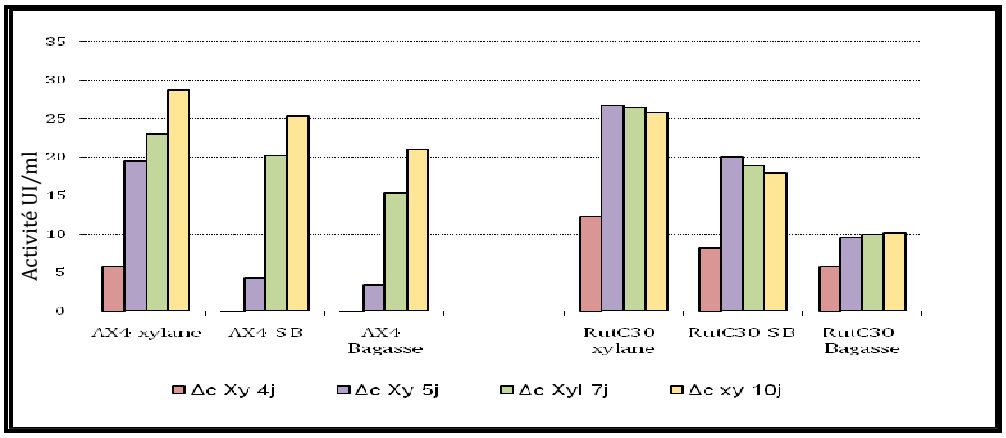


Figure III.4. *Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités xylanase (exprimées en UI/ml) par les souches AX4 et RutC30*

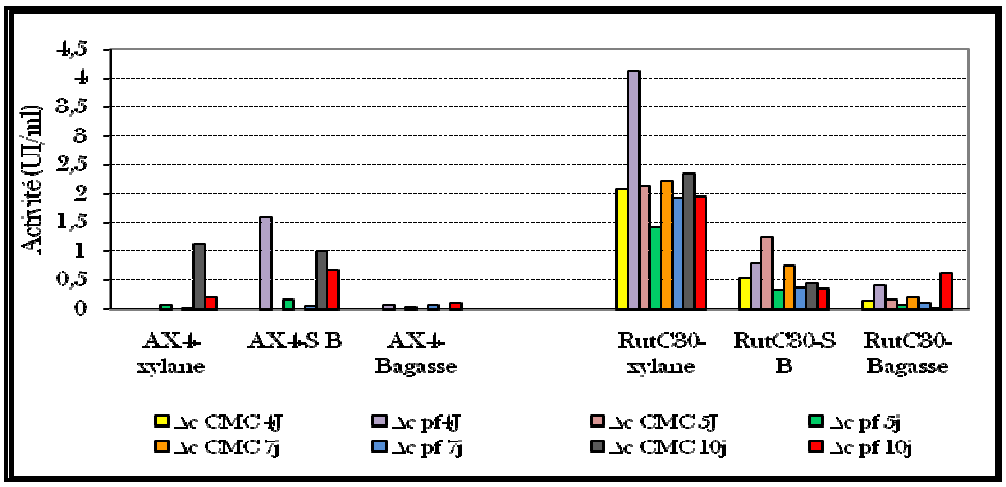


Figure III.5. *Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités CMCase (exprimées en UI/ml) par les souches AX4 et RutC30*

Les cinétiques de prodution enzymatique obtenues montrent que quelque soit la souche étudiée, l'utilisation de la bagasse de canne à sucre comme source de carbone en milieu de culture permet d'atteindre des niveaux de productions de β-glucosidase comparable à ceux obtenus en présence de xylane et plus élevés que ceux obtenus avec le son de blé.

La figure III.4 montre que l'utilisation de la bagasse permet d'induire la production d'activités xylanases avec des niveaux variables selon la souche utilisée. La production d'activité xylanase par la souche AX4 cultivée en présence de bagasse (22 UI/ml) est comparable à celle induite par le son de blé (25 UI/ml) et légèrement inférieure à celle obtenue en présence de xylane (28 UI/ml).

Quant aux activités cellulasiques, la figure III.5 montre des niveaux de productions supérieurs par la souche RutC30 comparée à la souche AX4 qui est dépourvue d'activités cellulases quelle que soit la source de carbone utilisée. Les valeurs négatives sur la figure III.5 sont considérées commes nulles et peuvent être expliquées par des valeurs trop faibles en activités pf et CMCases. Ces résultats s'expliquent par le fait que la souche RutC30 est un mutant qui surproduit les cellulases alors que la souche AX4 est sauvage et qui ne produit que des xylanases, elle semble être dépourvue d'activité cellulases (pf et CMCases).

Par ailleurs, le suivi du pH en fonction du temps de culture des deux souches présenté dans la figure III.6 montre une certaine stabilité entre 6 et 7 pour AX4 et 6 et 8 pour RutC30.

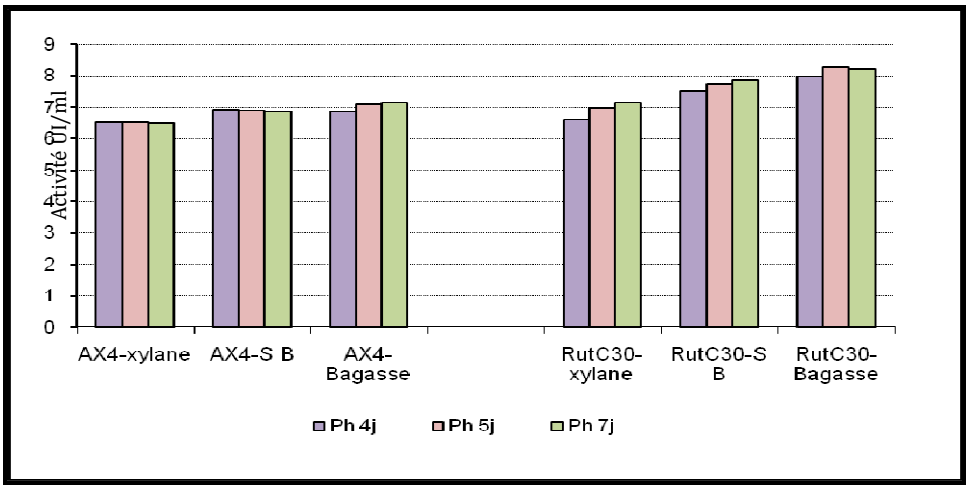


Figure III.6. *Variation du pH des milieux de culture des deux souches AX4 et RutC30 cultivées en présence de plusieurs sources de carbone (bagasse de canne à sucre, son de blé (SB) et xylane de bouleau).*

Ces résultats montrent bien la capacité de la bagasse de canne à sucre à être utilisée comme source de carbone pour cultiver des souches fongiques et de substituer des substrats carbonés couramment utilisés. Le pouvoir inducteur d'activité enzymatique dépend fortement de la souche étudiée et aussi de plusieurs paramètres liés au procédé de fermentation (liquide ou solide) ainsi qu'aux propriétés physico-chimiques du substrat comme sa concentration ou même sa granulométrie. Dans ce qui suit, nous présentons les résultats de l'étude de l'utilisation de la bagasse de canne à sucre pour cultiver chacune des deux souches étudiées : AX4 et RutC30.

III.1.5.1. Etude la cinétique de production d'enzymes par la souche AX4 cultivée en présence de la bagasse de canne à sucre

III.1.5.1.1. Culture en milieu liquide

a) Effet de la concentration de la bagasse de canne à sucre

Afin de déterminer l'effet de la concentration de la bagasse sur la cinétique de production des activités xylanasique et β-glucosidase de la souche AX4, plusieurs milieux de culture ont été utilisés contenant différentes concentrations de bagasse allant de 1 à 4%. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps de culture et les activités enzymatiques ont été déterminées selon les méthodes décrites dans l'annexe. Les résultats obtenus sont donnés dans les figures III.7 et III.8 et ont été comparés à ceux obtenus en présence du xylane de bouleau à 2% de concentration.

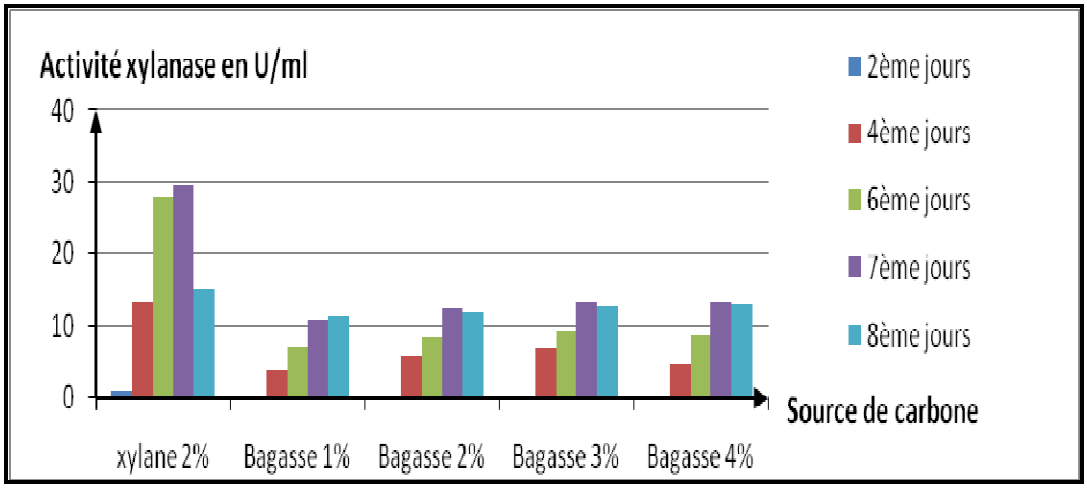


Figure III.7. *Effet de la concentration de la bagasse de canne à sucre sur la production d'activité xylanase par la souche AX4.*

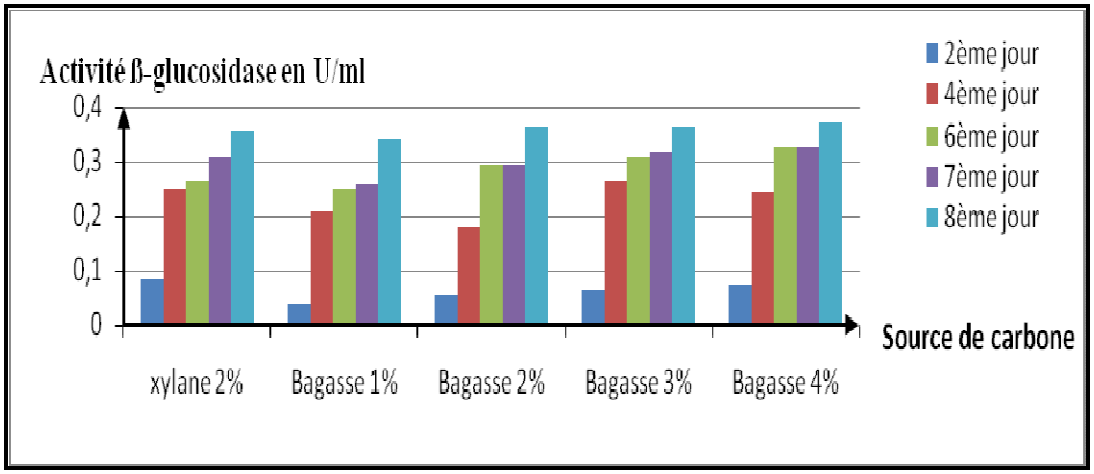


Figure III.8. *Effet de la concentration de la bagasse de canne à sucre sur la production d'activité β-glucosidase par la souche AX4.*

Les figures III.7 et III.8 montrent que pour les deux activités xylanase et β-glucosidase, la variation de la concentration de la bagasse dans le milieu de culture n'a pas d'effet significatif sur le taux de production de ces activités par la souche AX4. Une légère amélioration est observée à des concentrations de 3 et 4%. Ceci peut s'expliquer par la complexité structurale de la bagasse qui la rende difficilement assimilable par le microorganisme. L'hypothèse qu'on peut émettre est que les 8 jours de culture n'ont pas épuisé les 1% de bagasse.

La figure III.7 confirment l'effet inducteur de l'activité xylanase plus élevé du xylane, ceci revient au fait que c'est le substrat direct de cette activité. On note aussi que les niveaux de production de la β-glucosidase en présence de la bagasse sont équivalents à ceux obtenus avec le xylane (figure III.8). Pour la bagasse comme pour le xylane, le maximum d'activité xylanase est atteint au 7ème jour.

b) Effet de la granulométrie de la bagasse de canne à sucre

Afin de déterminer l'effet de la texture de la bagasse sur ses capacités inductrices d'expression des enzymes, la bagasse a été broyée puis tamisée en deux granulométries : une fine et une grossière dont les tailles des particules sont respectivement de l'ordre de 0,5 mm et 0,5 cm. La souche AX4 a été cultivée en milieu liquide en présence de chacune des deux fractions de la bagasse, les cinétiques de production des activités xylanase et β-glucosidase en fonction du temps de culture, ont été déterminées et sont représentées dans la figure III.9.

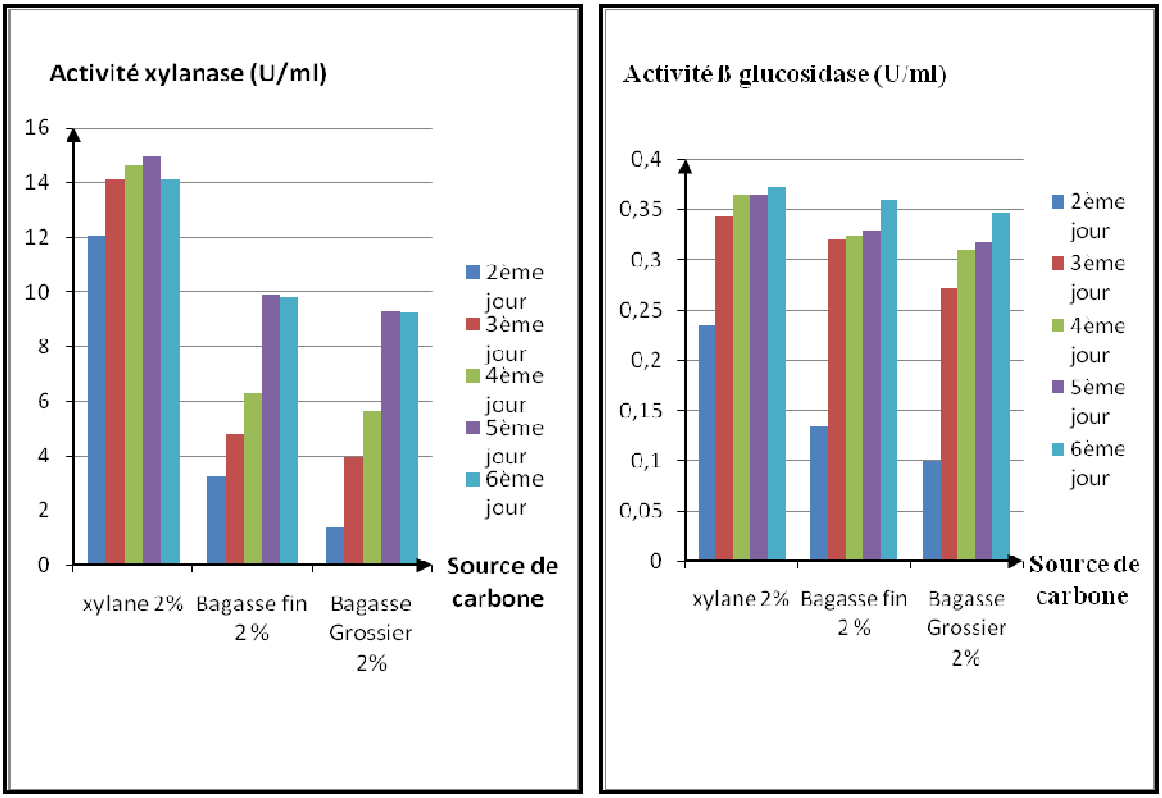


Figure III.9. *Effet de la granulométrie de la bagasse sur la production des activités xylanase et β-glucosidase par la souche AX4 cultivée en milieu liquide en présence de bagasse de la canne à sucre*

La granulométrie semble ne pas avoir un effet significatif sur le taux de production des activités enzymatiques. Cependant, travailler à granulométrie fine permet d'avoir une cinétique de production de xylanase plus rapide durant les premiers jours de culture (2ème- 4ème jour). Le taux de production étant pratiquement le même au bout du 6ème jour, il serait donc plus judicieux d'utiliser directement la bagasse sans broyage. Une légère amélioration par la fine granulométrie de la bagasse est observée pour l'activité β-glucosidase.

III.1.5.1.2. Fermentation en milieu solide (SSF)

La capacité inductrice de la bagasse de canne à sucre pour la production d'activités xylanasiques par la souche AX4 a été testée en fermentation solide et a été comparée à d'autres substrats lignocellulosiques plus utilisés : le son de blé et le son d'orge.

Les activités xylanases maximales correspondantes à chaque substrat utilisé ont été déterminées et sont représentées dans la figure III.10.

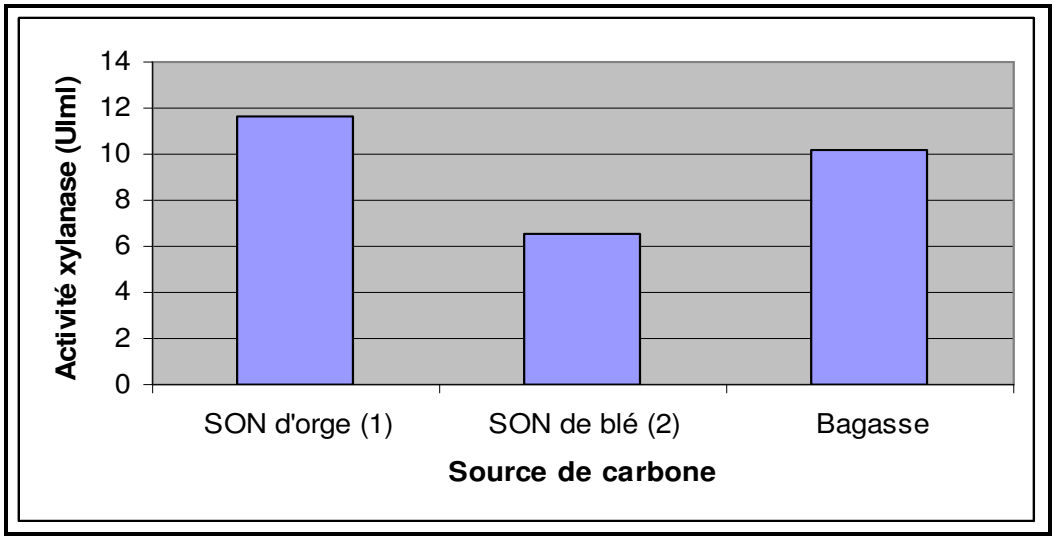


Figure III.10. *Production d'activité xylanase par la souche AX4 cultivée en milieu de fermentation solide en présence de plusieurs sources de carbone (bagasse de canne à sucre, son de blé et son d'orge)*

L'analyse de la figure III.10 montre bien que la bagasse en fermentation solide a permis la production d'une activité xylanase meilleure que celle obtenue en présence du son de blé et égale à celle obtenue en milieu liquide et légèrement inférieure à celle du son d'orge. Ceci est d'une très grande importance du fait que le son de blé a été pour longtemps utilisé comme substrat de choix pour la production de xylanase et son pouvoir inducteur a été bien reconnu. Ce résultat est très intéressant et montre bien que la bagasse peut être utilisée en fermentation solide pour la production de xylanase. Cette nouvelle voie de transformation offre une possibilité intéressante pour mieux valoriser la bagasse.

III.1.5.2. Etude de la cinétique de production d'enzymes par la souche RutC30 cultivée en présence de la bagasse de canne à sucre

Les cinétiques de production d'enzymes par la souche RutC30 cultivée en milieu liquide en présence de la bagasse de canne à sucre à différentes concentration (2, 3 et 4%) ont été déterminées et ont été comparées à celles des cultures en présence de cellulose, de xylane et de son de blé (à 2%). Les résultats illustrés dans les figures III.11, III.12, III.13 et III.14 correspondantes respectivement à la production d'activités β-glucosidase, xylanase, CMCase et cellulases totales confirment ceux déjà obtenus (figures III.3, III.4 et III.5).

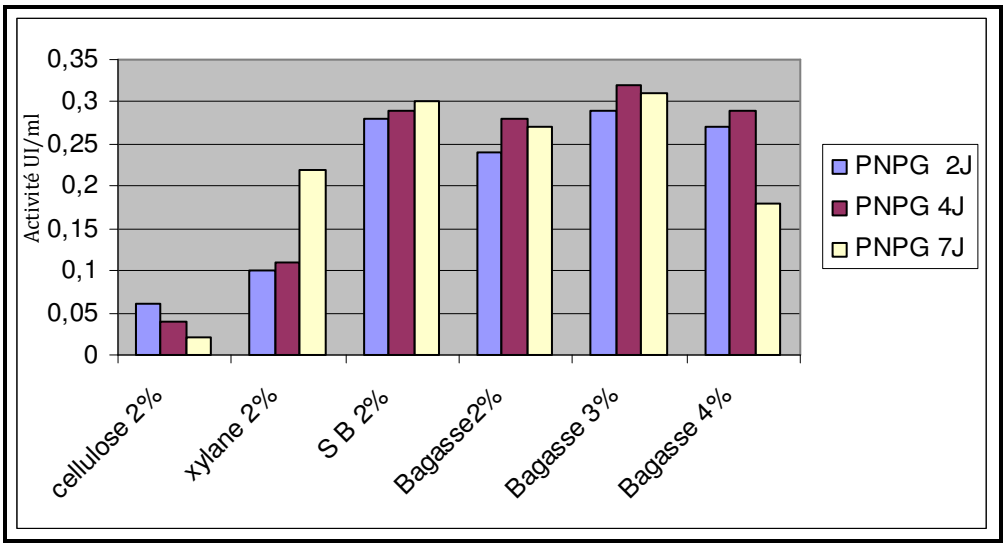


Figure III.11. *Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités pNPGases (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 cultivée en milieu liquide en présence de plusieurs sources de carbone (bagasse de canne à sucre, son de blé (SB), xylane, cellulose d'Avicel).*

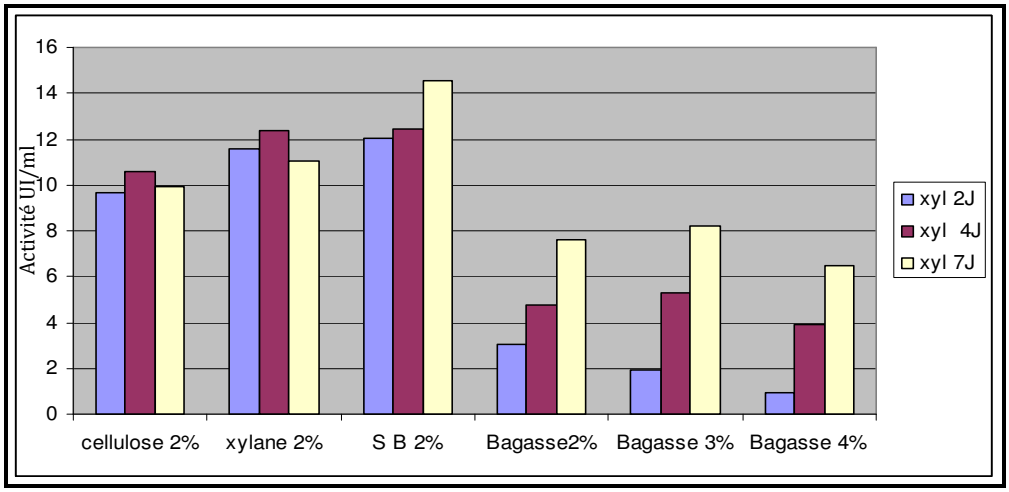


Figure III.12. *Effet de la source de carbone sur la cinétique de production des activités xylanases (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 cultivée en milieu liquide en présence de plusieurs sources de carbone (bagasse de canne à sucre, son de blé (SB), xylane, cellulose d'Avicel).*

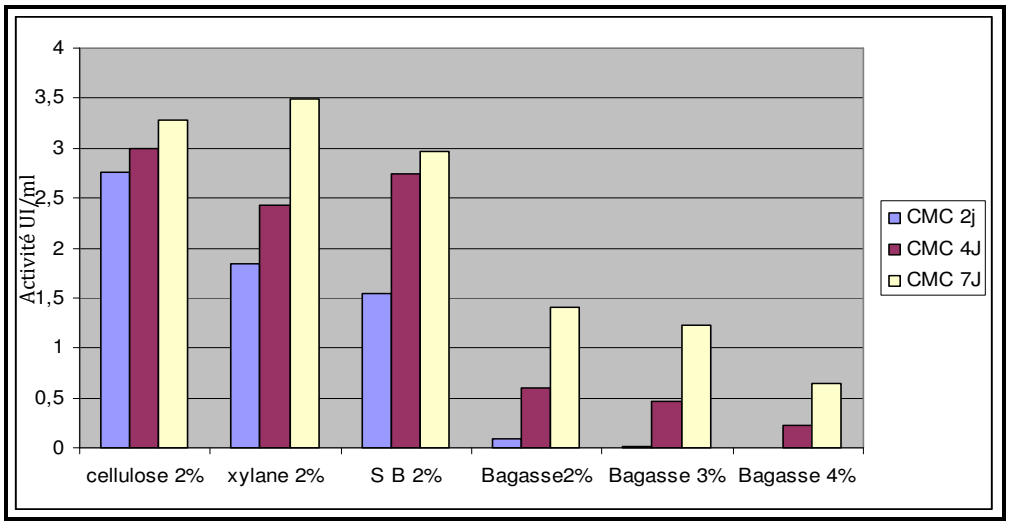


Figure III.13. *Effet de la source de carbone (bagasse de canne à sucre, cellulose d'avicel et xylane de bouleau) sur la cinétique de production des activités CMCases (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 cultivée en milieu liquide.*

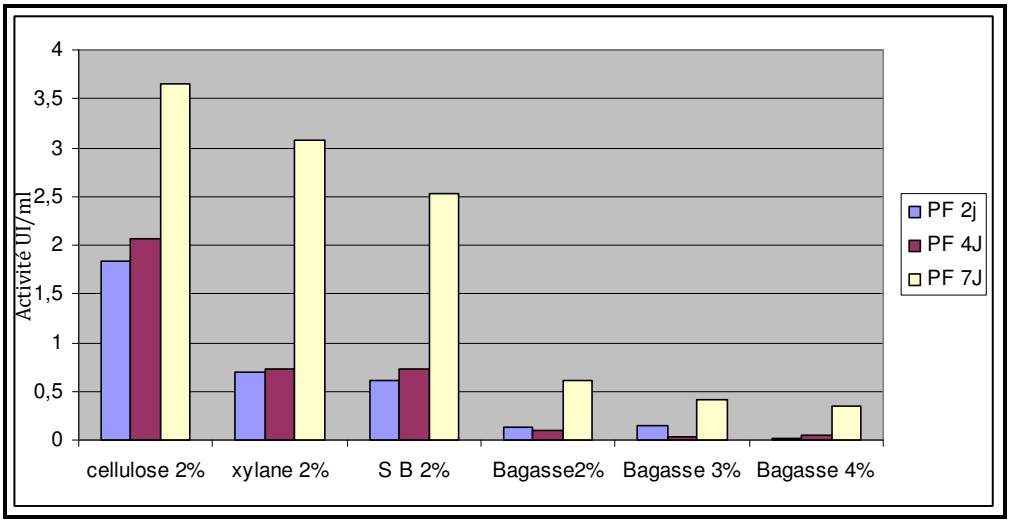


Figure III.14. *Effet de la source de carbone (bagasse de canne à sucre, cellulose d'avicel et xylane de bouleau) sur la cinétique de production des activités cellulases totales ou pf (exprimées en UI/ml) par la souche RutC30 cultivée en milieu liquide.*

L'analyse de la figure III.11 montre que l'activité β-glucosidase est toujours fortement induite par la bagasse avec un maximum de 0,3 UI/ml obtenu dans le cas de l'utilisation de la bagasse à 3% et qui est égale au niveau d'induction du son de blé. Le pouvoir inducteur de la bagasse dans le cas de RutC30 dépasse même celui du xylane et de la cellulose.

La figure III.12 représentant les cinétiques de production des xylanases montre que la bagasse induit la libération de xylanase avec un taux maximal de 8 UI/ml correspondant à une concentration de 3% de la bagasse. La production de xylanase dans ce cas est inférieure à celle obtenue dans le cas de son de blé, du xylane et de la cellulose.

Les figures III.13 et III.14 confirment le faible pouvoir inducteur de cellulases par la bagasse.

III.1.5.3. Conclusion

Le pouvoir inducteur de la bagasse a été mis en évidence. Il a été trouvé variable suivant l'enzyme étudiée.

La fermentation en milieu liquide a en effet montré le grand pouvoir inducteur de la bagasse vis à vis de la production de la béta-glucosidase et ceci est valable pour les deux souches utilisées. Ce résultat a été aussi conforté par l'étude d'une troisième souche appartenant à un troisième genre (la souche A19 de *Stachybotrys microspora*, Amouri et Gargouri, 2006) qui a également montré de grandes aptitudes à produire les activités β-glucosidase sur bagasse (résultats non montrés ici).

Du point de vue pouvoir d'induction de xylanase, la souche AX4 a permis d'atteindre des niveaux comparables à ceux obtenus en présence de son de blé alors que la souche RutC30 a généré des taux plus faibles. Le xylane étant le substrat modèle des xylanases a permis d'indure la plus forte production de ces dernières.

Les activités cellulases étaient faibles en présence de la bagasse pour les deux souches étudiées, avec une production des activités CMCases et pf nettement supérieures dans la souche RutC30.

Un résultat prometteur a été mis en évidence en cas de fermentation solide de la bagasse. Les niveaux d'induction de xylanases étaient largement supérieurs à ceux obtenus en cas d'utilisation du son de blé.

III.2. Enzymes utilisées

Les enzymes utilisées sont d'une part une endo-xylanase de *Bacillus xylanolyticus* purifiée par l'équipe INRA de l'UMR FARE (appelée xylanase INRA) et un surnageant de culture d' *Humicola insolens* fourni par la Société Roquette Frères contenant une endo-xylanase (appelée xylanase Roquette) ainsi qu'un surnageant de *Trichoderma Reesei*, fourni également par Roquette (appelé béta-xylosidase).

III.2.1. Caractérisation de la xylanase INRA

III.2.1.1. Etude de la cinétique de la xylanase INRA sur substrat modèle

L'étude de la cinétique enzymatique de l'endo-xylanase purifiée (xylanase INRA) a été réalisée en la faisant agir sur son substrat modèle qui est le xylane soluble de bouleau. La vitesse initiale de l'enzyme correspondant à son activité maximale a été suivie à des intervalles de temps réguliers (toutes les 2 minutes) et sur les 20 premières minutes de réaction enzymatique. Les conditions permettant la détermination de la vitesse initiale de la réaction enzymatique correspondent à un niveau de faible degré de transformation du substrat (peu de produits libérés). En pratique, on introduit un large excès de substrat pour de faibles quantités d'enzyme ; ce qui correspond à un rapport Enzyme/Substrat très faible. La pente de la droite, donnant la quantité de produit libérée en fonction du temps, est maximale et représente la vitesse initiale.

L'enzyme a été utilisée dans les conditions de son activité optimale : dans le tampon acétate de sodium 50 mM pH 5,8 et à 60°C.

La détermination de l'activité enzymatique à été réalisée par mesure des teneurs en extrémités réductrices libérées sous l'action de l'enzyme selon la méthode dérivée de celle de Kidby et Davidson (1973).

III.2.1.1.1. Détermination de la concentration optimale d'enzyme

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la xylanase dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat.

L'hydrolyse a été réalisée avec une concentration saturante en substrat, soit 5 g/L de volume réactionnel et une concentration en enzyme allant de 0 à 0,5 UI/ml de volume réactionnel.

La figure III.15 représente l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du xylane de bouleau par la xylanase INRA en fonction de la concentration de l'enzyme.

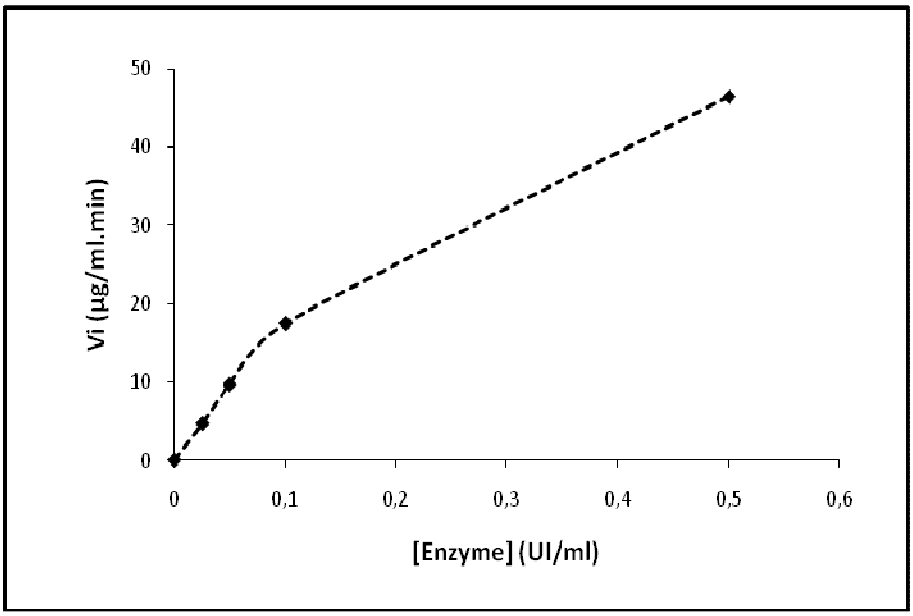


Figure III.15. *vitesse initiale de l'hydrolyse du xylane de bouleau en fonction de la concentration l'endo-xylanase purifiée (INRA)*

D'après cette expérience, nous avons choisi la concentration 0,05 UI/ml comme étant convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme. Cette valeur est en accord avec celle adoptée à l'UMR FARE par (Benamrouche-Stitou, 2002),

III.2.1.1.2. Détermination des constantes cinétiques de la xylanase INRA

L'activité de la xylanase INRA a été déterminée en faisant varier la concentration du substrat de 0 à 15 g/L et à une concentration enzymatique fixe (0,05 UI/ml). Pour chaque concentration de substrat, l'activité est mesurée en quantifiant les extrémités réductrices libérées à des intervalles de temps réguliers (toutes les 2 minutes). Les paramètres cinétiques, constante de Michaelis (K_M) en g/L et la vitesse initiale maximale (V_M) en µg/ml.min, sont obtenus selon la méthode des doubles inverses (Lineweaver-Burk) représentant 1/Vi = f (1/[S]). La représentation permet l'obtention d'une droite dont l'équation est de la forme y=ax+b avec Km= a/b et Vm=1/b.

La figure III.16 représente l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du xylane de bouleau par la xylanase INRA en fonction de la concentration en substrat (a) ainsi que la

représentation de Lineweaver-Burk correspondante (b) et à partir de laquelle nous avons déterminé les paramètres cinétiques.

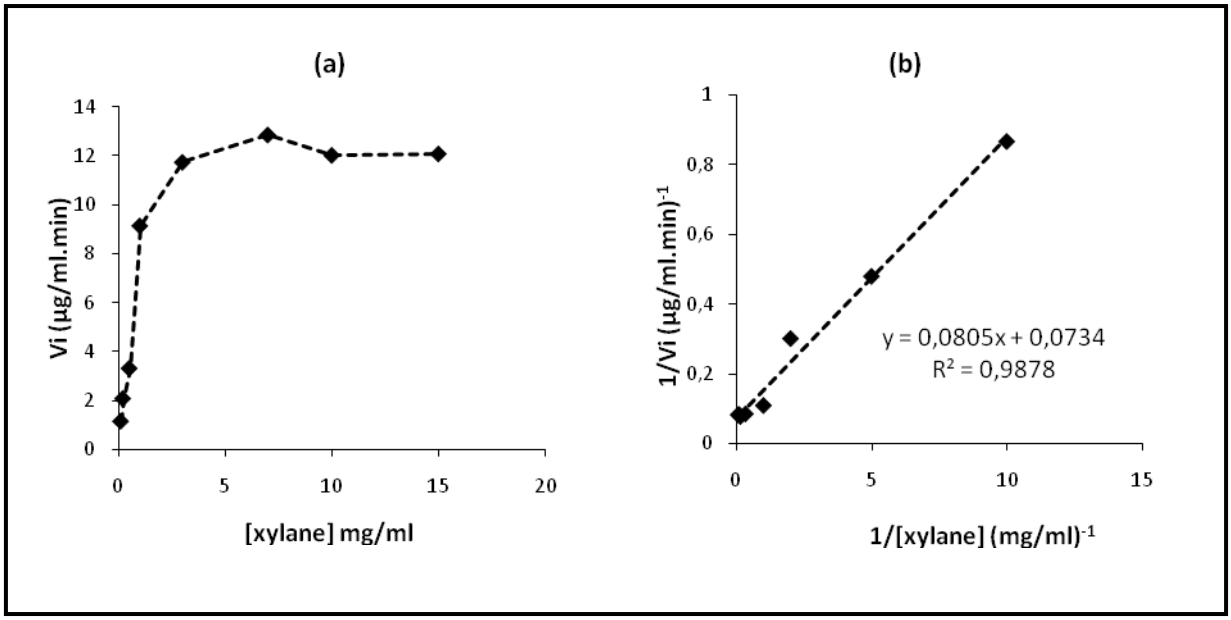


Figure III.16. *Evolution de la vitessse intiale de la xylanase purifiée (INRA) en fonction de la concentration de substrat (a) et représentation de Lineweaver-Burk correspondante (b)*

Les paramètres cinétiques de la xylanase *(INRA)* purifiée agissant sur le xylane soluble de bouleau ainsi obtenus, sont donnés dans le tableau III.4 :

Tableau III.4. *Paramètres cinétiques de la xylanase purifiée (INRA) sur le xlane de bouleau à 60°C*

Vm (µg/ml.min)	13,623
Km (g/L)	1,096

Au cours de cette étude nous avons décelé une instabilité de l'activité enzymatique de la xylanase INRA étudiée. En effet, nous avons observé que l'enzyme diluée (100 fois) perd énormément de son activité en fonction du temps (70% de son activité au bout de 10 jours) même quand elle est conservée à 4°C. Cette perte d'activité est rapide et peut se faire dés les premières heures de sa préparation (figure III.17).

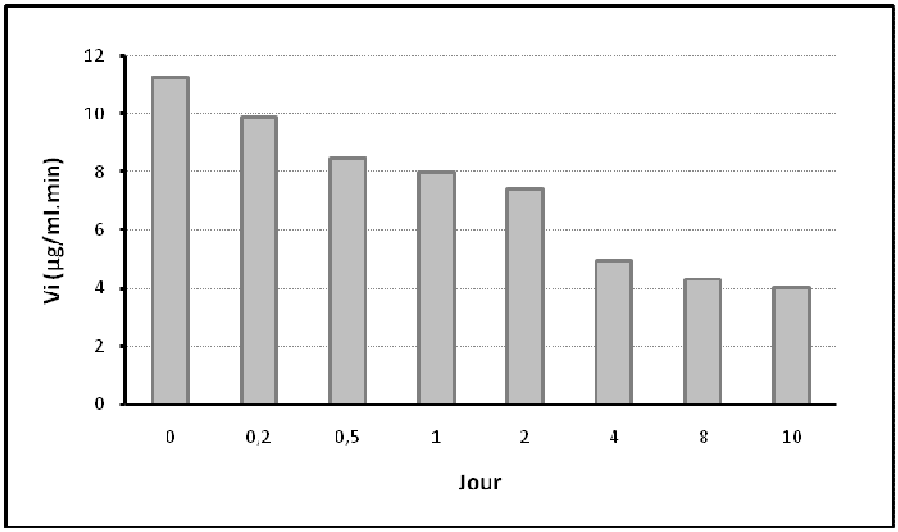


Figure III.17. *Evolution de la vitesse initiale de la xylanase (INRA) purifiée diluée 100 fois sur une période de 10 jours d'incubation à 4°C*

A la lumière de ces résultats et afin de pallier la perte d'activité enzymatique, nous avons opté pour la préparation de la dilution de l'enzyme juste avant son utilisation.

III.2.1.2. Effet de certains additifs dépresseurs de l'activité de l'eau sur l'activité enzymatique

La xylanase de l'INRA, bien que très active sur du xylane de bouleau pur, s'est avérée instable dans le temps. Pour remédier à cette instabilité, nous avons pensé que l'ajout d'additif solvactivateur (Mejri et Mathlouthi (2001) pouvait stabiliser cette activité et nous assurer une utilisation de cette enzyme reproductible dans le temps. Les additifs généralement utilisés pour conserver les enzymes sont des sucres, des polyols ou le glycérol.

Nous avons utilisé le glycérol et le sorbitol comme additifs pouvant améliorer la stabilité de l'activité enzymatique. En effet, le rôle activateur des sucres et des polyols a été rapporté par plusieurs travaux. En particulier, Mejri et Mathlouthi (2001) et Mejri *et al.* (1998) ont montré que le glycérol et le sorbitol agissent comme solvactivateur ou solvinhibiteur suivant la concentration dans certaines réactions enzymatiques. Cet effet dépend fortement de leurs concentrations dans le milieu et à chaque additif correspond une concentration seuil qui elle même varie avec l'enzyme étudiée.

Nous avons d'abord vérifié que le glycérol et le sorbitol à faible concentration n'ont pas d'effet inhibiteur significatif sur l'activité de la xylanase de l'INRA. Par la suite, différentes concentrations de sorbitol et de glycérol permettant d'atteindre des activités d'eau faibles simulant

un milieu réactionnel très concentré (milieu pâteux) ont été choisies à partir de la littérature (Ninni *et al.*, 2000) (Table III.5).

Tableau III.5. *Concentrations du glycérol et du sorbitol utilisées et les activités d'eau correspondantes* (Ninni *et al.*, 2000)

Aw	[Sorbitol] (% m/m)	[Glycérol] (% m/m)
0,95	34,78	20
0,92	44,68	30
0,87	54,66	40
0,8	65,57	50

Le sorbitol et le glycérol ayant des propriétés différentes (poids moléculaire, interactions avec l'eau et nombre de groupements hydroxyles différents). Pour une même concentration, ces deux polyols n'induisent pas le même effet dépresseur d'activité d'eau.

Les résultats obtenus sont représentés dans la figure III.18 qui montre l'évolution de l'activité enzymatique relative (déterminée par rapport à son activité au milieu tampon sans l'ajout de l'additif) en fonction de l'aw.

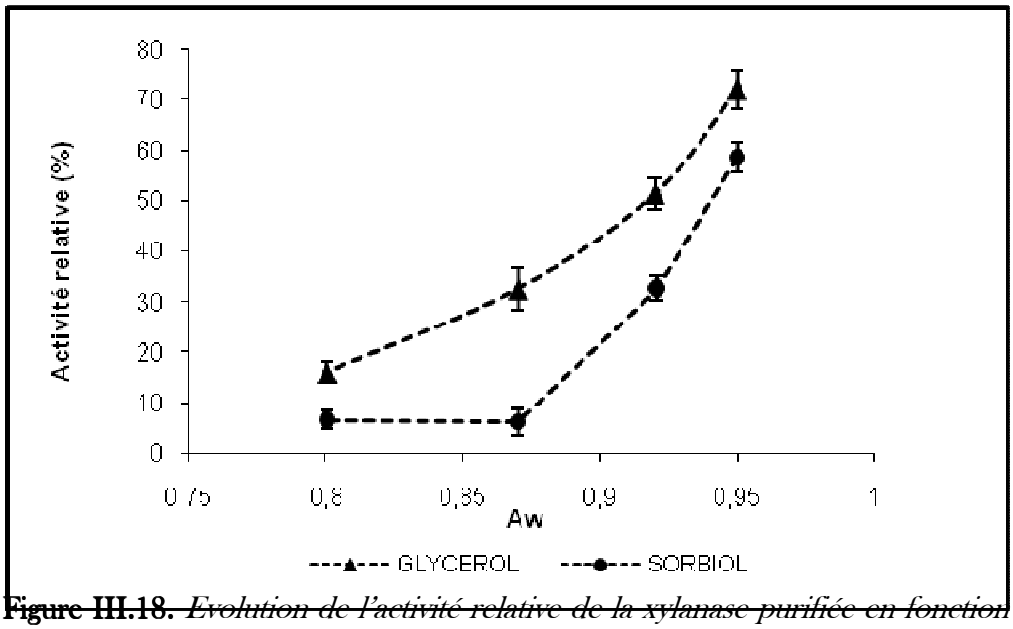


Figure III.18. *Evolution de l'activité relative de la xylanase purifiée en fonction de l'aw et en présence de polyols.*

Ces résultats montrent que quelque soit le polyol, l'activité enzymatique augmente en fonction de l'activité de l'eau du milieu réactionnel, mais reste inférieure à celle sans additif. Il existe un léger écart entre la baisse d'activité en présence du glycérol et celle en présence du sorbitol qui pourrait s'expliquer par la nature de l'additif (son poids moléculaire, le nombre de groupements hydroxyles et les interactions avec l'eau) ainsi que par la différence de la viscosité du milieu. En effet, pour une même awles deux polyols ne contribuent pas à la même viscosité du fait de la différence de leurs concentrations. Les mesures de la viscosité des solutions de glycérol et du sorbitol sont données dans le tableau III.6.

Tableau III.6. *Viscosités correspondantes aux différentes concentrations des polyols utilisés*

SORBITOL		GLYCEROL	
Concentration (% m/m)	*Viscosité (mPa.s)*	*Concentration (% m/m)*	*Viscosité (mPa.s)*
34,78	5,98	20	1,70
44,68	13,39	30	2,30
54,66	30	40	3,55
65,57	51	50	6,66

- *Effet des polyols étudiés sur la stabilité de l'activité enzymatique*

Dans le but d'étudier l'effet stabilisateur possible des polyols utilisés, la xylanase INRA diluée 100 fois a été incubée à température ambiante dans des solutions de sorbitol et de glycérol à 30%. L'activité xylanolytique a été par la suite mesurée à des temps d'incubation différents. Les résultats obtenus ont été exprimés en termes d'activité relative correspondante au rapport de l'activité mesurée sur l'activité initiale et sont représentés dans la figure III.19.

L'allure de la courbe représentant l'activité relative de l'enzyme en présence du sorbitol est comparable à celle de l'enzyme seule. Ceci permet de conclure que le sorbitol n'améliore pas la stabilité de la xylanase INRA, alors que le glycérol a permis une stabilisation de l'activité enzymatique sur l'intervalle de temps étudié (figure III.19). Une augmentation de l'activité relative de l'enzyme en présence du glycérol a été également observée. En effet, l'enzyme garde une activité supérieure à celle observée sans additif (activité relative>1) pendant les 5 premières heures d'incubation. Cette légère augmentation de l'activité peut être associée à un effet activateur du glycérol. Cependant, l'apport de cette activation est annulé par la tendance de l'enzyme diluée à perdre une partie de son activité au cours du temps.

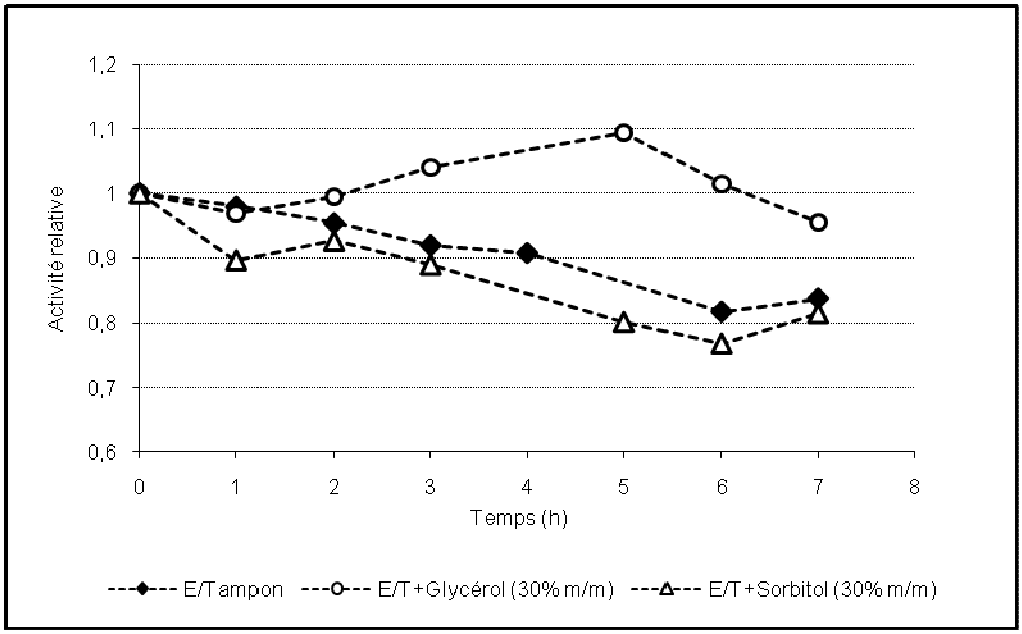


Figure III.19. *Etude de la stabilité de la xylanase en fonction du temps d'incubation à température ambiante et en présence de plusieurs additifs (avec E : enzyme, T : tampon, G : glycérol, S : sorbitol).*

L'enzyme étant très active (pouvant aller jusqu'au 1000 UI/ml) l'apport de l'activation par le glycérol durant les premières heures d'incubation peut être négligé. Sur le plan industriel, il est donc préférable de travailler avec l'enzyme seule pour éviter une éventuelle étape d'élimination du glycérol.

III.2.2. Hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée (INRA)

III.2.2.1. Effet de la granulométrie de la bagasse sur la xylanase INRA

Le tamisage de la bagasse broyée a permis de séparer différentes fractions de plusieurs granulométries comprises entre celles inférieures à 0,1 mm et celles qui sont supérieurs à 0,8 mm. Ces différentes fractions ont été hydrolysées par la xylanase INRA à 10 UI/ml. Les hydrolysats obtenus ont été analysés par la méthode au phénol sulfurique, les rendements de l'hydrolyse obtenus en fonction de chaque granulométrie sont présentés dans la figure III.20.

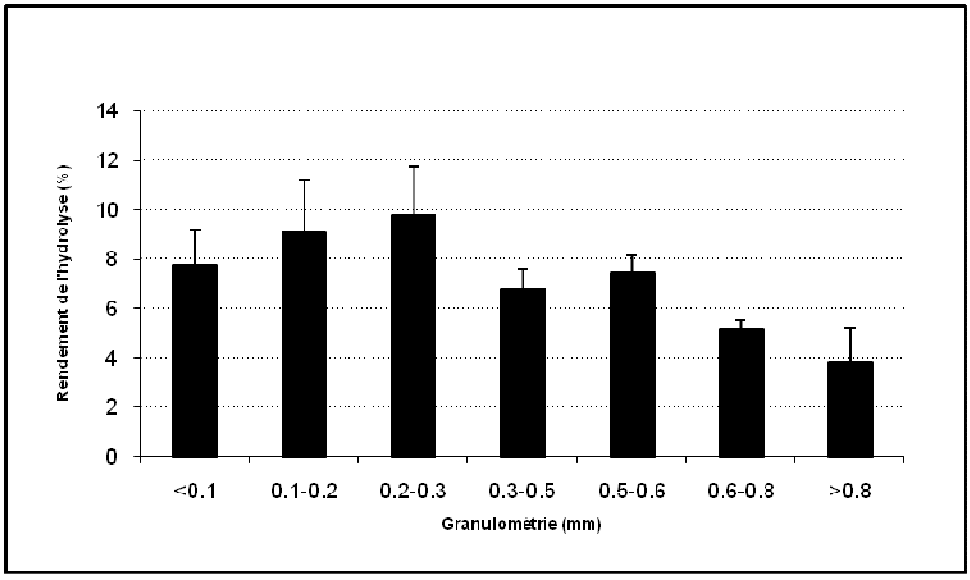


Figure III 20. *Effet de la granulométrie sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre par une endoxylanase purifiée.*

Le rendement le plus élevé est obtenu pour une granulométrie entre 0,2-0,3 mm. La fraction ayant une granulométrie supérieure à 0,8 mm est la plus difficile à hydrolyser. Du fait de l'intérêt industriel de ce travail nous avons choisi de réaliser l'étude de l'hydrolyse enzymatique de la bagasse sur tout le lot (toutes les fractions) obtenues après broyage.

III.2.2.2. Nature des produits d'hydrolyse

Les produits d'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée (INRA) (10UI/ml) pendant 24 heures ont été analysés par Chromatographie sur Couche Mince (figure III.21). Le chromatogramme obtenu révèle la présence du xylose, xylobiose et du xylotriose comme produits majoritaires.

L'action de la xylanase sur la bagasse de canne à sucre, comparée à d'autres substrats lignocellulosiques (drêches de brasserie, rafles de maïs) permet de libérer la même nature de produits d'hydrolyse (des xylooligosaccharides) après 24 heures d'hydrolyse, ce qui est dû au même mécanisme d'action de l'enzyme sur les xylanes des différents substrats lignocellulosiques. Les xyloligosaccharides de DP2 à 4 sont les produits finaux de la réaction enzymatique.

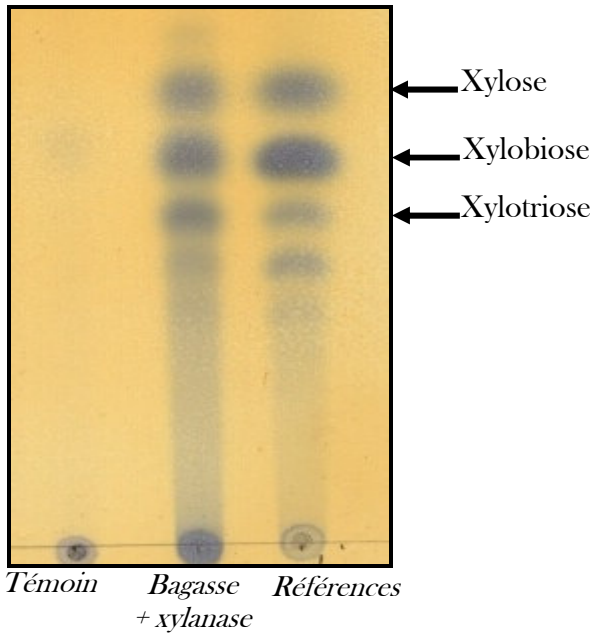


Figure III.21. *Chromatographie sur couche mince de l'hydrolysat de la bagasse de canne à sucre obtenu par hydrolyse enzymatique par la xylanase de Bacillus xylanilyticus*

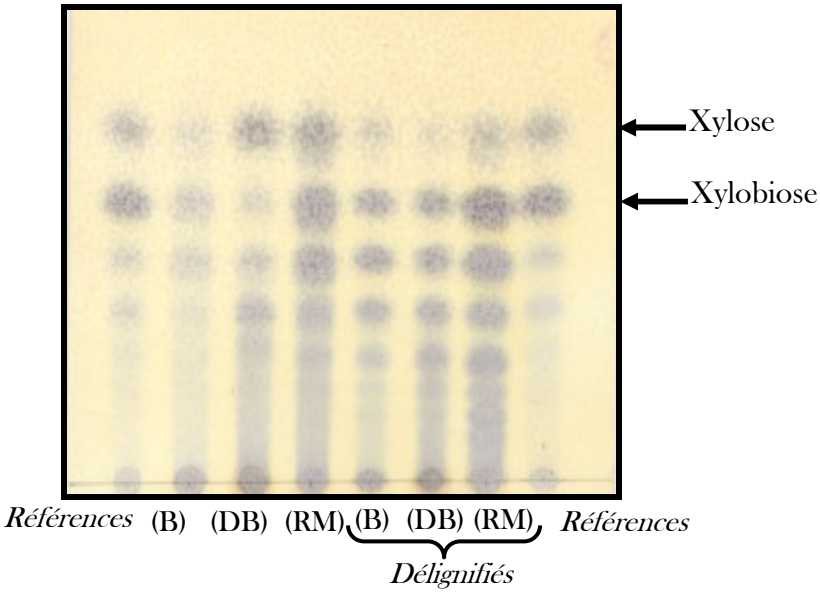


Figure III.22. *Chromatographie sur couche mince des hydrolysats de bagasse de canne à sucre (B), de drêches de brasserie (DB) et de rafles de maïs (RM) obtenus par hydrolyse enzymatique par la xylanase de Bacillus xylanilyticus avec et sans délignification.*

La présence de xylose dans les chromatogrammes correspondant aux hydrolysats des différents matériaux lignocellulosiques et sa disparition dans les hydrolysats correspondant à ces substrats délignifiés (Figure III.22) permet de suggérer que sa libération pourrait être due à la présence d'activité β-xylosidase endogène dans ces substrats particulièrement dans la bagasse de canne à sucre. Le traitement à l'ammoniaque permettrait l'inactivation de cette activité ce qui expliquerait la diminution de l'intensité des bandes correspondant au xylose. La présence de traces de xylose dans les chromatogrammes des substrats délignifiés permet aussi de suggérer que l'enzyme peut libérer le xylose à partir de xylooligosaccharides issus de l'hydrolyse et non pas directement de la bagasse (c'est le cas aussi pour les autres substrats lignocellulosiques). Le même phénomène a été observé par Zilliox et Debeire (1998) pour la paille de blé chauffée à 100°C pendant 10 min avant son hydrolyse par cette xylanase, les auteurs ont obtenu des xylooligosaccharides DP2 à 4 comme produits finaux de réaction, avec une faible quantité de xylose, ce qui leur a permis de suggérer la présence d'une activité β-xylosidase dans la paille de blé responsable de la libération du xylose à partir des xylooligosaccharides hydrolysés.

Nous avons donc procédé à un autoclavage (121°C pendant 1heure) de la bagasse avant de l'hydrolyser par voie enzymatique afin de stériliser la bagasse et inactiver toute activité enzymatique qui peut se superposer à l'activité étudiée.

III.2.2.3. Effet de la concentration de l'enzyme sur le rendement de l'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre

La bagasse autoclavée (20 g/L) a été hydrolysée par la xylanase INRA à différentes concentrations allant de 1,4 à 14 UI/ml de volume réactionnel. Le choix de ces concentrations a été basé sur des travaux antérieurs de Zilliox (1996) réalisés sur l'hydrolyse de la paille de blé par la même xylanase. L'auteur a montré qu'une concentration de 14UI/ml était suffisante pour atteindre un rendement d'hydrolyse maximal. Nous avons fait le choix de travailler dans les mêmes conditions du fait de la composition de la bagasse très semblable à celle de la paille de blé.

Nous avons testé une autre concentration de 86,86 UI/ml pour s'assurer d'avoir atteint un rendement maximal d'hydrolyse.

Pour chaque concentration d'enzyme étudiée, les hydrolysats obtenus ont été analysés par HPLC et par la méthode au phénol sulfurique.

III.2.2.3.1. Analyse des hydrolysats par la méthode au phénol sulfurique

La figure III.23 représente l'évolution en fonction du temps de la concentration des sucres totaux en fonction du temps d'hydrolyse de la bagasse pour les différentes concentrations enzymatiques.

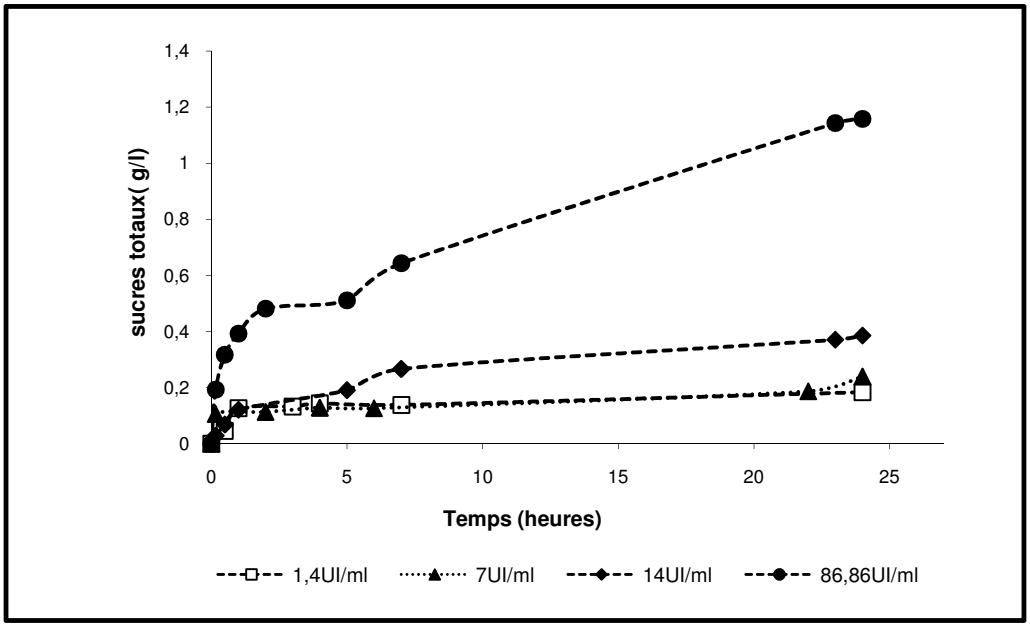


Figure III. 23. *Cinétiques d'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée en fonction de temps d'incubation (h). La concentration en substrat est constante (20g/l) et la concentration en enzyme varie entre 1,4 et 86,86 UI/ml. La réaction enzymatique a lieu à 60C° pendant 24 heures.*

La concentration en sucres totaux obtenue pour des concentrations d'enzyme entre 1,4 et 14 UI/ml était relativement faible. L'utilisation de la concentration de 86,86 UI/ml a permis d'avoir des concentrations en sucres totaux largement supérieures à celles obtenues par 14 UI/ml. La libération des sucres totaux suit une cinétique rapide durant les 3 premières heures de réaction enzymatique suivie d'un ralentissement des vitesses d'hydrolyse. Un temps de 24 heures n'a pas permis d'atteindre le maximum d'hydrolyse.

III.2.2.3.2. Analyse par HPLC

L'analyse par HPLC des hydrolysats enzymatiques nous a permis de déterminer le rendement de l'hydrolyse des arabinoxylanes de la bagasse par la xylanase INRA. Les rendements obtenus pour chacune des concentrations d'enzyme étudiées sont représentés dans la figure III.24.

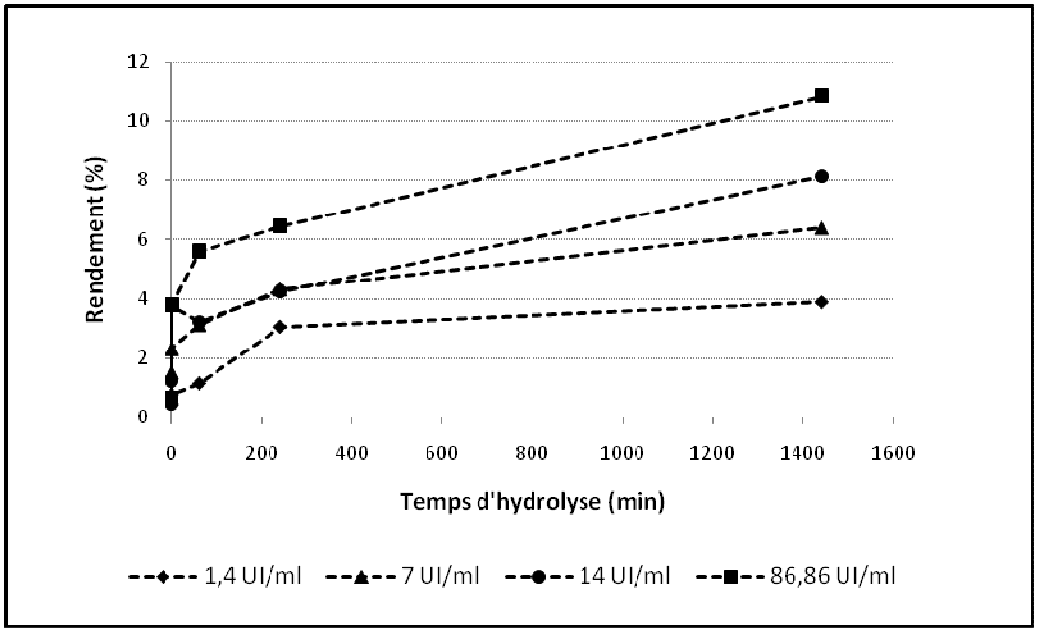


Figure III.24. *Cinétiques d'hydrolyse des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée (exprimé en % d'arabinoxylane dégradé par rapport à la quantité d'arabinoxylanes présents dans le substrat) en fonction de temps d'incubation (analyse réalisée par HPLC)*

Un maximum de rendement d'hydrolyse de 10% a été atteint avec la concentration enzymatique de 86,86 UI/ml de volume réactionnel. Ce rendement est faible et montre bien la difficulté de la xylanase INRA à agir sur la paroi lignocellulosique de la bagasse de canne à sucre. Un prétraitement de cette dernière serait donc indispensable afin d'améliorer la susceptibilité de la bagasse à l'hydrolyse enzymatique par cette xylanase.

III.2.2.4. Effet de la délignification sur l'hydrolyse enzymatique

L'efficacité de l'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase purifiée a été comparée à d'autres substrats lignocellulosiques : les rafles de maïs et les drêches de brasserie, et l'effet de la délignification sur les rendements de l'hydrolyse a été déterminée. La délignification a été réalisée par traitement à l'ammoniaque à température ambiante. Les réactions d'hydrolyse enzymatique des différents substrats non traités et délignifiés (20 g/L) ont lieu pendant 24 heures à 60°C avec une concentration enzymatique de 20 UI/ml volume réactionnel. La quantification des sucres totaux des hydrolysats obtenus a été réalisée par la méthode au phénol sulfurique. Les rendements, exprimés en % d'arabinoxylanes dégradés par rapport à la quantité d'arabinoxylanes

présents dans le substrat avec et sans délignification, ont été calculés et sont donnés dans la figure III.25.

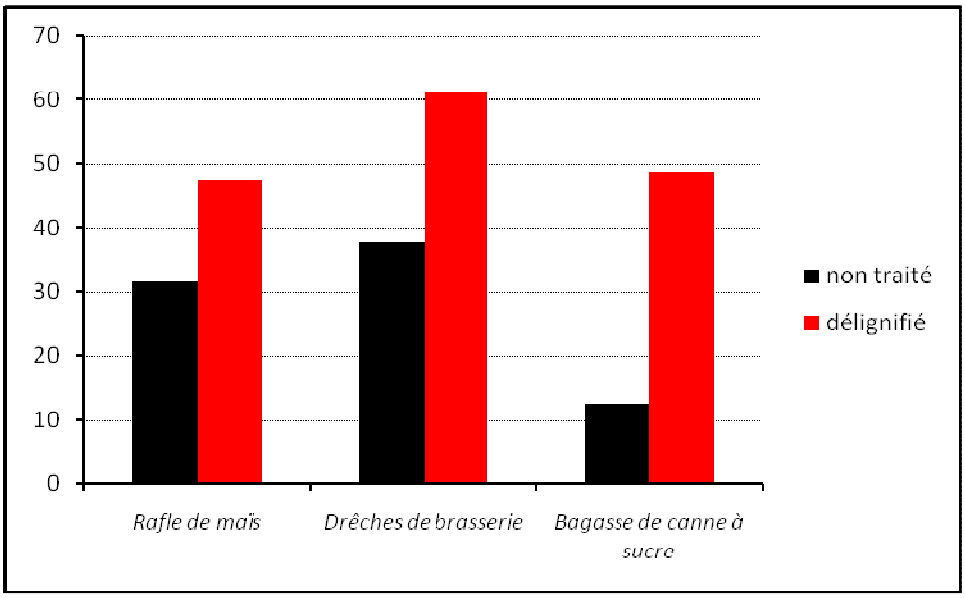


Figure III.25. *Effet de la délignification sur le rendement d'hydrolyse, par la xylanase purifiée, des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucré comparé à d'autres substrats lignocellulosique (rafles de maïs et drêches de brasserie. La réaction enzymatique a lieu pendant 24 heures à 60°C et à une concentration en substrat de 20 g/L. Résultats de l'analyse par la méthode au phénol sulfurique.*

La délignification améliore nettement l'efficacité de l'hydrolyse des substrats lignocellulosiques par la xylanase purifiée. Cet effet est très spectaculaire dans le cas de la bagasse de canne à sucre. En effet, la délignification a permis d'augmenter d'un facteur 4 le rendement de l'hydrolyse (de 12 à 48,61%).

La présence de lignine dans le matériel lignocellulosique semble être un facteur limitant l'action de la xylanase INRA. Cette limitation de l'hydrolyse enzymatique par la présence de lignine est un phénomène couramment décrit et qui a engendré beaucoup d'études sur les prétraitements de substrats lignocellulosiques. Les travaux de Rémond-Zilliox (1996) ont suggéré d'une part que les lignines pouvaient jouer un rôle important dans les phénomènes de fixation non spécifique de la xylanase, et d'autre part, que les lignines semblaient ralentir la pénétration de la xylanase dans les parois végétales. Les liaisons covalentes existantes entre les lignines et les xylanes sont susceptibles d'empêcher ou de limiter l'action hydrolytique de la xylanase en ne permettant pas la libération d'oligosaccharides liés de façon covalente à d'autres composés pariétaux dans le milieu réactionnel ce qui induit une baisse du rendement d'hydrolyse.

III.2.2.5. Degré de pureté en xylose des hydrolysats de bagasse obtenus par la xylanase INRA

Les hydrolysats enzymatiques obtenus à partir de la bagasse sous l'action de la xylanase INRA ont été analysés par HPLC. La composition monomérique en sucres autres que le xylose a été déterminée. Les variations des concentrations de xylose, arabinose, glucose et de galactose dans le milieu réactionnel en fonction du temps de l'hydrolyse par la xylanase purifiée (INRA) à la concentration de 86,86 UI/ml sont représentées dans la figure III.26.

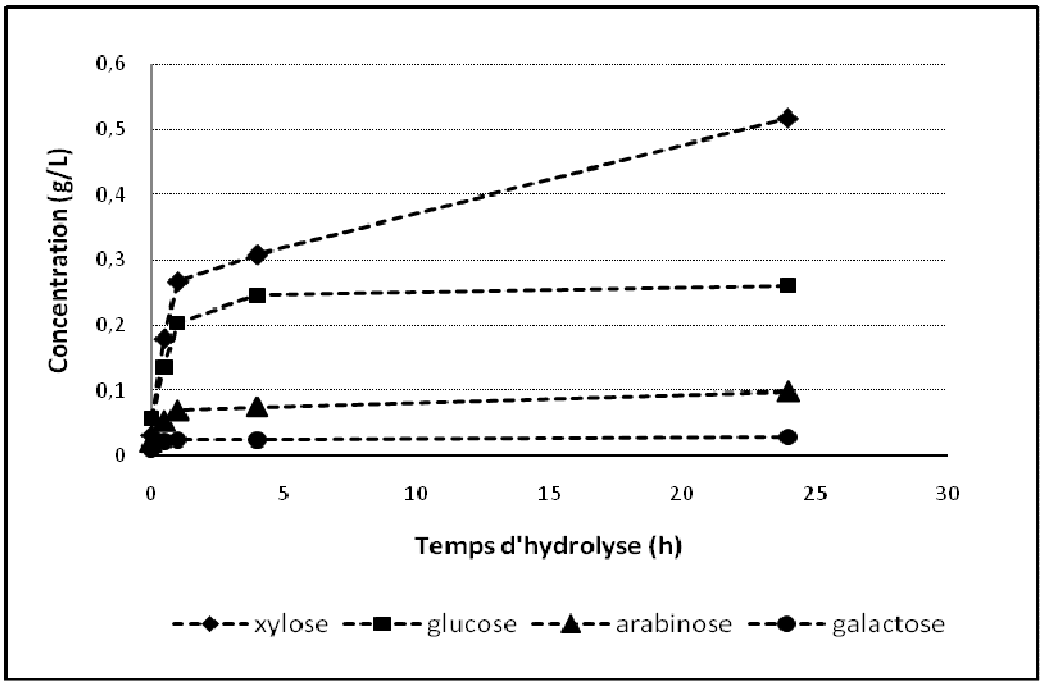


Figure III.26. *Evolution de la composition des hydrolysats de bagasse obtenus par hydrolyse enzymatique par la xylanase purifiée (à 86,86 UI/ml pendant 24h), (Analyse réalisée par HPLC).*

La figure III.26 montre la présence de faibles quantités de glucose, d'arabinose et de galactose dans milieu réactionnel en plus du xylose. L'enzyme étant purifiée et caractérisée, elle ne possède pas d'activité enzymatique autre que la xylanolyse. La libération de sucre à partir de la bagasse de canne à sucre pourrait être due à l'effet de la chaleur à 60°C pendant 24 heures. Ce phénomène a été observé par Rémond-Zilliox (1998) qui a observé le largage de sucre par la paille de blé en solution à 60°C en absence d'enzyme.

Le degré de pureté en xylose des hydrolysats enzymatiques est défini comme étant le rapport entre la concentration du xylose et la somme des sucres totaux présents. Il a été calculé pour chacune des concentrations de la xylanase utilisée et les valeurs ainsi calculées sont représentées dans la figure III.27.

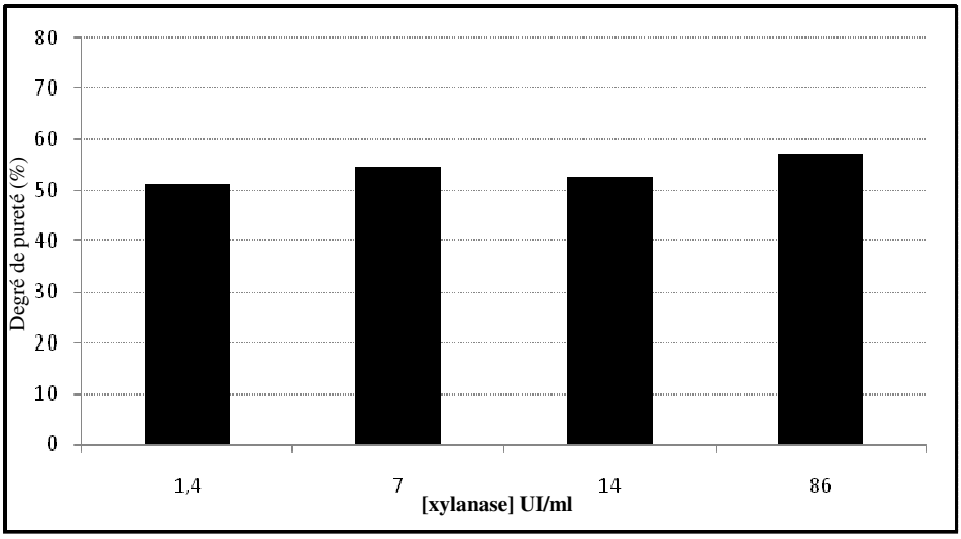


Figure III.27. *Degré de pureté (en %) des hydrolysats de bagasse de canne à sucre obtenus par hydrolyse enzymatique (24 heures) par la xylanase INRA à différentes concentrations (en UI/ml de volume réactionnel)*

Les degrés de pureté en xylose des hydrolysats obtenus par hydrolyse de la bagasse de canne à sucre catalysée par la xylanase INRA sont de l'ordre de 50%, ceci malgré l'utilisation d'une xylanase purifiée. Ces degrés de pureté sont la conséquence directe des faibles rendements de l'hydrolyse.

III.2.3. Hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par le surnageant de culture d'Humicola insolens (xylanase Roquette)

III.2. 3.1. Effet de la concentration de l'enzyme sur le rendement de l'hydrolyse de la bagasse

L'action de la xylanase Roquette a été testée sur la bagasse de canne à sucre autoclavée. L'hydrolyse a été réalisée à 60°C pH 5 et à différentes concentrations enzymatiques allant de 4,12 à 100 UI/ml volume réactionnel. La concentration de la bagasse a été maintenue fixe à 20 g/L. La réaction enzymatique a été suivie sur 24 heures, et à des intervalles de temps différents des aliquotes ont été prélevés du milieu réactionnel. L'arrêt de la réaction se fait en portant les

prélèvements à 100°C pendant 5 min. Après centrifugation (à 20 000 g pendant 15 min) la composition en sucres des hydrolysats obtenus a été analysée par la méthode au phénol sulfurique et par HPLC.

III.2.3.1.1. Analyse des sucres totaux par la méthode au phénol sulfurique

La quantité des sucres totaux libérés dans le milieu réactionnel sous l'action du surnageant enzymatique analysé a été déterminée par la méthode au phénol sulfurique. La variation de la concentration des sucres totaux libérés en fonction du temps de réaction enzymatique est présentée dans la figure III.28.

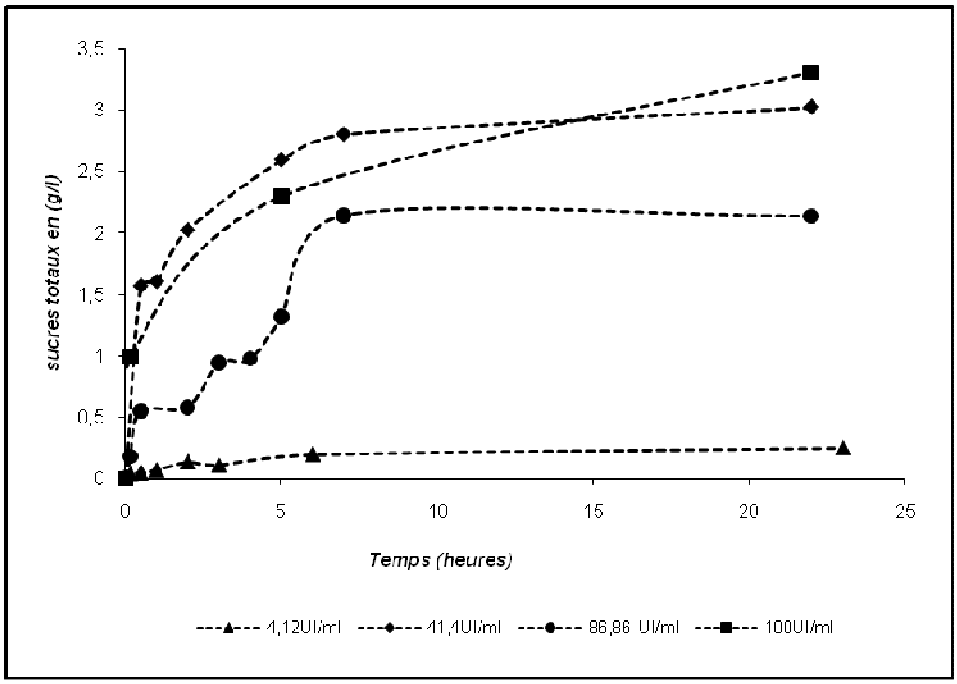


Figure III.28. *Cinétique d'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par la xylanase Roquette à différentes concentrations. La concentration en substrat est constante (20g/l) et la concentration en enzyme varie entre 4,12 et 86,86 UI/ml.*

Une concentration de l'ordre de 86 UI/ml semble être suffisante pour atteindre le maximum de libération des sucres totaux, limite au delà de laquelle, l'augmentation de la concentration enzymatique ne semble pas influer le taux d'hydrolyse.

III.2. 3.1.2. Analyse par HPLC

L'analyse par HPLC des hydrolysats enzymatiques de la bagasse obtenus sous l'action du surnageant de culture (xylanase Roquette) à 60°C nous a permis de déterminer la composition en sucres monomériques des hydrolysats. Les rendements de l'hydrolyse enzymatique exprimés en %

d'arabinoxylanes dégradés par rapport à la quantité d'arabinoxylanes présents dans la bagasse, ont été déterminés et sont représentés en fonction du temps dans la figure III.29.

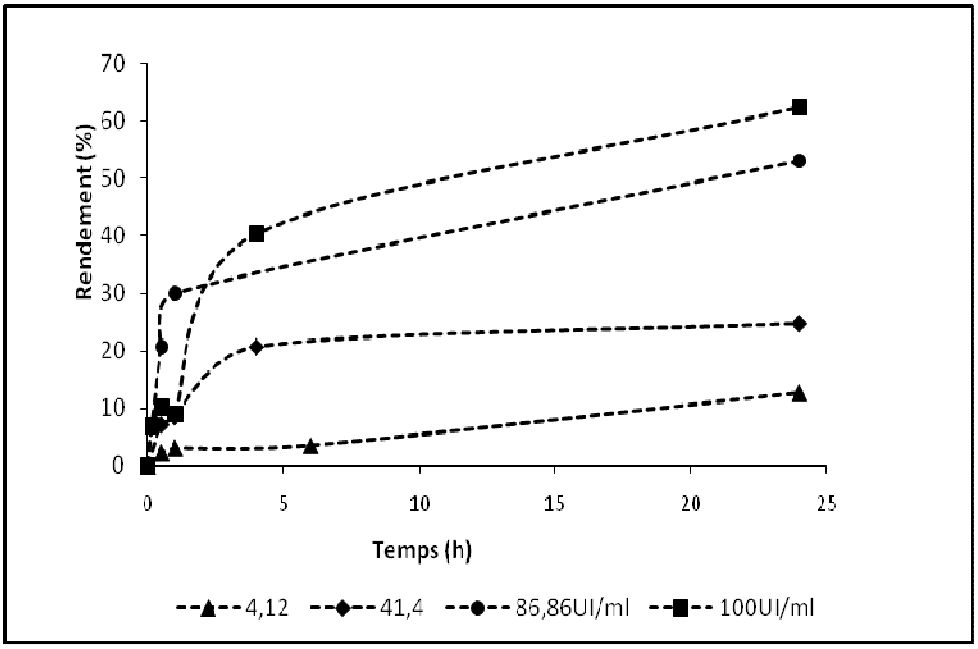


Figure III.29. *Cinétiques d'hydrolyse des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucre par la xylanase Roquette exprimé en % d'arabinoxylane dégradé par rapport à la quantité d'arabinoxylanes présents dans le substrat) en fonction du temps d'incubation.*

La figure III.29 montre l'évolution des rendements de l'hydrolyse des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucre par le surnageant xylanolytique en fonction du temps. L'hydrolyse est rapide durant les 3 premières heures suivie d'un ralentissement des vitesses d'hydrolyse. Un temps de 24 heures n'a pas permis d'atteindre le maximum d'hydrolyse. Ceci est en cohérence avec les résultats obtenus par analyse des sucres par la méthode au phénol sulfurique.

Le rendement maximal d'hydrolyse de la bagasse par la xylanase Roquette est de 62,37%. Il a été obtenu au bout de 24 heures d'hydrolyse par 100UI/ml. Les 86 UI/ml ont permis d'avoir un rendement de 53,09%.

Les rendements d'extraction des arabinoxylanes de la bagasse de canne à sucre obtenus par la xylanase Roquette sont plus élevés que ceux obtenus en présence de la xylanase INRA, et montrent bien la forte aptitude de ce surnageant de culture à hydrolyser des substrats lignocellulosiques tel que la bagasse de canne à sucre. D'où notre choix d'utilisation de la xylanase Roquette dans le surnageant au lieu de la xylanase purifiée pour le reste de cette étude.

III.2.3.2. Analyse des sucres autres que le xylose et degré de pureté des hydrolysats de bagasse obtenus par le surnageant de culture d'Humicola insolens

III.2.3.2.1. Analyse des sucres autres que le xylose

L'analyse par HPLC des hydrolysats enzymatiques de la bagasse de canne à sucre nous a permis également de déterminer la composition monomérique de ces hydrolysats en sucres autres que le xylose. Les variations de la composition monomérique en glucose, arabinose et galactose des hydrolysats de bagasse obtenus par trois concentrations enzymatiques (4,12 - 41,4 et 100 UI/ml) sont représentées, respectivement, dans les figures III.30, III.31 et III.32.

La figure III.30 montre la libération de glucose dans le milieu réactionnel par hydrolyse de la bagasse de canne à sucre catalysée par la xylanase de Roquette. La concentration du glucose libérée est d'autant plus élevée que la concentration en enzyme est grande. La libération de glucose suit également une cinétique en fonction du temps d'incubation à 60°C. Ceci permet de suggérer la présence d'activité cellulase dans le surnageant *d'Humicola insolens*. Cette activité semble être lente, d'une part, par ce qu'il ne s'agit pas de l'activité majoritaire du surnageant enzymatique qui est à activité xylanolytique prédominante. Et d'autre part, à cause des conditions expérimentales de l'hydrolyse qui a été réalisé à pH 5 et à 60°C, conditions optimales de l'activité xylanase.

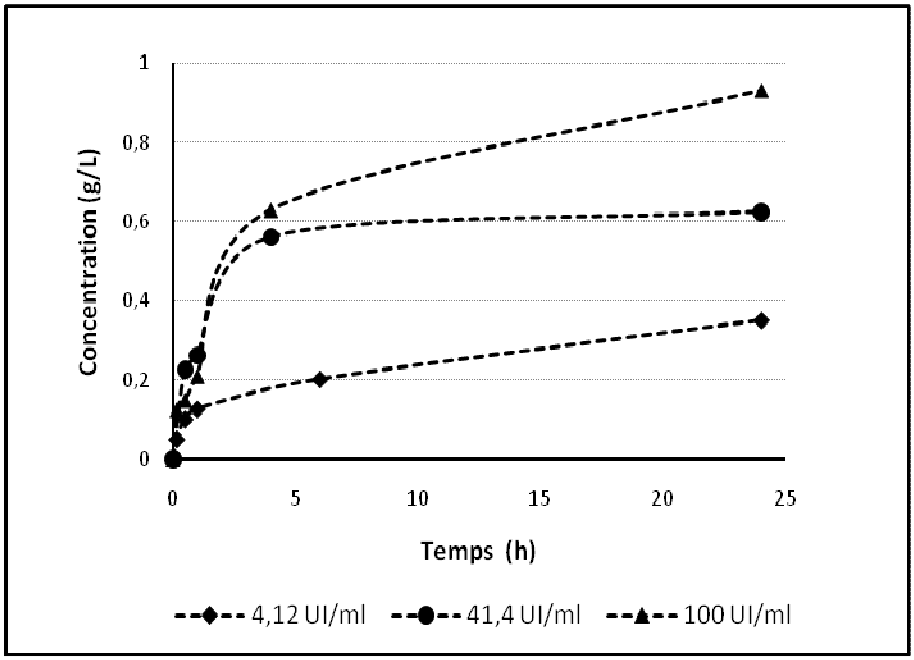


Figure III.30. *Evolution de la concentration de glucose dans les hydrolysats de bagasse de canne à sucre en fonction du temps de l'hydrolyse par le jus de culture à différentes concentrations.*

La figure III.31 montre la présence de l'arabinose dans les hydrolysats enzymatiques. La concentration de l'arabinose augmente en fonction du temps d'autant plus vite que la concentration du surnageant enzymatique est élevée. Ceci permet également de suggérer la présence d'une activité arabinofuranosidase en plus des activités xylanase et cellulase.

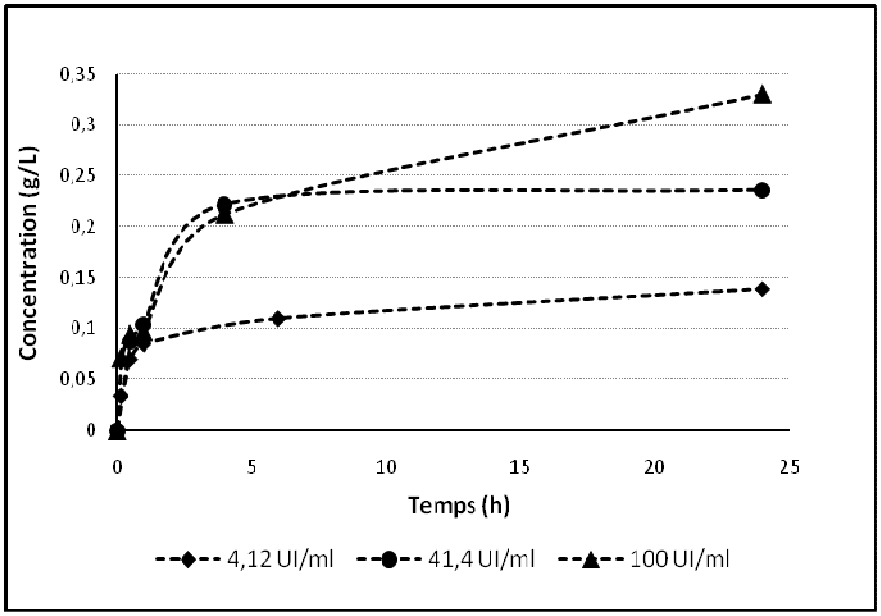


Figure III.31. *Evolution de la concentration de l'arabinose dans les hydrolysats de bagasse de canne à sucre en fonction du temps de l'hydrolyse par le jus de culture à différentes concentrations*

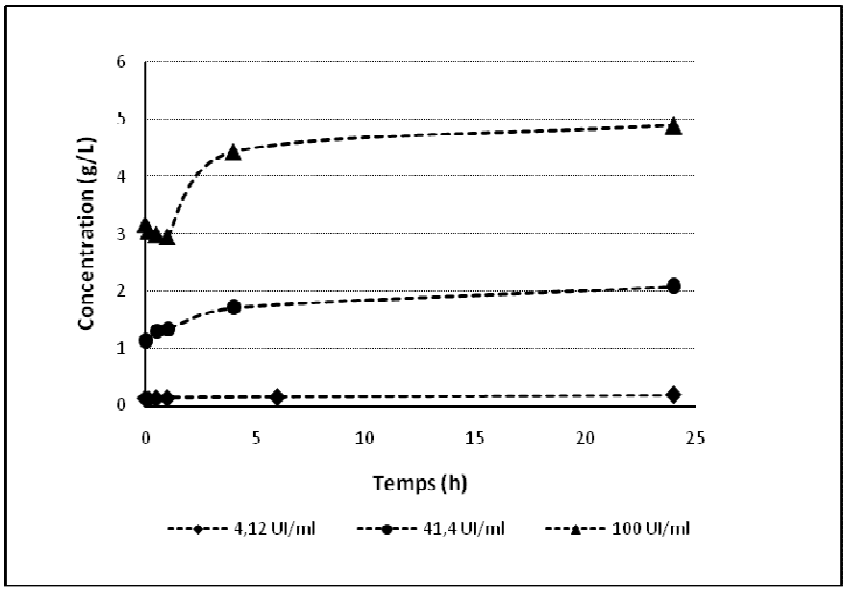


Figure III.32. *Concentration de galactose dans les hydrolysats de bagasse de canne à sucre à différents temps de l'hydrolyse par le jus de culture à différentes concentrations*

Une quantité relativement importante (jusqu'à 5 g/L) de galactose a été détectée dans les hydrolysats de bagasse obtenus par la xylanase Roquette comme le montre la figure III.32.

La quantité de galactose est croissante en fonction de la concentration de l'enzyme utilisée ; la variation de la quantité de galactose en fonction du temps d'incubation est très faible. Le galactose ne provient pas donc de l'hydrolyse de la bagasse mais serait plutôt apporté dans le milieu réactionnel par le surnageant enzymatique.

La présence des activités enzymatiques annexes (cellulase et arabinofuranosidase) dans le surnageant (xylanase Roquette) en plus de son activité xylanase principale pourrait expliquer la capacité de ce jus à hydrolyser la fraction hémicellulosique de la bagasse de canne à sucre avec des rendements importants. L'action synergique d'une cellulase et une arabinofuranosidase pourrait améliorer l'accessibilité de la xylanase Roquette aux arabinoxylanes permettant une amélioration des rendements d'hydrolyse.

Compte tenu de la libération secondaire de sucres autres que le xylose (arabinose et glucose en plus de la présence de galactose) par le surnageant il nous parait nécessaire de suivre le degré de pureté en xylose des hydrolysats correspondants.

III.2.3.2.2. Degré de pureté en xylose des hydrolysats enzymatiques

Les degrés de pureté en xylose des hydrolysats enzymatiques de bagasse obtenus après 24 heures d'hydrolyse par le jus de culture à différentes concentrations ont été déterminés et sont représentés dans la figure III.33.

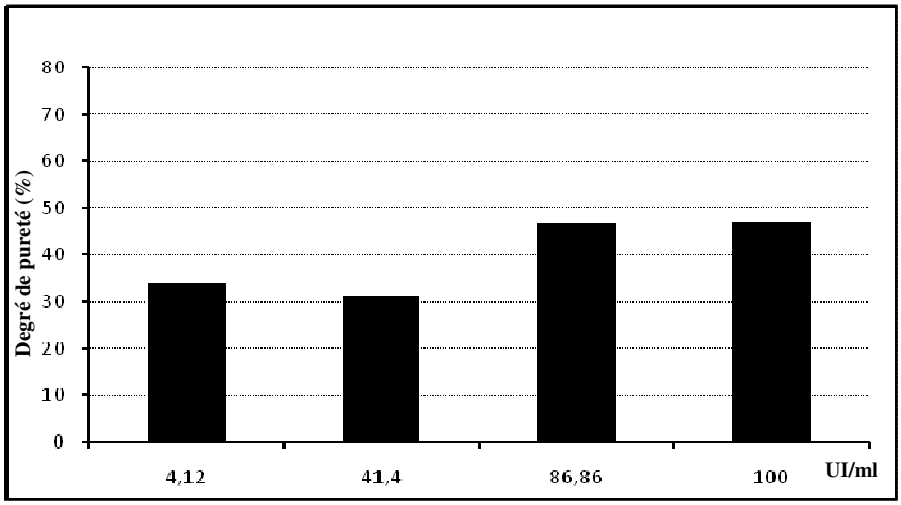


Figure III.33. *Degré de pureté (en %) des hydrolysats de bagasse de canne à sucre obtenus par hydrolyse enzymatique (24 heures) par le surnageant de Roquette à différentes concentrations (en UI/ml de volume réactionnel).*

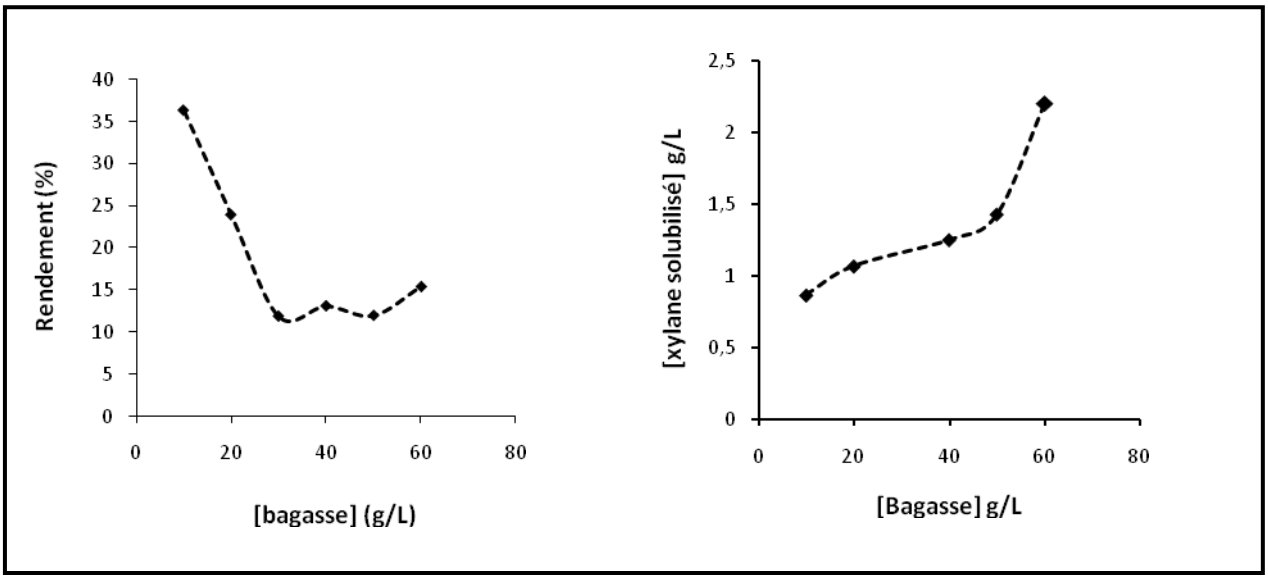
Le degré de pureté maximal en xylose des hydrolysats enzymatiques est de 47%, il correspond à la concentration d'enzyme qui donne le meilleur rendement d'hydrolyse (86,86 UI/ml).

III.2.3.3. Effet de la concentration du substrat

L'étude de l'effet de la concentration en substrat et donc du rapport liquide/solide sur l'hydrolyse de la bagasse par la xylanase Roquette a été réalisée en faisant varier la concentration de la bagasse de 10 à 20 g/L. La concentration de l'enzyme a été maintenue constante 86,86 UI/ml. La réaction enzymatique a lieu à 60°C pendant 7 heures. Les hydrolysats ainsi obtenus ont été analysés par HPLC.

La figure III.34 (a) représente la variation du rendement de l'hydrolyse exprimé en pourcent d'arabinoxylanes dégradés par rapport à la quantité d'arabinoxylanes présents dans le substrat.

La figure III.34 (b) correspond à la variation de la concentration des xylanes en équivalent xylose solubilisée dans les hydrolysats obtenus.



(a) (b)

Figure. III.34. *Effet de la concentration du substrat sur l'hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre par la xylanase Roquette : (a) variation du rendement d'hydrolyse ; (b) variation de la concentration de xylanes solubilisés*

Le rendement de l'hydrolyse enzymatique diminue en fonction de la concentration du substrat, c'est à dire du rapport liquide/solide avec une stabilisation (d'environ 13%) à partir de 30g/L de concentration en bagasse. Cette diminution du rendement avec la diminution du rapport liquide /solide pourrait s'expliquer par la concentration du milieu réactionnel rendant la viscosité plus élevée et la mobilité de l'eau plus faible, ce qui pourrait avoir un effet inhibiteur de l'action de l'enzyme sur son substrat. En effet, le bon fonctionnement des enzymes nécessite une mobilité moléculaire suffisante des réactants (eau et substrat). Ce résultat permet de suggérer que malgré la forte activité du surnageant enzymatique (xylanase Roquette) vis à vis du substrat lignocellulosique complexe et insoluble, cette dernière semble être sensible à la variation du niveau d'hydratation du milieu réactionnel.

Les concentrations des hydrolysats en xylanes solubilisés (figure III.34 (b)) augmentent en fonction de la concentration du substrat. L'utilisation de concentrations élevées en substrat lignocellulosique permet donc l'obtention des hydrolysats plus riches en sucres même si cette concentration ne correspond pas à un rendement maximal.

La stabilisation du rendement d'hydrolyse pour des concentrations de substrat comprises entre 30 et 60% pourrait renseigner sur la capacité de l'enzyme à fonctionner dans des milieux complexes peu hydratés. Ceci conforte donc l'intérêt économique de l'utilisation du surnageant (xylanase Roquette) qui autorise l'utilisation de concentrations élevés de bagasse en vue de sa valorisation.

Pour vérifier cet avantage de la xylanase Roquette en milieu concentré, un essai d'hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre en milieu pâteux dans un réacteur pilote sera effectué.

III.2.3.4. Effet de la délignification sur l'hydrolyse de la bagasse

L'hydrolyse de la bagasse délignifiée catalysée par la xylanase Roquette a été comparée à celle de la bagasse autoclavée L'hydrolyse a été réalisée à 60°C pendant 24 heures par une concentration enzymatique de 86,86 UI/ml et une concentration de substrat de 20 g/L. Les hydrolysats obtenus ont été analysés par la méthode au phénol sulfurique et les variations des sucres totaux correspondantes sont représentées dans la figure III.35.

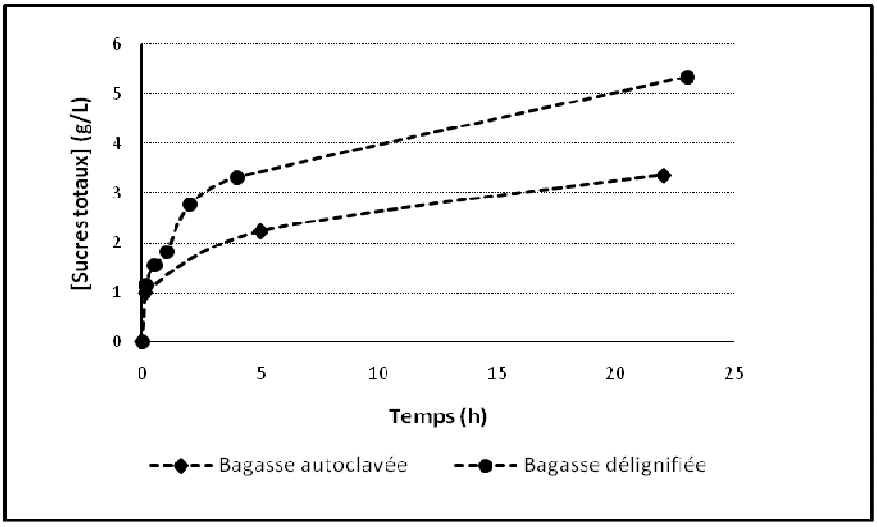


Figure III.35. *Effet de la délignification de la bagasse sur son hydrolyse par le jus de culture xylanolytique (86,86 UI/ml)*

La quantité des sucres libérés à partir de la bagasse délignifiée (5,4 g/L) est nettement plus importante que celle correspondante à la bagasse non délignifiée (3,3 g/L).

La délignification permet donc d'améliorer l'hydrolyse enzymatique de la bagasse par le surnageant de culture étudié. Cette amélioration de l'efficacité de l'hydrolyse est beaucoup plus faible comparativement à celle trouvée dans le cas de la xylanase purifiée. L'action xylanolytique globale de ce surnageant de culture ne semble pas très sensible à la présence de lignine.

III.2.4. Hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre en milieu pâteux : Installation pilote

L'efficacité de la xylanase Roquette à hydrolyser la bagasse en milieu pâteux a été testée en réacteur agitation-mélange à l'échelle pilote et a été comparée à celle de la xylanase INRA. Le suivi des réactions a été réalisé par dosage chromatographique HPLC de la quantité d'équivalent xylose solubilisée parallèlement à la mesure du couple résistant (TAU ($N.cm^2$)) qui varie avec la consistance du milieu réactionnel au cours du temps d'hydrolyse.

La concentration de la bagasse utilisée est de 150 g/L et les concentrations enzymatiques sont : 90 UI/g bagasse pour la xylanase INRA ; 90 UI/g et 200 UI/g bagasse pour la xylanase Roquette. Ce choix de concentrations a été basé sur les propriétés rhéologiques du milieu pâteux. Les hydrolyses ont été réalisées pendant 24 heures et des prélèvements ont été effectués à des intervalles de temps réguliers.

Les résultats de l'analyse des rendements d'hydrolyse (%) et les valeurs relatives du couple (couple milieu hydrolysé/couple initial*100) ont été déterminées et sont présentés dans les figures III.36, III.37 et III.38.

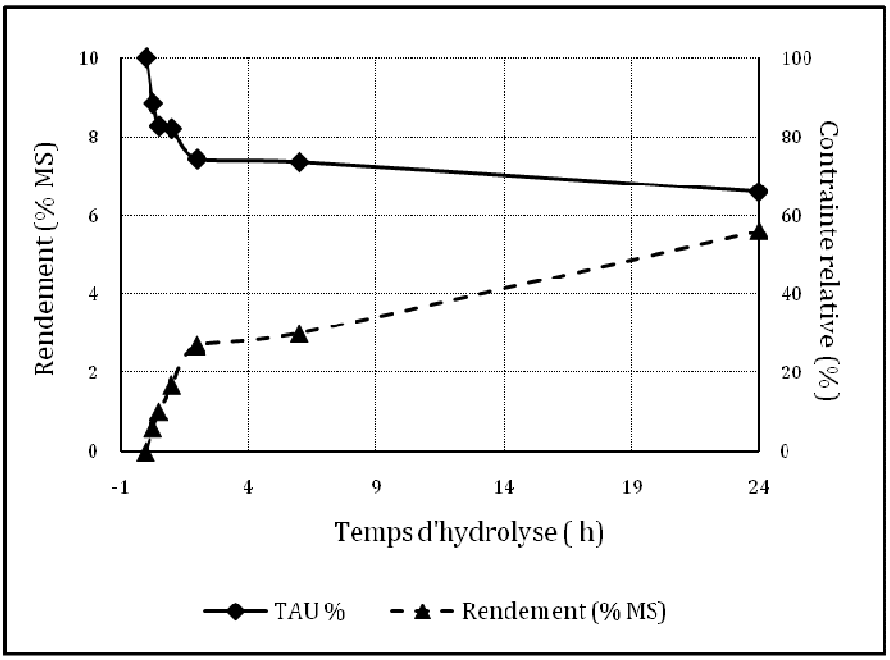


Figure III.36. *Suivi du rendement en équivalent xylose et % du couple initial (TAU) en fontion du temps de l'hydrolyse de la bagasse (150 g/L) par la xylanase INRA*

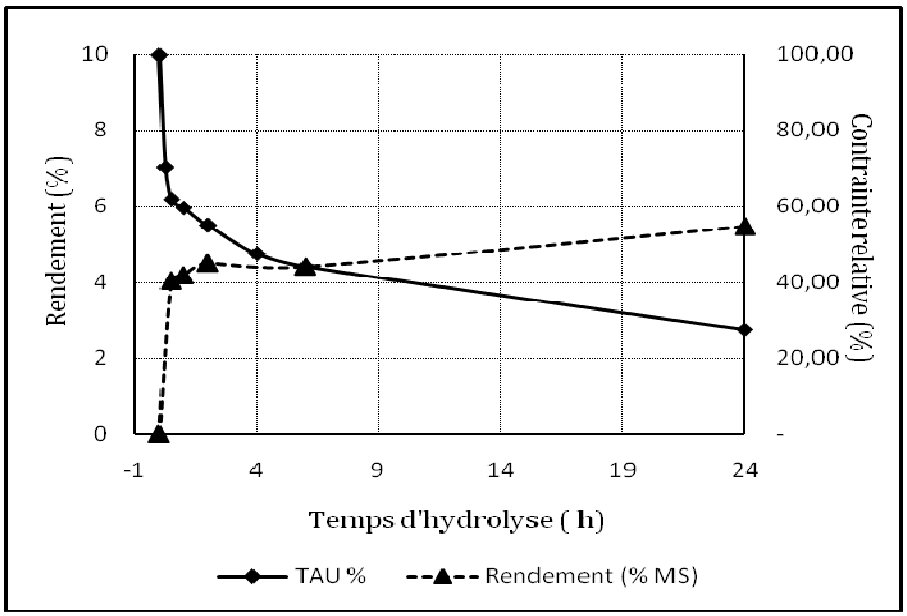


Figure III.37. *Suivi du rendement en équivalent xylose et % du couple initial (TAU) en fontion du temps de l'hydrolyse de la bagasse (150 g/L) par la xylanase Roquette (90UI/g bagasse)*

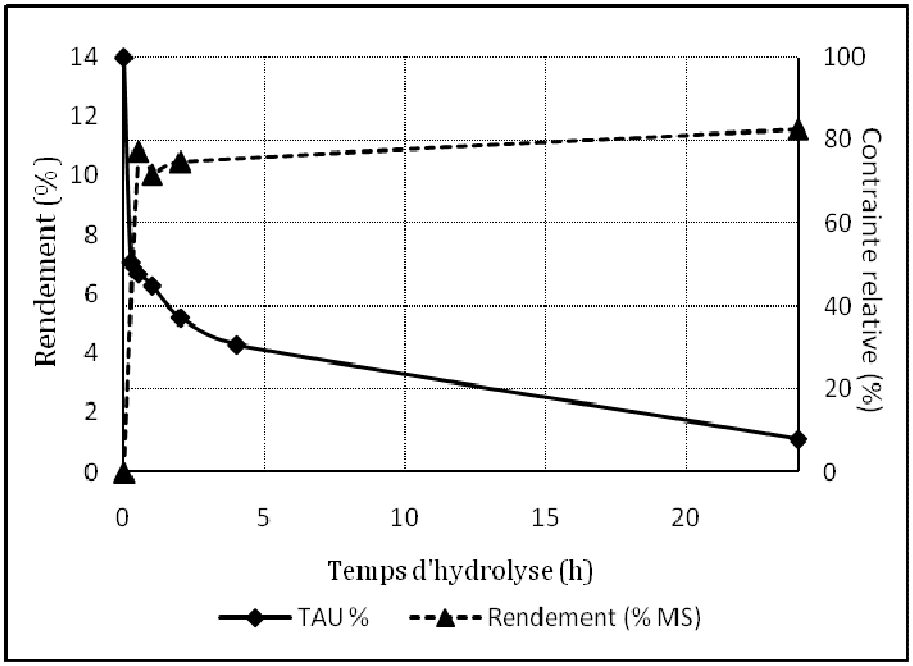


Figure III.38. *Suivi du rendement en équivalent xylose et % du couple initial (TAU) en fontion du temps de l'hydrolyse de la bagasse (150 g/L) par la xylanase Roquette (200UI/g bagasse)*

L'analyse des figures III.36, III.37 et III.38 montre que pour les deux enzymes étudiées un même rendement de xylose de 5% a été obtenu pour des concentrations enzymatiques égales à 90UI/g bagasse. Cependant, le jus enzymatique de Roquette induit une chute beaucoup plus importante de la valeur relative du couple (68 % pour la xylanase Roquette et 28% pour la xylanase INRA) due à la diminution de la consistance du milieu et qui peut être associée à l'existence d'autres activités enzymatiques dans le jus de Roquette (cellulase et arabinofuranosidase).

Le doublement de la concentration de la xylanase Roquette a permis de doubler le rendement de xylose (figure III.38). Cette corrélation linéaire et directement proportionnelle entre la concentration d'enzyme et le rendement de xylose montre qu'on n'a pas encore atteint la concentration optimale de l'enzyme. A cette concentration de 200 UI/g bagasse la xylanase a permis d'atteindre 12,2% de rendement d'hydrolyse. La variation relative du couple (TAU) est aussi plus importante et atteint une valeur de 8 %. La présence d'activités enzymatiques annexes pourrait améliorer l'accessibilité de la xylanase Roquette aux arabinoxylanes et donc de maximiser le rendement de l'hydrolyse.

L'hydrolyse en réacteur a donc montré la possibilité de faire agir la xylanase sur la bagasse en milieu pâteux. Le réacteur a permis de suivre l'hydrolyse enzymatique par mesure rhéologique.

Des corrélations entre la variation de la viscosité et le rendement de l'hydrolyse en se basant sur les différentes zones linéaires des courbes respectives peuvent être mises en évidence.

III.2.5. Conclusion

L'hydrolyse de la bagasse de canne à sucre par deux endoxylanases : une xylanase bactérienne purifiée de *Bacillus xylanilyticus* et un surnagent de culture de souche fongique : *Humicola insolens*, à activité xylanolytique prédominante, nous a permis de sélectionner le surnageant de culture comme enzyme de choix vue sa forte activité sur la bagasse et l'obtention de rendement important de l'hydrolyse des arabinoxylanes *in situ*.

L'action du jus xylanolytique sur la bagasse de canne à sucre nous a permis des rendements d'extraction des arabinoxylanes qui peuvent aller jusqu'à 62,37%. La présence d'autres activités enzymatiques (cellulase et arabinofuranosidase) secondaires dans le surnageant de culture pourrait être responsable en partie de ce rendement. Ces activités sont responsables de la libération des sucres autres que le xylose (arabinose et glucose) qui affectent la pureté des hydrolysats en xylose trouvée variant entre 31 et 47% suivant la concentration.

III. 3. Traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre

III.3.1. Détermination du maximum de xylose extractible : hydrolyse acide de la bagasse de canne à sucre

Afin de déterminer la quantité de xylose potentiellement extractible à partir de la bagasse de canne à sucre, nous avons procédé à une hydrolyse acide (avec 1% de H_2SO_4 et à 150°C). La concentration de xylose maximale obtenue par traitement acide ainsi que les concentrations du glucose d'autres sucres réducteurs libérés sont présentées dans la figure III. 39. La figure III.40 présente également les concentrations d'arabinose et de galactose déterminé par HPLC.

Les résultats présentés dans la figure III.39 montrent que le traitement acide de la bagasse a permis de libérer un maximum de sucres réducteurs de 15.65 g/L, dont 11 g/L xylose, ce qui correspond à un rendement de 0.22 g xylose/g bagasse sèche qui est équivalent à un rendement de 88% de masse sèche d'hémicellulose. Ce rendement maximal est obtenu au bout de 20 minutes de traitement. Au delà de 20 minutes, plus le temps de traitement thermique augmente plus la quantité de xylose diminue. Ceci pourrait s'expliquer par une dégradation progressive sous l'action de l'acide et de la chaleur du xylose après sa solubilisation. La même figure montre qu'en plus du xylose, du glucose (jusqu'à 2 g/L) et d'autres sucres réducteurs sont libérés lors de l'hydrolyse acide de la bagasse. Parmi ces sucres, il y a l'arabinose et le galactose dont les concentrations ont été

déterminées par HPLC (figure III.40) et qui peuvent aller jusqu'à environ 1,6 g/L d'arabinose et 0,41 g/L de galactose. La concentration de ces sucres diminue pour des temps d'incubation de plus en plus longs, ce qui pourrait être du également à un phénomène de dégradation des sucres sous l'effet combiné de l'acide et la chaleur.

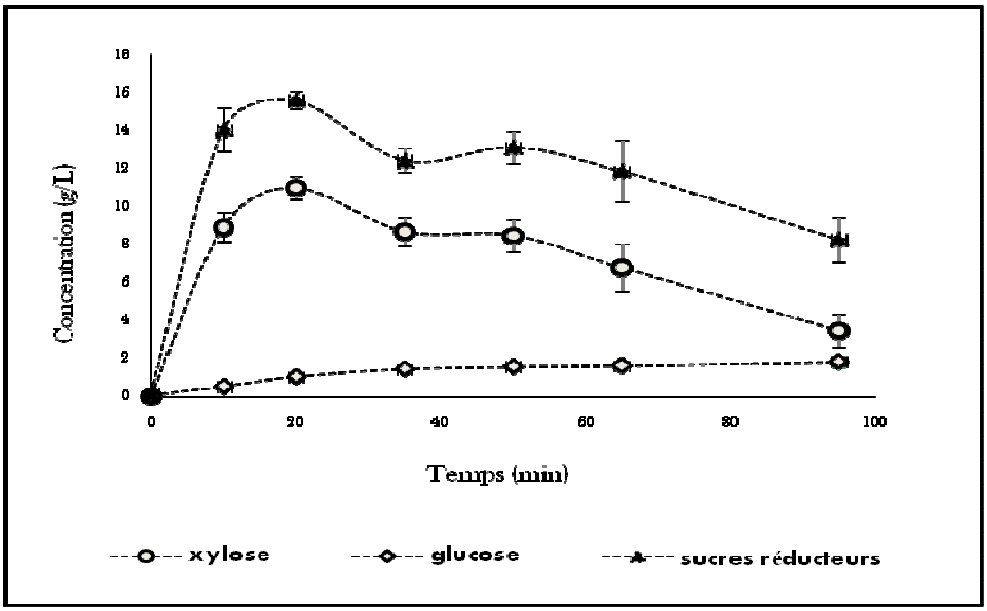


Figure III.39. *Evolution de la concentration du xylose, glucose et des sucres réducteurs libérés à partir de la bagasse de canne à sucre par traitement hydrothermique acide (H_2SO_4 1% et 150°C)*

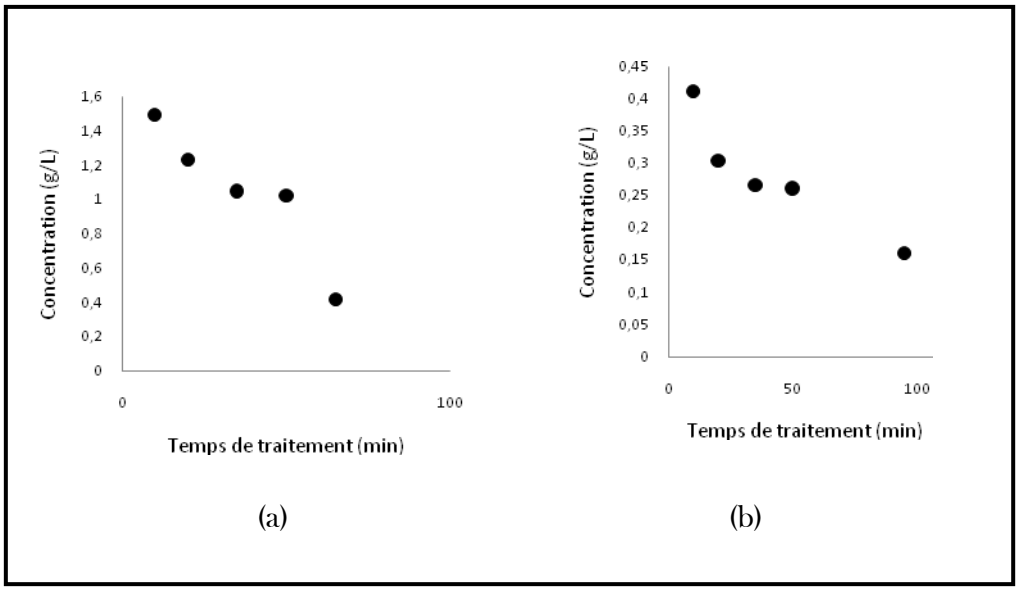


Figure III.40. *Variation en fonction du temps de l'arabinose (a) et le galactose (b) libérés par traitement hydrothermique acide*

En plus de l'inconvénient des pertes en sucres par dégradation, un procédé d'extraction de l'hémicellulose au moyen de l'acide nécessite une étape de neutralisation du milieu réactionnel qui peut également affecter le rendement de l'extraction. D'où la nécessité de l'utilisation d'un traitement modéré comme le traitement hydrothermique qui n'utilise que l'eau comme réactif dans les réactions d'autohydrolyse.

III.3.2. Optimisation du traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre

Le traitement hydrothermique de la bagasse a permis l'obtention de deux fractions : une fraction soluble contenant les dérivés d'hémicellulose solubilisés et une fraction solide résiduelle de la bagasse traitée.

L'étape d'optimisation du traitement hydrothermique a été réalisée en faisant varier le temps et la température du traitement afin de sélectionner les conditions opératoires qui permettent une meilleure solubilisation du xylane et l'obtention des hydrolysats avec le plus haut possible de degré de pureté.

La biomasse de bagasse a été hydrothermiquement traitée à trois températures 150, 170 et 190°C pour différents temps de traitement. Chacune des fractions solubles obtenues a été analysée par HPLC afin de déterminer le pourcentage de sucres solubilisés. La coloration, les masses sèches ainsi que le degré de pureté en xylose de chaque fraction ont été déterminés.

III.3.2.1. Evaluation du taux de solubilisation de la fraction hémicellulosique par analyse HPLC (Dionex)

La figure III.41 représente les résultats de l'analyse Dionex des hydrolysats pour les trois températures étudiées.

On observe à 150°C un minimum d'extraction avec une solubilisation lente en fonction du temps de traitement. Pour les deux autres températures (170°C et 190°C) on obtient un taux d'extraction similaire. A 190°C la concentration en xylose diminue après 2 heures de traitement. Cette chute de concentration peut s'expliquer par une dégradation progressive des sucres monomères libérés à forte température. Nous avons fait le choix de la température 170°C comme température optimale de traitement thermique.

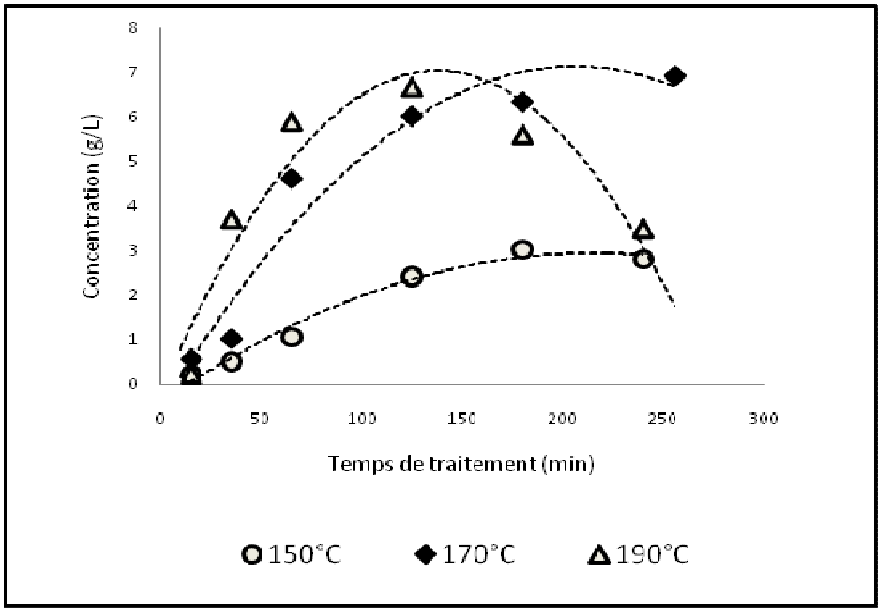


Figure III.41. *Analyse Dionex et la composition en xylose des hydrolysats obtenus par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre*

En termes de rendement (tableau III.7), à 150°C le rendement maximal obtenu est de 22,6%(MS)±0,22 contre 53,56%(MS)±0,22 obtenu à 190°C. Dans le cas de 170°C un rendement maximal de 55% ±0,22 (MS) a été atteint pour une durée de 4 heures de traitement alors que 2 heures ont suffi pour atteindre les 48,28%±0,22 de rendement d'extraction. D'où le choix de 2 heures comme durée de traitement. En terme de consommation énergétique ce n'est pas rentable d'ajouter 2 heures de traitement à 170°C pour récupérer seulement moins de 7% de solubilisation supplémentaires.

Tableau III.7. *Rendements d'extraction (exprimés en g/g bagasse et en % Masse sèche initiale) obtenue par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre à différentes températures de traitement.*

	Rendement (g/g bagasse)			***Rendement (% MS initiale)***		
Temps (h)	**150°C**	**170°C**	**190°C**	**150°C**	**170°C**	**190°C**
1			0.117			47.4
2	0.048	0.12	0.133	19.41	48.28	53.56
4	0.05	0.138		22.6	55	

III.3.2.2. Détermination du degré de pureté des hydrolysats hydrothermiques

III.3.2.2.1. Détermination de la masse sèche des hydrolysats

L'analyse de la masse sèche des hydrolysats pour les trois températures étudiées sont représentés dans la figure III.42. Dans les trois graphiques nous avons représenté les masses sèches des hydrolysats ainsi que leurs concentrations en xylose. L'interprétation des résultats se base sur l'analyse des écarts qui existent entre la concentration en xylose et la concentration en la masse sèche de l'hydrolysat permettant de nous renseigner sur le taux d'impuretés.

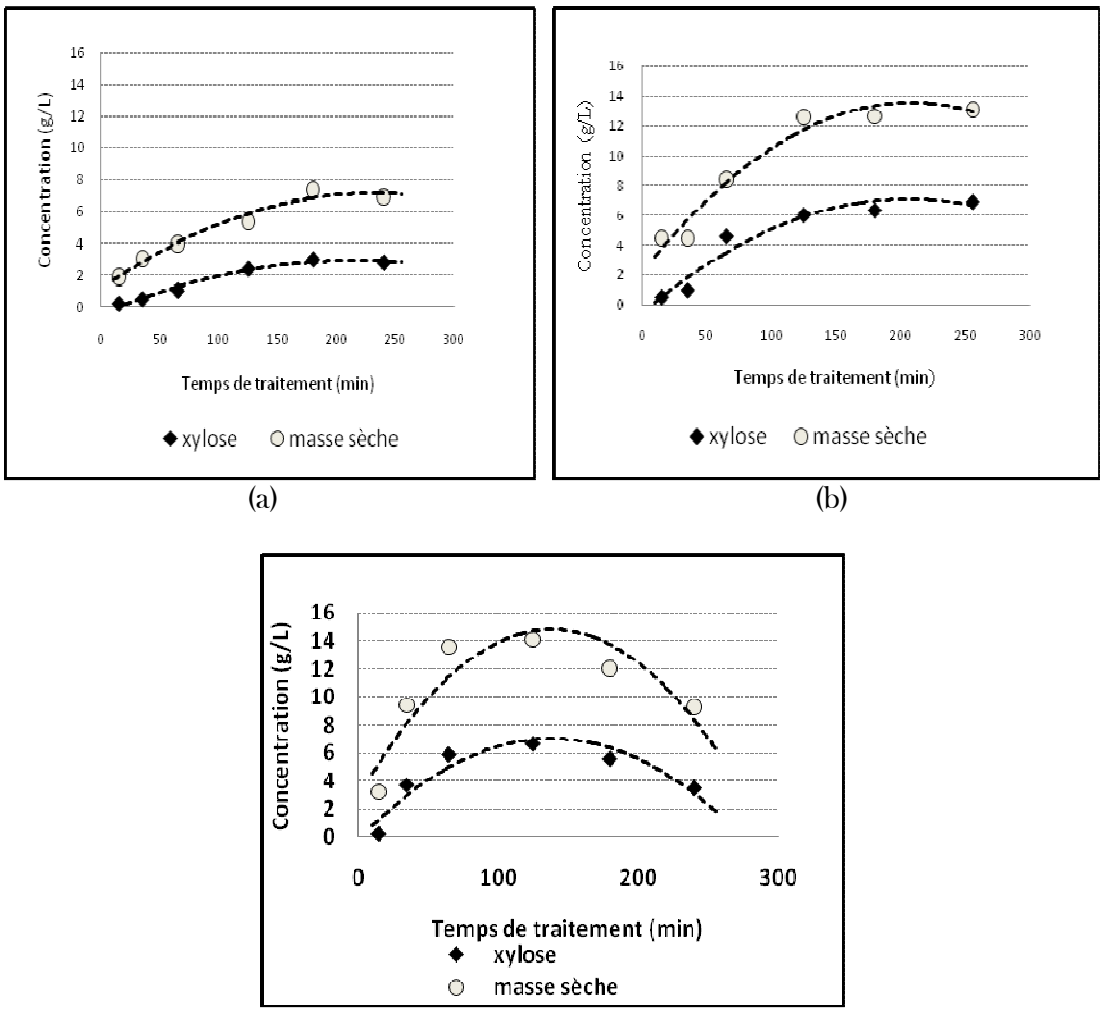


Figure III.42. *Variation de la masse sèche et de la concentration en xylose des hydrolysats obtenus en fonction du temps de traitement hydrothermique et à différentes températures : 150°C (a), 170°C (b) et 190°C (c).*

On note que nous considérons impureté tout ce qui est solubilisé dans le milieu réactionnel avec les dérivés du xylane tels que la lignine solubilisée, des sucres monomères comme l'arabinose, des acides féruliques et aussi les éventuels produits de dégradation du matériel solubilisé à partir de la bagasse de canne à sucre.

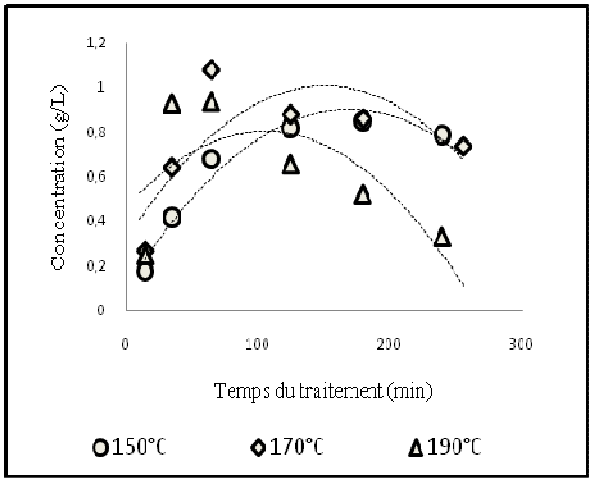
Le traitement à 150°C est déjà à éliminer vue qu'il ne permet pas une bonne solubilisation du xylane. Pour les deux autres températures 170 et 190°C on atteint presque le même taux d'extraction mais l'analyse des masse sèche de chacun des hydrolysats montre que celle-ci est plus importante dans le cas du traitement à 190°C d'où une concentration en impuretés plus importante à cette température comparativement à 170°C. Ceci peut se confirmer par l'analyse de la coloration des hydrolysats.

III.3.2.2.2. Analyse des sucres autres que le xylose et degré de pureté des hydrolysats hydrothermiques

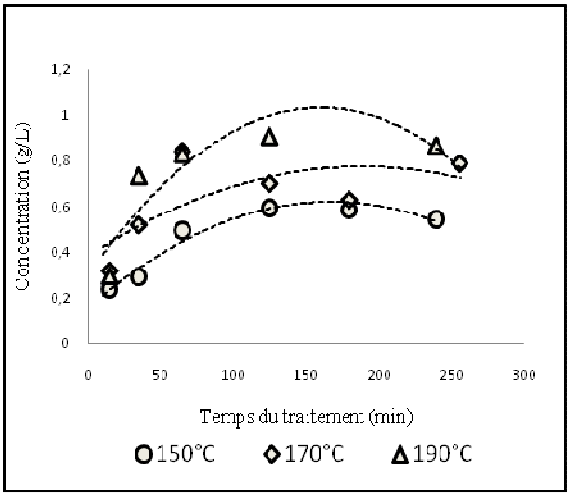
La figure III.43 montre l'évolution de la teneur en sucres des différents hydrolysats hydrothermiques (obtenus à 150, 170 et 190°C) autres que le xylose considérés comme étant des impuretés : ((a) arabinose, (b) glucose et (c) galactose).

Ces résultats comparés à ceux obtenus par hydrolyse avec l'acide montrent que le traitement hydrothermique libère des quantités d'impuretés moindres que celles obtenus par traitement acide (2 g/L glucose et 1,6 g/L d'arabinose pour le traitement acide contre respectivement, 0,6 et 0,8 g/L dans le cas du traitement hydrothermique). Ceci prouve la non spécificité de l'hydrolyse acide qui provoque la solubilisation concomitante des composés non désirables à fortes concentrations. A l'échelle industrielle, l'ajout d'acide nécessiterait des procédés de purification chromatographiques complexes et couteux pour obtenir le xylose pur.

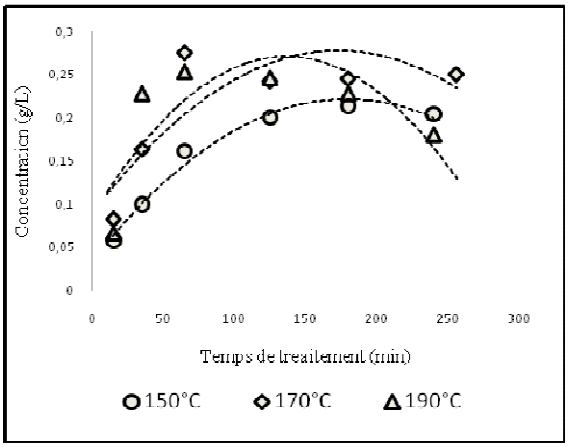
Le traitement hydrothermique présente donc l'avantage de solubiliser des concentrations moindres en sucres contaminants. A 170°C de faibles concentrations d'arabinose, glucose et de galactose sont libérés confirmant le choix de cette température pour le traitement hydrothermique.



(a)



(b)



(c)

Figure III.43. *Variation en fonction du temps de l'arabinose (a), glucose (b) et le galactose (c) libérés par traitement hydrothermique*

Le degré de pureté des hydrolysats correspond au rapport entre la concentration du xylose à la concentration des sucres totaux libérés au cours du traitement. La variation de la valeur des degrés de pureté en xylose des hydrolysats hydrothermiques obtenus dans les différentes conditions opératoires étudiées est représentée dans la figure III.44.

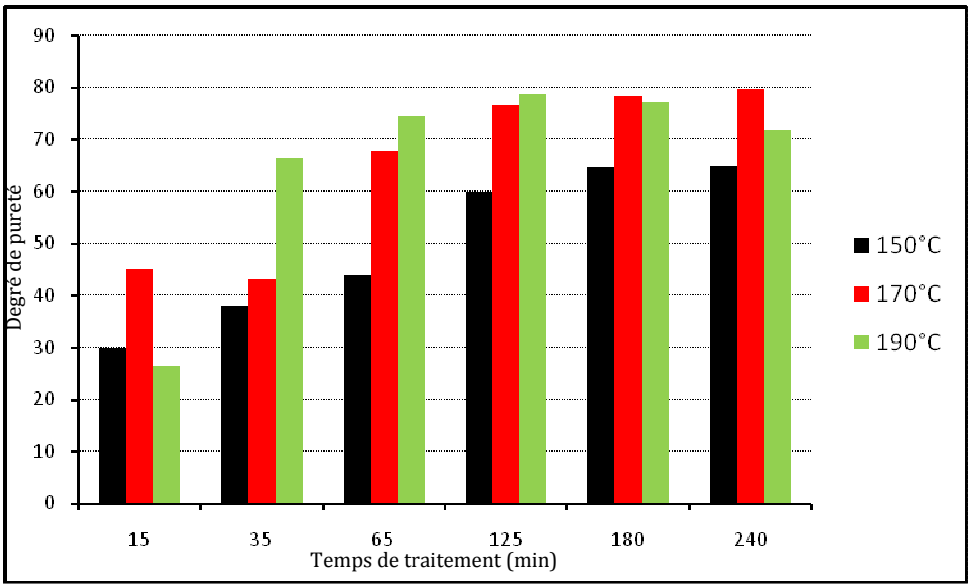


Figure III.44. *Degrés de pureté des hydrolysats hydrothermiques de la bagasse de canne à sucre obtenus à différentes températures (150, 170 et 190°C) et différents intervalles de temps*

Le degré de pureté des hydrolysats hydrothermiques peut aller jusqu'à 78%. Cette pureté est plus grande que celle obtenue par hydrolyse enzymatique ce qui nous permet de sélectionner le traitement hydrothermique comme méthode de choix pour l'extraction de la fraction hémicellulosique de la bagasse de canne à sucre.

L'augmentation du degré de pureté dans les conditions du traitement les plus extrêmes pourrait s'expliquer par la dégradation des sucres. Le degré de pureté à lui seul ne permet pas de sélectionner les conditions optimales du traitement, mais peut être un paramètre indicateur de la pureté au niveau de la composition saccharidique.

III.3.2.2.3. Analyse de la coloration des hydrolysats

Les hydrolysats hydrothermiques obtenus sont troubles, sombres de couleur jaune à brun et sont de plus en plus foncés en fonction de la sévérité du traitement. L'intensité de la coloration nous permet d'avoir une idée sur la concentration en impuretés. En effet, la coloration des

hydrolysats obtenus aux températures étudiées ainsi que de celle des hydrolysats correspondants au traitement à l'acide ont été mesurées à 420 nm et sont illustrées dans la figure III.45.

La figure III.45 montre bien que la courbe qui représente la concentration d'impuretés en fonction du temps du traitement thermique à 190°C est nettement supérieure à la courbe à 170°C.

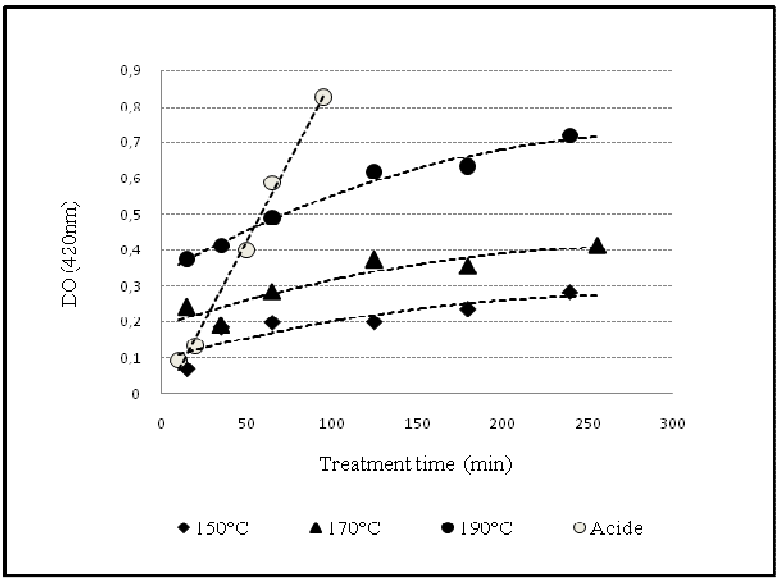


Figure III.45. *Variation en fonction du temps, de la coloration des hydrolysats obtenus par traitements hydrothermique et acide (à 150°C)*

Les pHs des hydrolysats obtenus par traitement hydrothermique et acide ont été mesurés et représentés dans la figure III.46.

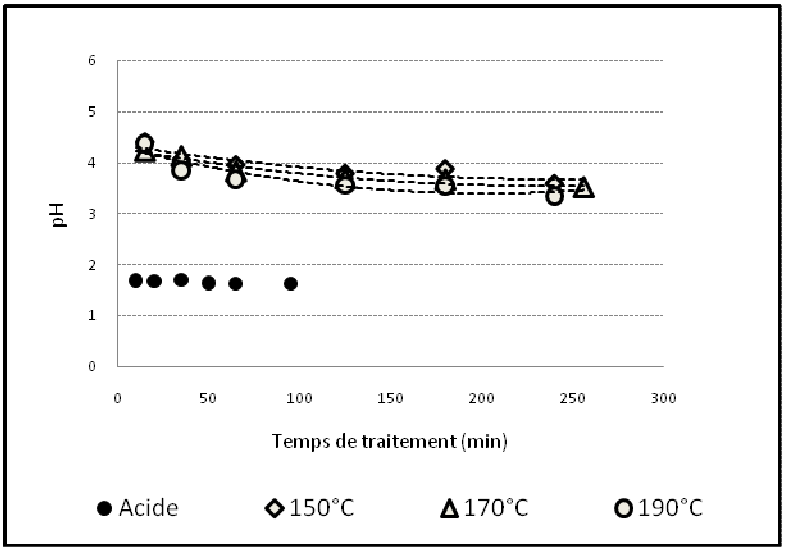


Figure III.46. *Variation du pH des hydrolysats hydrothermiques et acide (à 150°C) en fonction du temps de traitement*

Il existe donc une large différence entre les pHs des différents milieux réactionnels dans les traitements acide et hydrothermique. En effet, l'hydrolyse acide est réalisé à des pHs très faibles ne dépassant pas 1,7. Tandis que les hydrolysats hydrothermiques présentent des pHs allant de 3,5 à 4,2. Ceci est en faveur de la technologie du traitement hydrothermique spécialement quand on tient compte des problèmes de corrosion des équipements dans les procédés acide à très faible pH.

Par ailleurs, le pH très acide des hydrolysats acides diminuent l'intensité de la coloration, donc cette dernière ne permet pas de renseigner d'une façon exacte sur la concentration d'impuretés dans ces hydrolysats acides. Un ajustement de pH de ces hydrolysats acides à un pH équivalent à ceux des hydrolysats hydrothermiques aurait augmenté considérablement l'intensité de leur coloration à 420nm, et reflété mieux le taux d'impuretés présents dans ces hydrolysats acides et démontré mieux le large écart qui existe entre ces hydrolysats acides et les hydrolysats hydrothermiques. Ce résultat nous permet de conclure que l'hydrolyse acide génère beaucoup plus d'impuretés comparée à un traitement hydrothermique. Les hydrolysats hydrothermiques seront donc plus faciles à fractionner et à purifier.

III.3.3. Caractérisation des sucres présents dans les hydrolysats hydrothermiques

III.3.3.1. Chromatographie sur couche mince

Le chromatogramme présenté dans la figure III.47 présente les différentes bandes correspondantes à l'hydrolysat obtenu par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre dans les conditions opératoires sélectionnées (170°C/2heures) dilué 5 fois. Les résultats montrent une large distribution du degré de polymérisation des produits libérés. La faible résolution de séparation entre les bandes du chromatogramme pourrait être attribuée à la présence d'une large variété de sucres libérés dans les hydrolysats hydrothermiques allant du xylose, xylobiose, xylotriose jusqu'aux longues chaînes déposées au milieu de la bande d'élution sur la plaque de silice et dont la séparation dépasse la sensibilité de cette technique.

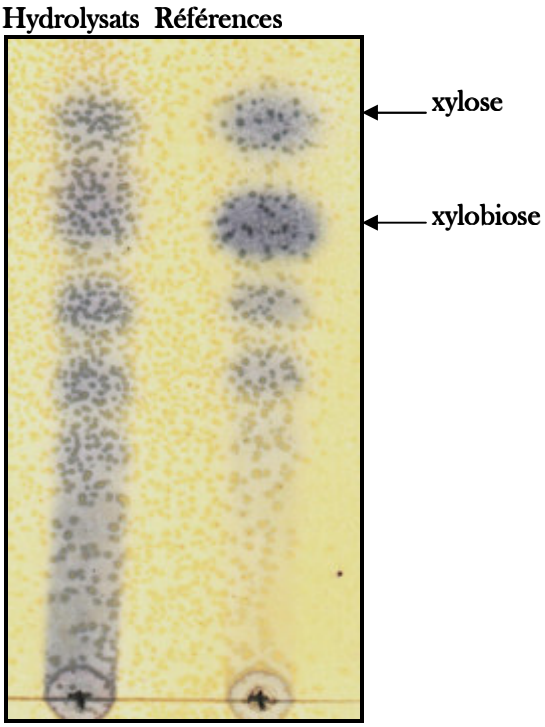


Figure III.47. *Chromatographie sur couche mince de l'hydrolysat hydrothermique de la bagasse de canne à sucre obtenu à 170°C/2h*

Afin d'avoir plus d'informations sur la nature des oligosaccharides ainsi que des polymères solubilisés par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre, nous avons procédé à une analyse des hydrolysats hydrothermiques par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance.

III.3.3.2. Chromatographie d'exclusion de taille haute performance

Plusieurs hydrolysats hydrothermiques (4 répétitions) obtenus dans les conditions opératoires de traitement sélectionnées ont été analysés par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance (HP-SEC) afin de caractériser la composition macromoléculaire des hydrolysats. Les données calculées à partir des chromatogrammes (figure III.48) obtenus sont donnés dans le tableau III.8.

Le tableau III.8 présente les résultats de l'analyse chromatographique à exclusion stérique haute performance de quatre répétitions d'hydrolysat hydrothermique. L'analyse de l'indice de polydispersité montre des valeurs proches de 1,5 pour les 4 échantillons, la composition de ces derniers tend donc à être homogène. La distribution des longueurs de chaîne est donc faible avec une population assez homogène. Ce résultat est cohérent du fait que la méthode d'hydrolyse

hydrothermique adoptée permet majoritairement de libérer de longues chaînes de xylane et peu de xylose monomérique ou de courtes chaînes.

L'hydrolysat (1) présente la plus forte polydispersité avec une valeur de 1,78 mais reste relativement faible (inférieure à 2).

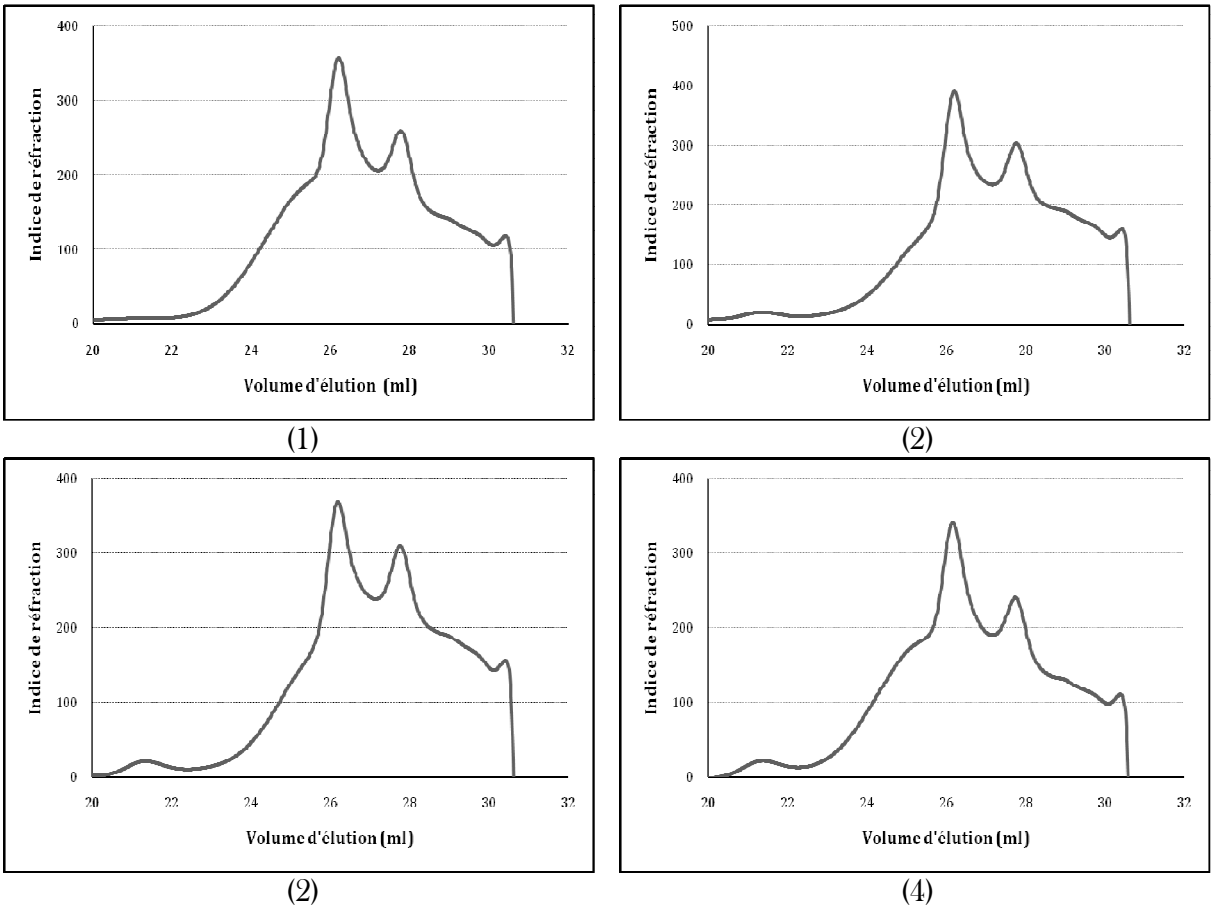


Figure III.48. *Profils d'élution des hydrolysats hydrothermiques (4 répétitions) obtenus par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performence (HP-SEC)*

Tableau III.8. *Caractéristiques macromoléculaires des hydrolysats hydrothermiques (4 répétitions) déterminées par Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance*

	Temps de rétention (min)	***Mw[a] (g/mol)***	***Mn[b] (g/mol)***	***P[c] = Mw/Mn***
(1)	26,202	4825	2697	1,789344
(2)	26,215	3418	2156	1,585411
(3)	26,204	3416	2173	1,572338
(4)	26,176	4971	3297	1,507685

[a] *Mw : Masse moléculaire moyenne*
[b] *Mn : masse moyenne des constituants de faible masse molaire*
[c] *P : indice de polydispersité = Mw/Mn*

L'analyse de la polydispersité montre donc la répétabilité du traitement hydrothermique. L'analyse de la masse moléculaire moyenne (Mw) et de la masse moyenne des constituants de faible masse molaire (Mn) confirme les conclusions tirées de l'analyse de la polydispersité. En effet Mn donne une idée sur la composition en courtes chaines et Mw sur celle des longues chaines. L'échantillon 1 présentant la différence la plus élevée entre son Mw et Mn d'où l'indice de polydispersité le plus élevé enregistré dans ce cas.

Les hydrolysats 2 et 3 présentent des Mn et des Mw presque égaux confirmant la répétabilité du traitement.

Les temps de rétention sont, pour tous les échantillons analysés, de l'ordre de 26 minutes confirmant la similitude de la composition des quatre hydrolysats et donc la répétabilité du traitement thermique.

III.3.4. Conclusion

Le traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre à 170°C pendant 2 heures nous a permis d'atteindre des rendements d'extraction de xylose proches de ceux obtenus par un traitement acide. Un traitement moins sévère à 150°C ou plus fort à 190°C présentent respectivement les inconvénients de donner de faibles rendements de solubilisation ou de générer des impuretés liées à la dégradation des sucres.

L'analyse par HPLC du xylose, la détermination de la matière sèche et de degré de pureté ainsi que la mesure de la coloration nous ont confirmé qu'une température de 170°C et une durée de 2 heures de traitement sont optimales pour assurer une meilleure extraction de la fraction hémicellulosique avec une pureté de 78%. La nouveauté apportée par nos résultats réside dans le

fait qu'avec des conditions opérationnelles modérées on a pu assurer une bonne extraction de la fraction hémicellulosique de la bagasse.

Cette partie du travail sera complétée par une hydrolyse enzymatique optimisée (par des activités endoxylanase et béta-xylosidase) afin de finaliser la conversion de la fraction hémicellulosique de la bagasse solubilisée par traitement hydrothermique, en monomères de xylose.

III.4. Saccharification enzymatique des hydrolysats hydrothermiques

Comme nous l'avons déjà annoncé, l'objectif de cette partie du travail consiste à compléter l'hydrolyse des fractions d'hémicellulose de la bagasse libérées par le traitement hydrothermique jusqu'à obtenir le xylose sous forme monomérique. La catalyse par l'endoxylanase va permettre de réduire la taille des longues chaînes de xylane et faciliter ainsi leur hydrolyse par la β-xylosidase dont l'action sur les produits de l'hydrolyse de l'endoxylanase va permettre la libération de xylose à partir de leurs extrémités réductrices.

La solubilisation des xylanes présents dans la bagasse n'est pas complète par le traitement hydrothermique seul. Afin d'extraire le reste du xylane contenu dans le résidu solide de la bagasse issue du traitement thermique, nous avons fait agir la xylanase et la β-xylosidase de Roquette (surnageant) au cours de la même réaction sur les deux fractions solide et liquide obtenues par traitement hydrothermique. Nous appellerons milieu complet, l'ensemble de ces deux fractions.

Dans la première partie de l'étude (essais préliminaires), les hydrolyses enzymatiques ont été réalisées en faisant agir les deux enzymes (la xylanase et la β-xylosidase de Roquette) en même temps sur des milieux complets, sur le résidu solide de la bagasse traitée et aussi sur des fractions solubles. Toutes les réactions d'hydrolyse enzymatique ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales (température 55°C, pH 4,5 et temps d'hydrolyse 24 heures). Les concentrations de l'endoxylanase et de la β-xylosidase sont 40 UI/ml et 50 UI/ml, respectivement. Ce choix des conditions expérimentales étant arbitraire et sert uniquement à titre comparatif.

Au cours de la deuxième partie de l'étude nous avons procédé à l'optimisation des conditions de l'hydrolyse de chacune des enzymes utilisées afin de maximiser le rendement de récupération du xylose. L'optimisation de l'action des deux enzymes a pu se faire soit en les faisant agir touts les deux en même temps soit en déterminant les conditions optimales correspondantes à chacune des deux enzymes séparément. Nous avons choisi de procéder à l'optimisation de l'action

de l'endoxylanase ensuite de la β-xylosidase séparément pour pouvoir atteindre le maximum d'activité de chacune des deux enzymes et donc d'atteindre le rendement total équivalent à la somme des deux activités enzymatiques qui ne peut être que le rendement maximal.

III.4.1. Essais préliminaires

III.4.1.1. Hydrolyse enzymatique sur milieu complet

Pour étudier l'action des enzymes sur le milieu complet et sur les fractions solubles et estimer ainsi l'effet du temps de traitement hydrothermique sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique, nous avons réalisé l'hydrolyse enzymatique de plusieurs milieux complets obtenus à différents temps de traitement hydrothermique. Le suivi de l'hydrolyse a été réalisé par dosage des extrémités réductrices libérées sous l'action des enzymes par la méthode dérivée de celle de Kidby et Davidson (1973).

Nous avons représenté la quantité de sucres réducteurs libérés par la seule action des enzymes en soustrayant celle qui a été obtenue par traitement hydrothermique. Les courbes obtenues sont données dans la figure III.49.

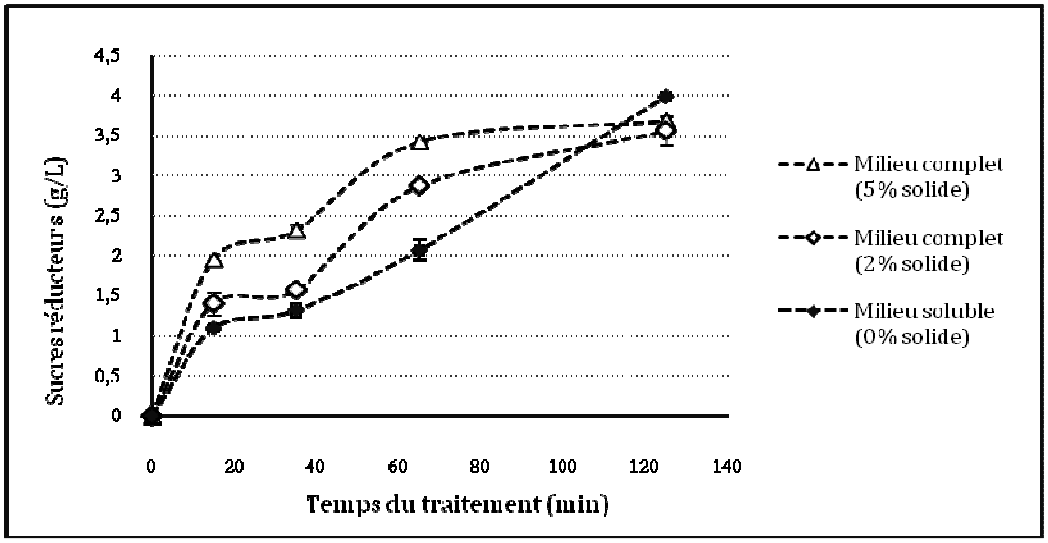


Figure III.49. *Effet de la concentration de la fraction solide sur le taux de l'hydrolyse enzymatique des milieux complets correspondant à différents temps de traitements hydrothermiques*

Les résultats obtenus montrent que le rendement (en termes de sucres réducteurs) de l'hydrolyse enzymatique de la fraction soluble (sans solide) augmente en fonction du temps de traitement thermique. Ceci pourrait être dû à l'augmentation avec le temps de traitement de la

concentration en substrat disponible pour les enzymes. Cependant, en milieu complet, l'hydrolyse enzymatique atteint un maximum au bout d'une heure de traitement thermique. Au delà d'une durée de 1 heure, la présence de la fraction solide rend le milieu réactionnel plus complexe ce qui peut freiner l'accession des enzymes à la fraction soluble.

Afin de vérifier l'effet de la présence du résidu solide sur le rendement de l'hydrolyse enzymatique, nous avons fait varier la concentration en solide lors de l'hydrolyse enzymatique du milieu complet. Les résultats obtenus sont représentés dans la même figure III.49. Cette figure montre bien que la variation des sucres réducteurs pour les deux concentrations de solides est la même au bout de deux heures. En effet, on atteint la même concentration de sucres réducteurs de l'ordre de 3,5 g/L avec une tendance à la stabilisation, alors que dans le cas de la fraction soluble on atteint 4 g/L. Ainsi, la concentration de résidu solide dans le milieu complet ne semble pas avoir d'effet sur le rendement d'hydrolyse enzymatique. La présence du résidu solide a même un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique puisque pour la fraction soluble on atteint un rendement supérieur à celui obtenu en milieu complet. D'où la nécessité de faire agir les enzymes seulement sur les fractions solubles.

- *Comparaison des cinétiques d'hydrolyse enzymatique d'un milieu complet et d'un milieu soluble*

Pour mieux caractériser la réaction enzymatique des fractions solubles et en milieu complet nous avons suivi la cinétique en fonction du temps de l'hydrolyse de chacune de ces fractions par la xylanase Roquette (Figure III.50). Le suivi de l'hydrolyse a été réalisé par dosage des extrémités réductrices libérées par la méthode dérivée de celle de Kidby et Davidson (1973).

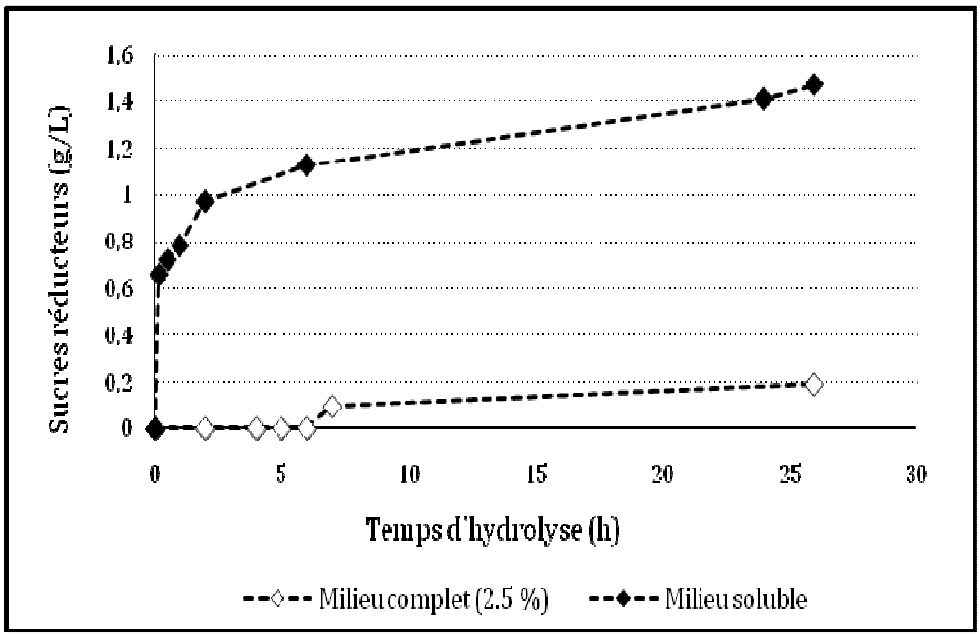


Figure III.50. *Hydrolyse enzymatique (par la xylanase de Roquette 40 UI/ml) en milieu complet et en milieu soluble obtenu par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre (170°C pendant 2h)*

La figure III.50 montre que l'hydrolyse en milieu soluble est beaucoup plus rapide qu'en milieu complet. Ceci peut avoir pour origine la diffusion de l'enzyme, la complexité du milieu ou encore l'inhibition par la présence d'insolubles. De plus, l'hydrolyse enzymatique d'un milieu soluble a permis d'atteindre des concentrations en sucres réducteurs beaucoup plus élevées que celles obtenues en milieu complet. On confirme donc la nécessité de faire agir les enzymes seulement sur les fractions solubles afin de saccharifier les produits solubilisés par traitement hydrothermique.

III.4.1.2. Hydrolyse enzymatique du résidu solide de la bagasse

Les résidus solides de la bagasse de canne à sucre issu d'un traitement hydrothermique à différentes durées ont subi une hydrolyse par l'endoxylanase de Roquette dans le but d'évaluer les xylanes pouvant encore être contenus dans la partie solide. Les sucres réducteurs libérés ont été déterminés également par la méthode dérivée de celle de Kidby et Davidson (1973) et les résultats sont représentés dans la figure III.51.

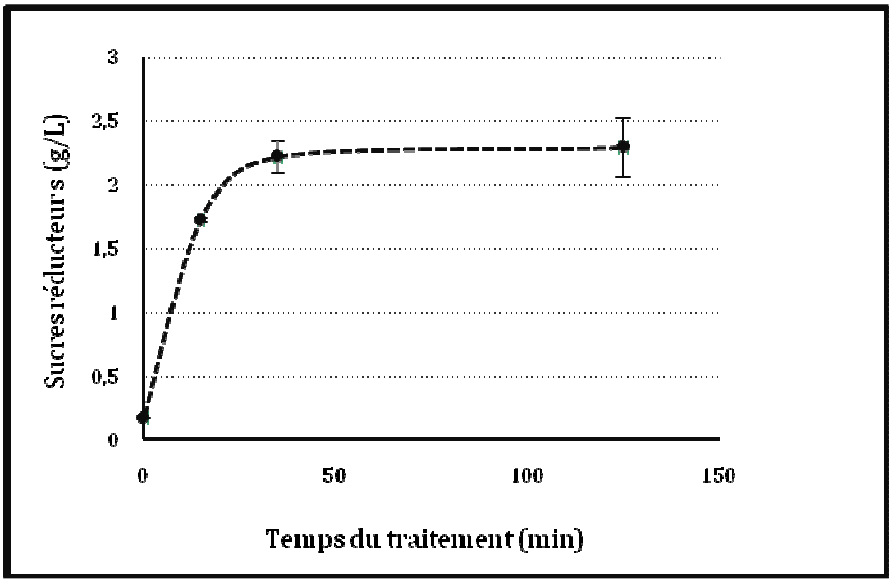


Figure III.51. *Hydrolyse enzymatique par l'endoxylanase de Roquette (40 UI/ml pendant 24 heures) des résidus solides de la bagasse prétraitée (20 g/L) obtenus à différents temps de traitement hydrothermique*

La figure III.51 montre que plus le temps de traitement hydrothermique augmente plus la structure du résidu solide de la bagasse traitée est dégradée et fragilisée ce qui la rend plus facilement hydrolysable par la xylanase. Au bout de 35 minutes de traitement la structure de la bagasse ne change plus ce qui explique le palier d'activité atteint.

Ce résultat montre que le résidu solide de la bagasse traitée n'est pas complètement épuisé et pourrait être encore dirigé vers d'autres voies de valorisation telle que son utilisation comme source de carbone en milieu de culture de microorganismes présentant un intérêt pour la production d'activités enzymatiques (par exemple la souche RutC30 sur milieu solide bagasse).

III.4.1.3. Hydrolyse enzymatique des fractions solubles

Les premiers essais de l'hydrolyse enzymatique des fractions solubles avaient pour objectif d'évaluer l'apport de cette étape dans le rendement final de solubilisation des xylanes à partir de la bagasse de canne à sucre.

La figure III.52 montre une comparaison des concentrations de sucres réducteurs libérés par la combinaison du traitement hydrothermique avec une hydrolyse enzymatique et celles

obtenues par une hydrolyse enzymatique seule ou un traitement thermique seul de la bagasse. L'observation de la figure montre que le traitement enzymatique permet d'obtenir 4 g/L alors que 6 g/L de sucres réducteurs sont libérés par la combinaison des deux traitements enzymatique et thermique. Ces 4g/L représentent 66% du rendement de conversion maximum. Ils sont obtenus par l'hydrolyse enzymatique, alors que le traitement thermique seul plafonne à un peu mois de 2 g/L (moins du 1/3 de ce qu'on peut espérer obtenir par la combinaison des 2 traitements.

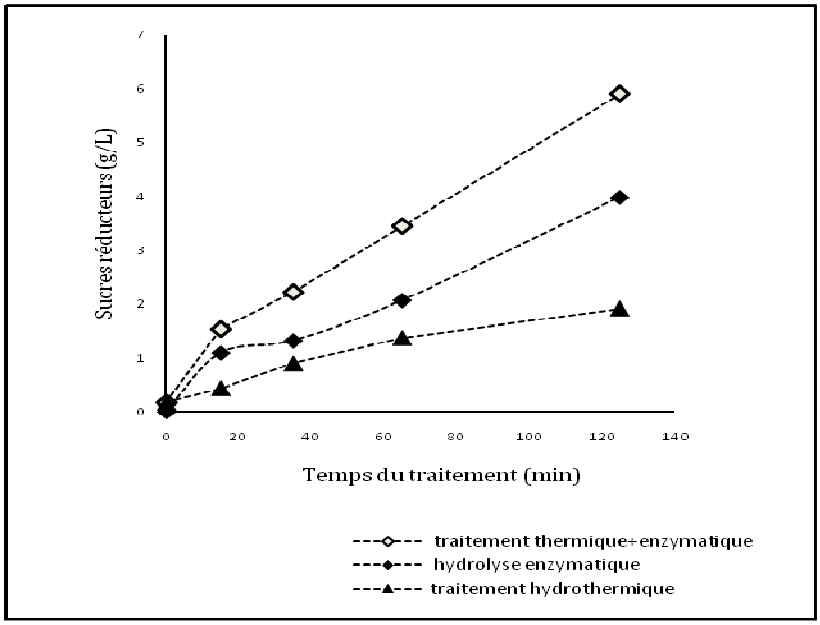


Figure III.52. *Efficacité d'un traitement hydrothermique seul, d'une hydrolyse enzymatique et de l'association traitement thermique et enzymatique de la bagasse de canne à sucre (exprimée en concentration des sucres réducteurs libérés)*

Ces résultats obtenus sur l'hydrolyse enzymatique constituent des données préliminaires qui ont permis de démontrer l'importance de cette étape dans l'élaboration d'un protocole d'extraction de xylose à partir de la bagasse de canne à sucre. En effet, l'action combinée d'une endoxylanase et une β-xylosidase donne 66% de rendement et permet de terminer la conversion en monomère de xylose les dérivés hémicellulosique solubilisés par traitement hydrothermique. Afin de mettre en place un protocole de production de xylose à partir de la bagasse de canne à sucre, une optimisation des conditions expérimentales de cette hydrolyse enzymatique est nécessaire et fera l'objet de ce qui suit.

III.4.2. Optimisation des conditions de l'hydrolyse enzymatique de la fraction solubilisée par traitement hydrothermique de la bagasse de canne à sucre

III.4.2.1. Etude de l'hydrolyse par l'endoxylanase

III.4.2.1.1. Effet de la concentration du substrat

Pour déterminer la concentration optimale des dérivés de xylane contenus dans les hydrolysats hydrothermiques nous avons procédé à les concentrer plusieurs fois à l'aide d'un Rotavapor (BÜCHI R-200- Vacuum Controller V-800). Les hydrolysats concentrés vont par la suite subir l'hydrolyse enzymatique soit par l'endoxylanase de Roquette seule (à 40 UI/ml) soit en association avec la β-xylosidase (50 UI/ml). L'hydrolyse a été réalisée à 60°C pour la xylanase et à 55°C pour la β-xylosidase pendant 24 heures. La réaction est ensuite arrêtée en portant l'échantillon à l'ébullition pendant 5 minutes. La quantité de xylose libérée a été dosée par HPLC. Les rendements d'hydrolyse ont été calculés (en %) par rapport à la quantité de xylose potentielle présente dans les hydrolysats hydrothermiques et sont donnés dans la figure III.53.

La figure III.53 montre que l'hydrolyse enzymatique combinée (xylanase Roquette et β-xylosidase) est maximale pour une concentration de xylane et dérivés de l'ordre de 10 g/L. Au delà, le rendement de l'hydrolyse enzymatique global diminue. Ce résultat est explicable par le comportement de chacune des deux enzymes. En effet, La β-xylosidase trouve son activité diminuée pour des concentrations supérieures à 10 g/L alors que la xylanase de Roquette ne commence à perdre son activité qu'à partir de 30 g/L avec un ralentissement de sa cinétique à partir de 10 g/L. Cette diminution pourrait être due à la concentration des impuretés (composés inhibiteur de l'activité enzymatique) tels que le furfural et la lignine pouvant être présents dans les hydrolysats. Il est à noter que cette concentration de 10 g/L correspond à un hydrolysat concentré deux fois.

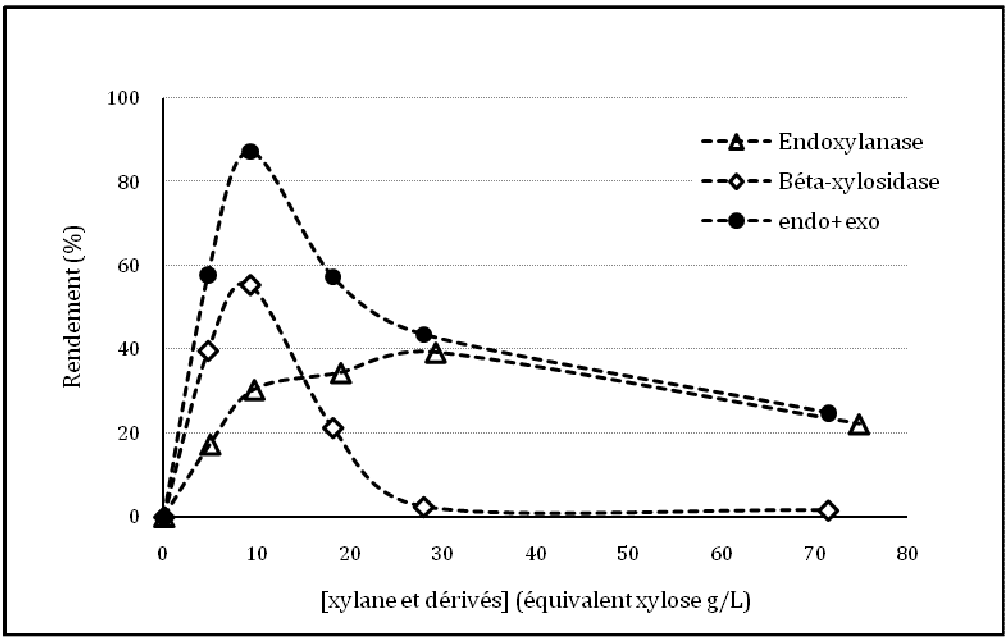


Figure III.53. *Rendement (en %) de l'hydrolyse enzymatique des hydrolysats hydrothermiques de la bagasse en fonction de la concentration du xylane et dérivés (exprimés en équivalent xylose g/L).*

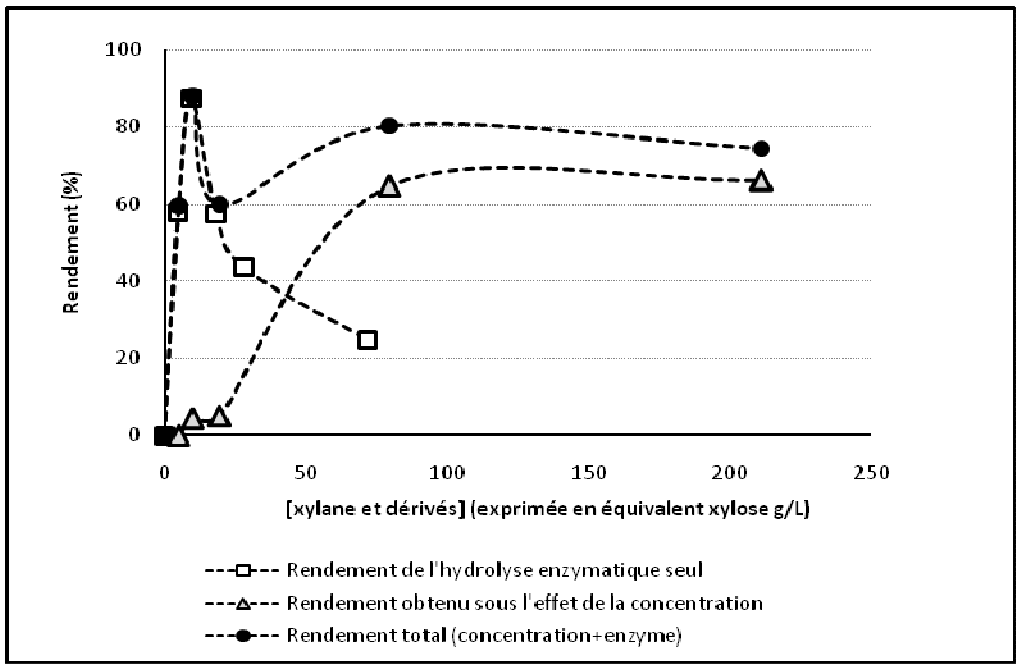


Figure III.54. *Effet de la concentration (en Rotavapor) et/ou de l'hydrolyse enzymatique des hydrolysats hydrothermiques de la bagasse sur le rendement de libération de xylose*

La concentration en Rotavapor a permis de gagner en rendement d'hydrolyse et de passer de 60% à 85%. Cette valeur ajoutée est relativement faible par rapport au coût de la concentration des hydrolysats par Rotavapor. Il est donc plus convenable d'utiliser directement les hydrolysats hydrothermiques pour l'hydrolyse enzymatique.

Ceci a été confirmé par les résultats présentés dans la figure III.54 qui montrent que la concentration des hydrolysats est elle-même un traitement thermique à ébullition qui permet d'augmenter le rendement de libération du xylose (sans action enzymatique) jusqu'à une limite de 79 g/L de xylane et oligomères, avec un rendement maximal de 60%. Les hydrolysats enzymatiques à 5 g/L traités par la xylanase de Roquette donnent des rendements de l'ordre de 60%.

La xylanase de Roquette étant un jus enzymatique non purifié donc à faible coût, son utilisation permet d'atteindre des rendements équivalents à ceux obtenus après une forte concentration des hydrolysats ce qui la rend mieux adaptée à notre application. Les hydrolysats concentrés sont d'une part, non favorables pour l'hydrolyse enzymatique (concentration d'impuretés qui contribue à l'inhibition de l'activité des enzymes) et d'autre part, la concentration augmente la teneur en impuretés ce qui rend difficile une éventuelle étape de purification et de cristallisation du xylose.

III.4.2.1.2. Détermination de la concentration optimale de la xylanase

Pour assurer une hydrolyse enzymatique dans les meilleures conditions un des paramètres les plus importants à optimiser est la concentration de l'enzyme utilisée.

Afin de déterminer la concentration optimale de l'endoxylanase nous avons fait varier la concentration de la xylanase de Roquette de 0 à 1200 UI/ml hydrolysat hydrothermique, et nous avons déterminé le taux de l'hydrolyse pour chacune des concentrations.

La réaction s'est déroulée à 60°C pendant 24 heures, et le degré de l'hydrolyse a été déterminé par dosage des extrémités réductrices libérées dans le milieu réactionnel selon la méthode de Kidby et Davidson (1973).

Puisque nous disposons d'une xylanase purifiée (xylanase INRA) en plus du jus enzymatique nous avons voulu tester l'efficacité de cette enzyme sur les hydrolysats hydrothermiques. Pour cela nous avons fait varier également la concentration de cette enzyme de 0 à 150 UI/ml hydrolysat hydrothermique. Les résultats obtenus pour chacune des enzymes sont représentés dans la figure III.55.

L'analyse des résultats obtenus montre la forte activité de la xylanase de Roquette comparée à l'enzyme purifiée. En effet, on obtient des concentrations de sucres réducteurs jusqu'à 4 fois plus importantes (16 g/L avec la xylanase de Roquette contre uniquement 4 g/L obtenus avec la xylanase purifiée de l'INRA).

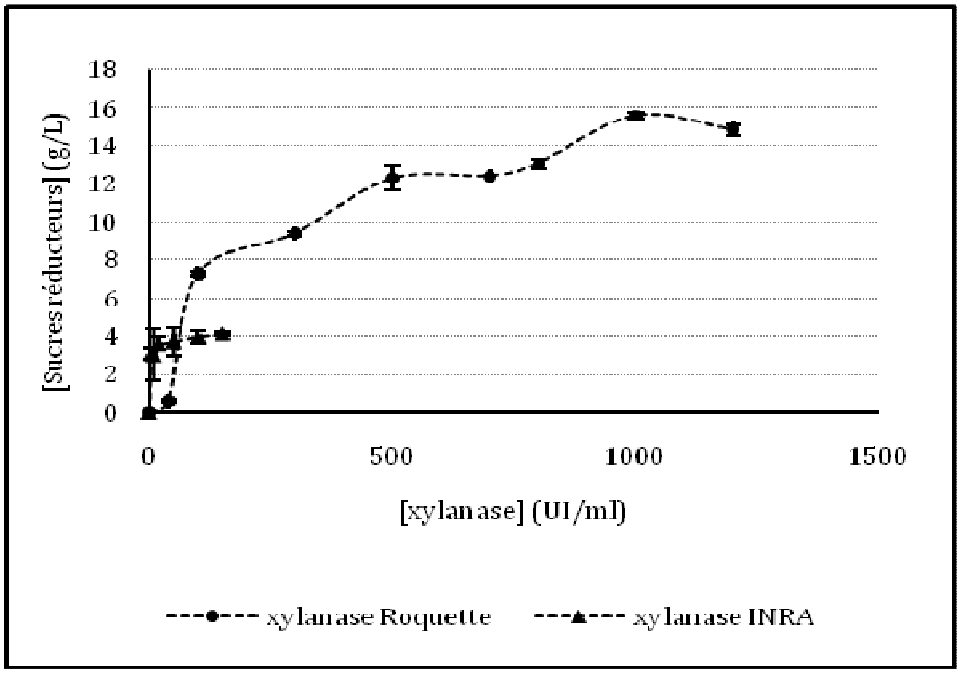


Figure III.55. *Libération des sucres réducteurs à partir des hydrolysats hydrothermiques de bagasse de canne à sucre en fonction de la concentration de la xylanase*

La figure III.55 permet aussi de déterminer la concentration optimale de la xylanase de Roquette permettant d'atteindre le rendement maximal et qui est de l'ordre de 1000 UI/ml.

III.4.2.1.3. Etude de l'inhibition de la xylanase de Roquette par le xylose

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de ralentissement de la cinétique enzymatique au cours de la libération du xylose et donc ne pas être limité par ce dernier, une étude d'inhibition de l'activité enzymatique par le xylose a été réalisée en vue de déterminer la concentration à partir de laquelle l'activité enzymatique peut être affectée. Pour cela nous avons fait agir l'enzyme sur son substrat modèle, le xylane soluble de bouleau, en présence du xylose à différentes concentrations. Le xylane de bouleau a été solubilisé dans le tampon acétate de sodium à pH 5. La réaction d'hydrolyse a été réalisée pendant 24 heures et les produits d'hydrolyse ont été analysés par HPLC

avant et après hydrolyse acide. Les résultats exprimés en équivalent xylose sont donnés dans la figure III.56.

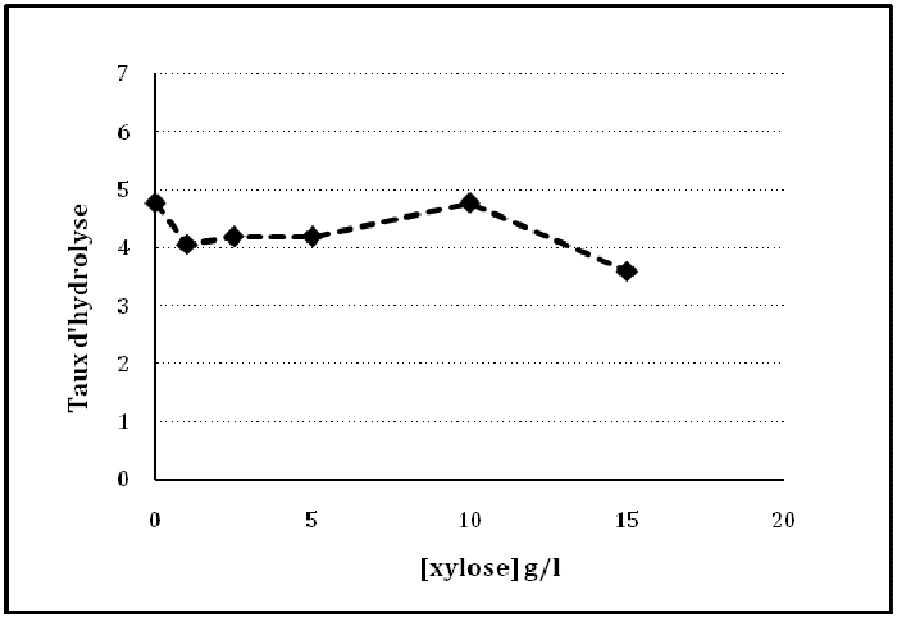


Figure III.56. *Effet de la concentration du xylose en milieu réactionnel sur le rendement d'hydrolyse enzymatique (en %) du xylane de bouleau par la xylanase de Roquette (25UI/ml)*

La figure III.56 montre que le xylose n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité xylanasique jusqu'à une limite de concentration de xylose dans le milieu réactionnel de 15 g/L. Au delà de cette concentration la présence du xylose dans le milieu ralentit l'activité de l'enzyme.

III.4.2.1.4. Etude de l'effet du réglage de pH sur la cinétique en fonction du temps de l'hydrolyse enzymatique des fractions solubles

Les hydrolysats hydrothermiques à la sortie du réacteur présentent des pH de l'ordre de 3,9 différents du pH optimal de la xylanase utilisée (pH 5). Afin de vérifier la possibilité d'une variation possible induite par le pH sur l'activité enzymatique, nous avons réalisé une hydrolyse enzymatique d'un hydrolysat hydrothermique avec et sans réglage de pH à la valeur optimale pour une concentration égale en enzyme. La figure III.57 présente les résultats obtenus.

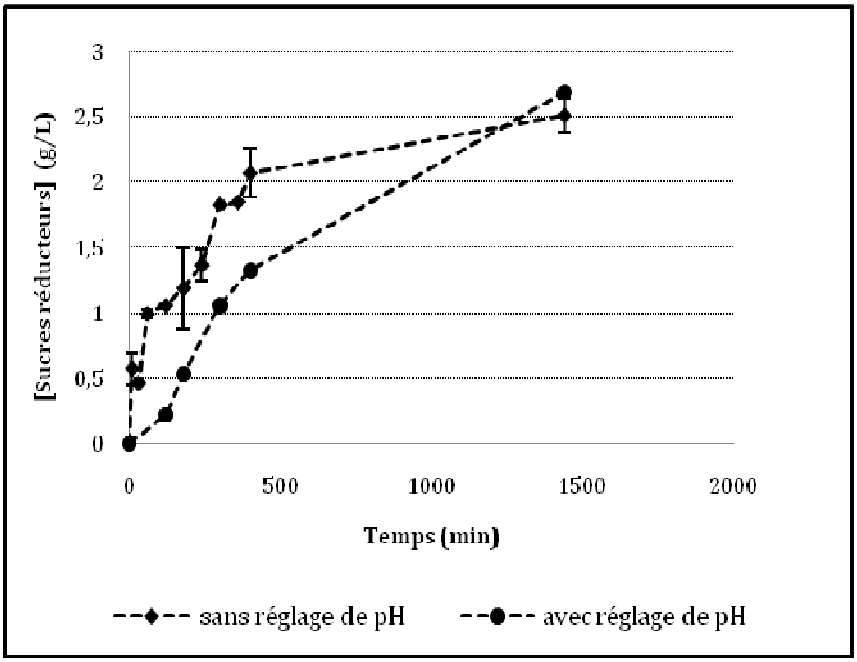


Figure III.57. *Cinétique de l'hydrolyse enzymatique de l'hydrolysat hydrothermique de la bagasse de canne à sucre par la xylanase de Roquette avec et sans réglage de pH*

Cette étude montre qu'au bout de 24 heures d'hydrolyse le réglage de pH permet d'atteindre des concentrations en sucres réducteurs légèrement supérieures à celles obtenues sans réglage de pH (2,69 g/L avec réglage de pH contre 2,5 g/L sans réglage de pH). Cette légère différence peut être considérée comme négligeable et les hydrolysats hydrothermiques peuvent être directement utilisés sans réglage de pH pour l'hydrolyse enzymatique avec la xylanase de Roquette avec un temps optimal d'incubation de 7 heures.

III.4.2.2. Hydrolyse par la béta-xylosidase

Les fractions solubles hydrolysées par l'endoxylanase de Roquette dans les conditions optimisées vont par la suite subir une hydrolyse catalysée par la β-xylosidase afin de poursuivre leur saccarification et obtenir du xylose monomérique.

III.4.2.2.1. Effet de la concentration de la β-xylosidase sur le rendement de récupération du xylose

Pour déterminer la concentration optimale de la β-xylosidase permettant d'atteindre son activité maximale plusieurs concentrations d'enzyme allant de 0 à 300 UI/ml ont été testées. Les réactions d'hydrolyse se sont déroulées pendant 24 heures sans réglage du pH des hydrolysats

hydrothermiques traités par la xylanase de Roquette. L'analyse du xylose libéré a été réalisée par méthode enzymatique (kit spécifique au xylose). La figure III.58 présente le xylose libéré par la β-xylosidase après soustraction de la concentration du xylose initiale (libéré par la xylanase de Roquette et le traitement hydrothermique).

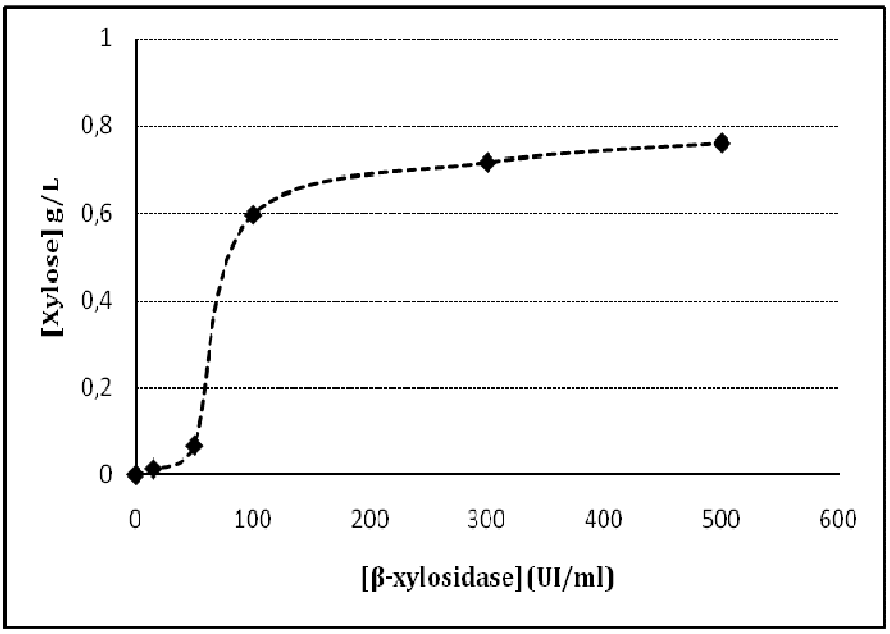


Figure III.58. *Effet de la concentration de la β-xylosidase sur la libération du xylose (au bout de 24 heures d'hydrolyse).*

L'analyse des résultats montre la faible concentration de xylose obtenue par l'action de la β-xylosidase qui ne dépasse pas les 0,8 g/L avec une concentration optimale d'enzyme de 100 UI/ml. Ceci peut s'expliquer par la faible concentration en substrat des hydrolysats obtenus par le traitement hydrothermique. La xylanase Roquette a permis de libérer 1,47 g/L correspondant à un rendement de récupération du xylose de l'ordre de 40 %. Le rendement global maximal de l'hydrolyse enzymatique (résultant de l'action des 2 enzymes) est de 60%.

CONCLUSION GENERALE

Au terme de ce travail, nous pouvons dire que la bagasse de canne à sucre, en raison de sa composition, de sa disponibilité comme co-produit d'une industrie majeure –la sucrerie de canne- présente toutes les qualités pour constituer un modèle d'étude pour la valorisation. La démarche que nous avons adoptée dans cette étude se base sur le concept de la bioraffinerie. Elle part de la plante entière et sa transformation classique en sucre pour proposer un procédé d'extraction de xylose combinant un traitement hydrothermique avec une hydrolyse enzymatique afin de valoriser la fraction hémicellulosique de la bagasse. Celle-ci peut alors retourner à l'avant de l'usine pour être brûlée dans les chaudières à vapeur. On peut imaginer, dans le cadre de la démarche « bioraffinerie » que la lignine soit à son tour séparée et valorisée par une chimie fine utilisant les solvants ioniques et que la cellulose amorphe résultante des différents traitements soit exploitée comme support de filtration à la place du kieselguhr.

Notre travail a commencé par la caractérisation de la bagasse offerte par le CERF, centre de recherche sur la canne à la Réunion. Cet échantillon contient 26% d'hémicellulose formée à 92% de xylose. Sa forte teneur en lignine (20%) en fait un produit hydrophobe particulièrement difficile à hydrater. Il a été nécessaire de gonfler l'échantillon sec que nous avons reçu pendant toute une nuit dans l'eau. D'où l'intérêt de concevoir cette valorisation comme un atelier intégré à la sucrerie, qui recevrait la bagasse humide et chaude à la sortie des moulins de canne à sucre.

Dans cette logique d'intégration de l'unité de valorisation à la sucrerie de canne, il est possible d'imaginer l'implantation d'une unité de fermentation sur milieu solide constitué par la bagasse de canne à sucre comme milieu de culture de deux souches fongiques (RutC30 de *Trichoderma reesei et* AX4 de *Talaromyces thermophilus*). Cela permettrait d'induire des activités enzymatiques xylanolytique et xylosidasique utiles dans la démarche que nous poursuivons. Du reste, la bagasse a montré de telles aptitudes avec un niveau d'induction variable avec la nature de l'activité enzymatique.

Pour les besoins de notre étude nous avons utilisé deux xylanases, une endoxylanase de *Bacillus xylanolyticus* purifiée mise à notre disposition par l'équipe Technologie Enzymatique et Physico-Chimie des Agroressources de l'UMR FARE (xylanase INRA). La deuxième enzyme est plutôt un surnageant de culture *d'Humicola insolens* mise à notre disposition par la Société Roquette Frères (xylanase Roquette) à activité xylanolytique prédominanate. De même un surnageant de culture de *Trichoderma Reesei* riche en β-xylosidase nous a été donné par Roquette. La comparaison entre les deux xylanases a montré l'intérêt d'utiliser un surnageant de

culture pouvant comporter des activités annexes solubilisantes plutôt qu'une enzyme pure, qui malgré une forte activité initiale s'est révélée instable à la dilution et dans le temps.

L'hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre par la xylanase INRA a permis la libération des xylooligosaccharides dont les produits finaux sont de DP2 à 4. La présence du xylose dans les chromatogrammes des hydrolysats de bagasse nous a permis de suggérer l'existence d'activités endogènes dans la bagasse responsables de cette libération. Un autoclavage (121°C pendant 1heure) de la bagasse avant hydrolyse par voie enzymatique a été réalisé afin de la stériliser et inactiver toute activité enzymatique qui peut interférer avec l'enzyme étudiée.

L'hydrolyse de la bagasse par la xylanase INRA à différentes concentrations et l'analyse des hydrolysats par HPLC ont permis l'obtention des rendements d'hydrolyse qui augmentent en fonction de la concentration enzymatique avec un maximum de rendement d'hydrolyse de 10% qui a été atteint avec la concentration enzymatique de 86,86 UI/ml de volume réactionnel. Ce rendement est faible et montre bien la difficulté de la xylanase INRA à agir sur la paroi lignocellulosique de la bagasse de canne à sucre. Un prétraitement à l'ammoniaque de cette dernière a été réalisé afin d'améliorer sa susceptibilité à l'hydrolyse enzymatique et a permis d'augmenter d'un facteur 4 le rendement de l'hydrolyse de 12 à 48,61%.

Pour améliorer les rendements de solubilisation de la fraction hémicellulosique de la bagasse, nous avons fait le choix d'utiliser pendant toute l'étude le surnageant de culture *d'Humicola insolens* (xylanase Roquette). Cela a permis d'avoir des rendements d'hydrolyse jusqu'à 62,37% après 24 heures pour une concentration enzymatique de 100 UI/ml. Les 86,86 UI/ml ont permis d'avoir un rendement de 53,09%. Ce qui prouve la forte aptitude de ce surnageant de culture à hydrolyser des substrats lignocellulosiques telle que la bagasse de canne à sucre.

L'analyse par HPLC de la composition monosaccharidique des hydrolysats de la bagasse obtenus après hydrolyse par la xylanase Roquette a révélé la présence de l'arabinose, du glucose et du galactose en plus du xylose. Les teneurs en arabinose et glucose étaient fonction de la concentration enzymatique et aussi du temps d'incubation. Ceci nous a permis de suggérer la présence, en plus de l'activité xylanase principale, des activités cellulase et arabinofuranosidase. Ces activités semblent être réduites, d'une part, par ce que l'activité majoritaire de ce jus enzymatique est une activité xylanolytique et d'autre part, les conditions expérimentales de l'hydrolyse (pH 5 et à 60°C) sont optimales de l'activité xylanase. La quantité relativement importante (jusqu'à 5 g/L) de

galactose détectée dans les hydrolysats de bagasse augmente en fonction de la concentration, ce qui veut dire que ce galactose ne provient donc pas de l'hydrolyse de la bagasse mais serait plutôt apporté dans le milieu réactionnel par le surnageant enzymatique.

La présence des activités enzymatiques annexes (cellulase et arabinofuranosidase) dans le surnageant (xylanase Roquette) en plus de son activité xylanase principale pourrait expliquer la capacité de ce jus à hydrolyser la fraction hémicellulosique de la bagasse de canne à sucre avec des rendements importants. L'action synergique d'une cellulase et une arabinofuranosidase a permis d'améliorer l'accessibilité de l'enzyme aux arabinoxylanes permettant une amélioration des rendements d'hydrolyse. Le degré de pureté (xylose/monosaccharides) des hydrolysats obtenus était de 47%. L'étude de l'effet de la concentration du substrat sur l'hydrolyse de la bagasse à des concentrations allant de 10 à 60 g/L a montré la capacité de l'enzyme à fonctionner dans des milieux complexes peu hydratés. Ceci conforte l'intérêt économique de l'utilisation de ce surnageant de culture qui autorise l'utilisation de concentrations élevées de bagasse en vue de sa valorisation. Pour vérifier cet avantage de la xylanase Roquette en milieu concentré, un essai d'hydrolyse enzymatique de la bagasse de canne à sucre à 150 g/L a été réalisé dans un réacteur pilote.

Le traitement thermique de la bagasse en présence d'acide (H_2SO_4 à 1% à 150°C) a permis la détermination du maximum de xylose extractible qui est égale à 0,22 g xylose/g bagasse sèche équivalent à un rendement de solubilisation de 88% de la masse sèche d'hémicellulose. La solubilisation par traitement acide est accompagnée de la libération de glucose, d'arabinose et de galactose avec des concentrations qui peuvent aller jusqu'à 2 g/L, 1,6 g/L et 0,41 g/L, respectivement. Au bout de 20 min de traitement correspondant au rendement maximal d'extraction nous avons observé la dégradation des sucres (xylose et arabinose) manifestée par l'augmentation de la coloration du milieu. En plus de cet inconvénient, l'hydrolyse acide nécessite une étape de neutralisation du milieu réactionnel qui peut affecter le rendement de l'extraction. Pour cela nous avons opté pour le traitement hydrothermique qui n'utilise que l'eau comme réactif dans les réactions d'autohydrolyse.

L'analyse par HPLC des hydrolysats hydrothermiques de la bagasse correspondant aux trois températures étudiées a permis de déterminer les différents rendements de solubilisation et de choisir une température de 170°C qui permet un rendement maximal de 55% ±0,22 (MS) pour une durée de 4 heures de traitement alors que 2 heures ont suffi pour atteindre les 48,28%±0,22 de rendement d'extraction. D'où le choix de 2 heures comme durée de traitement. La détermination

de la masse sèche des hydrolysats hydrothermiques ainsi que des écarts qui existent entre la concentration en xylose et la concentration en masse sèche de l'hydrolysat nous a permis d'avoir une idée sur le taux d'impuretés. Aux températures 170 et 190°C on a atteint presque le même taux d'extraction. L'analyse des masses sèches de chacun des hydrolysats révèle des concentrations en impuretés plus élevées dans le cas du traitement à 190°C. Ceci a été confirmé par l'analyse de la coloration des hydrolysats.

L'analyse de la composition monosaccharidique (en glucose, arabinose et galactose) des hydrolysats hydrothermiques obtenus aux trois températures étudiées comparée à celle des hydrolysats du traitement acide a montré que le traitement hydrothermique libère des quantités d'impuretés moindres. Le traitement hydrothermique présente donc l'avantage de solubiliser des concentrations plus faibles en sucres contaminants.

L'analyse qualitative des hydrolysats hydrothermiques obtenus dans les conditions de traitement optimisées a montré que ce dernier libère majoritairement de longues chaînes de xylane et peu de xylose monomérique ou de courtes chaînes. En effet, la caractérisation par Chromatographie sur Couche Mince, a révélé une large distribution du degré de polymérisation des produits libérés allant du xylose, xylobiose, xylotriose jusqu'aux longues chaînes déposées au milieu de la bande d'élution sur la plaque de silice et dont la séparation dépasse la sensibilité de cette technique. L'analyse de la composition macromoléculaire par Chromatographie à exclusion stérique haute performance a montré une distribution macromoléculaire assez faible avec une population qui tend à être homogène et ayant une masse moléculaire moyenne (Mw) de l'ordre de 4157 g/mol avec un indice de polydispersité proche de 1,5. L'analyse de la polydispersité ainsi que les temps de rétention des échantillons analysés nous a permis de vérifier la répétabilité de la technique de traitement hydrothermique.

Afin de finaliser la saccharification complète de ces longues chaînes de xylane solubilisées, les hydrolysats hydrothermiques ont subi une hydrolyse enzymatique par la xylanase et la β-xylosidase de Roquette. Les conditions des hydrolyses ont été optimisées. L'étude de l'hydrolyse enzymatique des fractions solubles a montré des rendements supérieurs comparés à ceux obtenus sur milieu complet quelque soit le temps de traitement hydrothermique. La présence du résidu solide a même montré un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique, pour cela nous avons fait agir les enzymes seulement sur les fractions solubles.

L'optimisation des conditions de l'hydrolyse enzymatique des deux surnageants (xylanase et -xylosidase) a été réalisée séparément. L'étude de l'effet de la concentration des xylanes et oligomères a montré que la xylanase Roquette présente un maximum d'activité à 30 g/L. La concentration optimale de l'enzyme à été déterminée et est de 1000 UI/ml hydrolysat hydrothermique. L'optimisation de la concentration de la β-xylosidase a permis de déterminer une concentration optimale de 100 UI/mL avec un rendement maximal de récupération de xylose de l'ordre de 60%.

En conclusion nous pensons que ce travail est une étape préliminaire à la démarche « bioraffinerie » de canne à sucre qui intégrerait dans l'usine principale un atelier d'extraction de xylose. La bagasse serait alors utilisée à la sortie des moulins et passerait dans un réacteur à eau sous pression (170°C) pendant 2 heures avec agitation ultraturax pour bien disperser la fraction solide. A la sortie du réacteur, les hydrolysats sont séparés par filtration et des presses à haute pression comme celles de la pulpe de betterave permettraient de récupérer les eaux de presse contenant le reste de la fraction solubilisée et une bagasse déshydratée qu'on peut alimenter dans les chaudières à vapeur. La fraction solubilisée serait alors traitée enzymatiquement par deux enzymes une endo-xylanase et une β-xylosidase qui catalyseraient l'hydrolyse des xylanes et oligo-xylanes en xylose. Une épuration de ce jus suivie de cristallisation permettrait de produire du xylose cristallisé. Les enzymes n'ont pas besoin d'être pures. Elles peuvent être produites sur place par cultures de souches fongiques sur milieu solide constitué de bagasse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abatzoglou N., Chornet E., Belkacemi K., Overend R.P. (1992).
Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation.
Chemical Engineering Science, 47, 1109–12.

Abatzoglou N., Koeberle P.G., Chornet E., Overend R.P. et Koukios E.G. (1990).
An application to medium consistency suspensions of hardwoods using a plug flow reactor. *Canadian Journal of Chemical Engineering,* 68, 627-638.

Allen S., Kam L., Zemann A., Antal M. (1996).
Fractionation of sugar cane bagasse with hot, compressed, liquid water.
Industrial and engineering chemistry research, 35, 2709-2715.

Allen S.G., Schulman D., Laser M., Lichwa J., Antal J.R., Spencer M.J., Lynd L.R., (2001).
A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber.
Industrial and engineering chemistry research, 40, 2934-2941.

Amouri B. et Gargouri A. (2006).
Characterization of a novel β-glucosidase from a Strachybotrys strain.
Biochemical Engineering Journal, 32, 191-197.

Amouri B. (2003).
Les cellulases de souche locale de champignon : Production, amélioration génétique et purification d'enzymes- Expression chez *E.coli* et Application d'un domaine CBD de liaison à la cellulose.
Thèse de Doctorat de l'Université de Sfax pour le Sud.

Anglès M.N., Reguant J., Martínez J.M., Farriol. X., Montané D. et Salvadó J. (1997).
Infuence of the ash fraction on the mass balance during the summative analysis of high-ash content lignocellulosics.
Bioresource Technology, 59, 185-193.

AOAC (1980).
Official methods of analysis
13 th ed. Association of official analytical chemiste. Washington DC.

Aoyama M. (1996).
Steaming treatment of bamboo grass. II. Characterization of solubilized hemicellulose and enzymatic digestibility of water-extracted residue.
Cellulose Chemistry and Technology, 30, 385-393.

Aoyama M., Seki K. et Saito N. (1995).
Solubilization of bamboo grass xylan by steaming treatment.

Holzforschung, 49, 193-196.

Ballesteros I., Oliva J.M., Negro M.J., Manzanares P. et Ballesteros M. (2002).
Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes.
Process Biochemistry, 38 (2), 187-192.

Barnet D., Excoffier G., Vignon M. (1989).
Valorisation de la biomasse lignocellulosique: autohydrolyse rapide de copeaux de bois de peuplier.
Bull. Soc. Chim. de France, 6, 836-843.

Barrier J.W., Moore M.R., Farina G.E., Broder J.D., Forsythe M.L. et Ligthsey G.R. (1985).
Experimental production of ethanol from agricultural cellulosic materials using low-temperature acid hydrolysis.
In: *Third Southern Biomass Energy Research Conference.*

Beldman G., Voragen A.G.J., Rombouts F.M. et Pilnik W. (1989).
Synergism in cellulose hydrolysis by endo-glucanases and exo-glucanases purified from *Trichderma viridae*.
Biotechnology and Bioengineering, 31, 173-178.

Benamrouche-Stitou S. (2002).
Biochimie et histologie de la dégradation enzymatique du son de blé par une endoxylanase.
Thèse de l'Université de Reims.

Biely P. (1985).
Microbial xylanolytic systems.
Trends Biotechnology, 3, 286-290.

Biely P. (1993).
Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases.
In *Hemicellulose and Hemicellulases*, M. Coughlan and G. Hazlewood, Editors, Portland Press: London, 29-51.

Biely P., Kratky Z., Vrsanska M., et Urmanicova D., (1980).
Induction and inducers of endo-1,4-béta-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus.*
European Journal of Biochemistry, 180, 323-329.

Biely P., Vrsanska M., et Kluepfel D. (1997).
Endo-béta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties.
Journal of Biotechnology , 57, 151-166.

Biermann C.J., Schultz T.P., et McGinnis G.D. (1984).
Rapid steam hydrolysis/extraction of mixed hardwoods as a biomass pretreatment.
Journal of Wood Chemistry and Technologyl, 4, 111–28.

Bjerre A.B., Olesen A.B., Fernqvist T., Plöger A. et Schmidt A.S. (1996).
Pretreatment of rice straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose.
Biotechnology and Bioengineering, 49, 568-577.

Blanch H.W. et Wilke C.R. (1983).
Sugars and chemicals from cellulose.
Rev. Chem. Eng., 1, 72-119.

Blum D.L., Li X.L., Chen H. et Ljungdahl L.G. (1999).
Characterization of an acetyl xylan esterase from the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2.
Applied and Environmental Microbiology, 65(9), 3990-3995.

Bobleter O., Vidotti R., Zemann A. et Prutsch W. (1989).
Hydrothermal Pretreatment of Bagasse and Wheat Straw.
In: *Biomass for Energy and Industry* - 5th EC Conf., G. Grassi, G. Gross ET G. dos Santos, éds., New York, Elsevier, 2, 31-37.

Bonn G., Concin R., Bobleter O. (1983).
Hydrothermolysis - a new process for the utilization of biomass.
Wood Science and Technology, 17, 195-202.

Bouchard J., Nguyen T.S., Chornet E. et Overend R.P. (1990).
Analytical Methodology for Biomass Pretreatment. Partie 1: Solid Residues.
Biomass, 23, 243-261.

Bouchard J., Nguyen T.S., Chornet E. et Overend R.P. (1991).
Analytical methodology for biomass pretreatment. Part 2: Characterization of the filtrates and cumulative product distribution as a function of treatment severity.
Bioresource Technology, 36, 121-131.

Boussarsar H., Rogé B., Mathlouthi M. (2007).
Physico-chemical Approach of the Amylolytic Action Pattern of a Thermostable Amylopullulanase Food Biophysics, 2, 100–107.

Brennan A.H., Hoagland W. et Schell D.J. (1986).
High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering-scale plug flow reactor: result of low solids testing.
Biotechnology & Bioengineering Symposium, 17, 53–70.

Brownell H. et Saddler J. (1987).
Steam pretreatment of lignocellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis.
Biotechnology and Bioengineering, 29, 228-235.

Brownell H.H. et Saddler J.N. (1984).
Steam Explosion Pretreatment for Enzymatic Hydrolysis.
Biotechnology and Bioengineering Symposium, 14, 55-68.

Brunauer S., Emmett P.H. et Teller E. (1938).
Adsorption of gases in multimolecular layers.
Journal of American Chemical society, 60, 309-319.

Buddadee B., Wirojanagud W., Watts D.J. et Pitakaso R. (2008).
The development of multiobjective optimization model for excess bagasse utilization: A case study for Thailand.
Environmental Impact Assessment Review, 28, 380-391.

Bungay H. (1992).
Product opportunities from biomass refining.
Enzyme and Microbial Technology, 14, 501-507.

Bunzel M, Ralph J, Marita JM, Hatfield RD, Steinhart H (2001).
Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre.
J. Sci. Food. Agric., 81, 653–660.

Bunzel M., Allerdings E., Sinwell V., Ralph J. et Steinhart H. (2002).
Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre.
European Food Research and Technology, 214, 482-488.

Cahela D.R., Lee Y.Y. et Chambers R.P. (1983).
Modeling of percolation process in hemicellulose hydrolysis.
Biotechnology and Bioengineering, 25, 3–17.

Capek-Ménard E., Preiss B., Bouchard J., Chornet E., Jaulin L., Overend R.P. (1987).
Enzymatic hydrolysis of a *Populus deltoids* substrate from a thermo-mechanical treatment of medium consistency slurries.
Canadian Journal of Chemical Engineering, 65, 689-692.

Carrasco F. (1989).
Fundamentos del fraccionamiento de la biomasa.
Afinidad, 46, 425-429.

Carrasco F. Chornet E., Overend R.P.et Heitz M. (1987).
Fractionnement de deux bois tropicaux (Eucalyptus et Wapa) par traitement thermomécanique en phase aqueuse. Partie II: Caractéristiques chimiques des résidus et considérations cinétiques sur la solubilisation des hémicelluloses.
Canadian Journal of Chemical Engineering, 65, 71-77.

Carrasco F. et Roy C. (1992).
Kinetic study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass.
Wood Science and Technology, 26, 189-208.

Carrasco J.E., Sáíz M.C., Navarro A., Soriano P., Sáez F. et Martínez J.M. (1994).
Effects of dilute acid and steam pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 45/46, 23-34.

Carvalheiro F., Esteves M., Parajo J.C. Pereira, H. et Gírio F. (2004).
Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain.
Bioresource Technology, 91, 93 -100.

Centre de recherché de développement et de transfert technologique en acéricuture (A.C.E.R), Extraction et Raffinage du sucre de canne, pp. 3-5, 2005, Québec, Canada.

Cheng K.K., Cai B.Y., Zhang J.A., Ling H.Z., Zhou Y.J., Ge J.P. et Xu J.M. (2008).
Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, 38, 105-109.

Chesson A. (1993).
Mechanism model of forage cell wall degradation.
In: *Forage cell wall structure and digestibility* (H. G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hafield and J. Ralph, eds), 347-376.

Chum H.L., Johnsoon D.K. et Black S. (1988).
Organosolv pre-treatment for enzymatic hydrolysis of poplars: 1. enzyme hydrolysis of cellulosic residues.
*Biotechnology and Bioeng*ineering, 31, 643–649.

Conner A.H. (1984).
Kinetic modeling of hardwood prehydrolysis. Part I: Xylan removal by water prehydrolysis.
*Wood and Fiber Sci*ence, 16, 268-277.

Converse A.O. et Grethlein H.E. (1985).
Process for hydrolysis of biomass.
US Patent 4,556,430.

Coughlan M., Tuohy M., Filho E., Puls J., Claeyssens M., Vrsanská M. et Hughes M. (1993).
Enzymological aspects of microbial hemicellulases with emphasis on fungal systems.
In: *Hemicelluloses and Hemicellulases*, M. Coughlan and G. Hazlewood, Editors., Portland Press: Cambridge, 53-84.

Chum H.L., Douglas L.J., Feinberg D.A. et Schroeder H.A. (1985).
Evaluation of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose.
Rapport technique NREL/TP-231-2183, Golden, CO, National Renewable Energy Laboratory.

Dale B.E. et Moreira M.J. (1982).
A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis.
Biotechnology and Bioengineering Symposium, 12, 31-43.

Datta R. (1981).
Energy requirements for lignocellulosic pretreatment processes.
Process Biochemistry, 16 (4), 15-19.

David C., Fornasier R., Lejong W., Vanlautem N. (1988).
Pretreatment of *Eucalyptus* wood with sodium hypochlorite and enzymatic hydrolysis by cellulases of *Trichoderma viride*.
Journal of Applied Polymer Science, 36, 29-41.

Debeire P., Priem B., Strecker G. et Vignon M. (1990).
Purification and properties of an endo-1,4-xylanase excreted by a hydrolytic thermiphilic anaerobe, Clostridium thermolacticum.
Eur. J. Biochem. 187, 573-580.

Debeire-Gosselin M., Loonis M., Samain E. et Debeire P. (1992).
Purification and properties of 22 kDa endoxylanase excreted by a new strain of *thermophilic Bacillus*.
In: *Xylan and Xylanases* (Visser J., Beldman G., Kusters-van Someren M.A. and Voragen, A.G.J., Eds). Elsevier Science Publishers, 463-466.

Dekker R.F.H. et Richards G.N. (1976).
Hemicallulases: their accurence, purification, properties and mode of action.
Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 32, 277-352.

Dekker R.F.H. et Wallis A.F.A. (1983).
Autohydrolysis-explosion as pretreatment for the enzymic saccharification of sunflower seed hulls.
Biotechnology Letters, 5, 311-316.

Dorado,G. et Pueyo, C. (1988).
L-arabinose resistance test with *Salmonella typhimurium* as a primary tool for carcinogen screening.
Cancer Research, 48, 907–912.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton K.K., Rebers P.A. et Smite (1956).
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.
Anal. Chem., 28, 350-356.

Eberhardt T.L. et Young R.A. (1996).
Characterization of conifer seed cone polysaccharides and lignin.
Holzforschung. 50, 401-407.

Ebringerová A., et Heinze, T. (2000).
Xylan and xylan derivativesbiopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedure and properties.
Macromolecular Rapid Communications, 21, 542–556.

Ebringerová A., Hromádhová Z., kacuráková, M., et Antal, M. (1994).
Quaternized xylans: Synthesis and structural characterization.
Carbohydrate Polymers, 24, 301–308.

Eklund R., Galbe M. et Zacchi, G. (1990).
Optimization of Temperature and Enzyme Concentration in the Enzymatic Saccharification of Steam Pretreated Willow.
Enzyme and Microbial Technology, 12, 225-228.

Eriksson Ö, Goring D.A.I. et Lindgren B.O. (1980).
Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood.
Wood Science Technology, 14,267-279.

Esteghlalian A., Hashimoto A.G., Fenske J.J. et Penner M.H. (1997).
Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pre-treatment of corn stover, poplar and switchhgrass.
Bioresource Technology, 59, 129–136.

Excoffier G., Toussaint B. et Vignon M.R. (1991).
Saccharification of Steam-Exploded Poplar Wood.
Biotechnology and Bioengineering, 38, 1308-1317.

Fan T.L., Gharpuray M.M. et Lee Y.H. (1987).
Cellulose hydrolysis.
Ed. Spriner-Verlag. Berlin.

Fang, J. M., Sun, R. C., Fowler, P., Tommkinson, J., et Hill, C. A. S. (1999).
Esterification of wheat straw hemicelluloses in the N,N-dimethylformamide/ lithium chloride homogeneous system.
Journal of Applied Polymer Science, 74, 2301–2311.

Farmos-Yhtymä Öy (1988).
Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivating *Candida guilliermondii*.
Int. Patent Appl. WO 88/05647.

Fengel, D. et Wegener, G. (1989).
Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions.

Berlin - New York: Walter de Gruyter.

Fontana J.D., Ramos L.P., Deschamps F.C. (1995).
Pretreated sugar cane bagasse as a model for cattle feeding.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 51/52, 105-116.

Fooks L.J., Fuller R. et Gibson G.R. (1999).
Prebiotics, probioteics and human gut microbiology.
International Dairy Journal, 9, 53-61.

Gabrielli, I., Gatenholm, P., Glasser, W. G., Jain, R. K., et Kenne, L. (2000).
Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. *Carbohydrate Polymers*, 43, 367–374.

Garrote G., Domínguez H. et Parajó J. (1999).
Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood.
Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 74, 1101-1109.

Garrote G., Domínguez H. et Parajó J. (2002).
Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production.
Journal of Food Engineering, 52, 211-218.

Garrote, G., Domínguez, H. et Parajó, J. (2001a).
Manufacture of xylose-based fermentation media from corncobs by posthydrolysis of autohydrolysis liquors.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 95, 195-207.

Gong C.S., Maun C.M. et Tsao G.T. (1981).
Direct fermentations of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous *Fungus Monilia* sp. *Biotechnology Letters*, 3, 131-144.

Gould J. M., Jasberg B. K., Dexter L. B., Hsu J. T., Lewis S. M. et Fahey G. C. (1989).
High-fiber, noncaloric flour substitute for baked foods. Properties of alkaline peroxide-treated lignocellulose.
Cereal Chemistry, 66, 201–205.

Graf E. (1992).
Antioxidant potential of ferulic acid.
Free Radic. Biol. Med., 13, 435-448.

Gibson, S. and Friedman, H. (1978).
L-arabinose-ornitine-ir- gasan medium for differentiating *Serratia* species.
Journal of Clinical Microbiology, **7,** 279–281.

Grethlein H.E. (1985).
Acid hydrolysis review.
In. *Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste*, Ferraro GL, Ferranti MP and Naveau H, eds., Elsevier, Londres, 14.

Greve L.C., Labavitch J.M. et Hungate R.E. (1984).

Alpha-L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall.
Applied and Environmental Microbiology, 47(5), 1135-1140.

Grohmann K., Torget R. et Himmel M. (1985).
Dilute acid pre-treatment of biomass at high solids concentrations.
Biotechnology and Bioengineering Symposium, 15, 59–80.

Grohmann K., Torget R. et Himmel M. (1986).
Dilute acid pre-treatment of biomass at high solids concentrations.
Biotechnology and Bioengineering Symposium, 17, 135–151.

Grous W.R., Converse A.O. et Grethlein H.E. (1985).
Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar.
Enzyme and Microbial Technology, 8, 274–280.

Guerfali M., Maalej I., Gargouri A. et Belghith H. (2008).
Catalytic properties of the immobilized Talaromyces thermophilus β-xylosidase, its use for xylose and xylooligosaccharides production.
Accepted in *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.

Hamelinck C., Hooijdonk G.V. et Faaij A.P.C. (2005).
Ethanol from lignocellulosic biomass: technico-economic performance in short-, middle-, and long term.
Biomass and Bioenergy, 28, 384-410.

Hatfield RD, Ralph J, Grabber JH (1999).
Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses.
J. Sci. Food Agric., 79, 403–407.

Hayashi T. (1989).
Xyloglucans in the primary cell wall. Plant Physiol.
Plant Mol. Biol., 40, 139-168.

He L. et Terashima N. (1991).
Formation and structure of lignin in monocotyledons. IV deposition process and structural diversity of the lignin in the cell wall of sugarcane and rice plant studied by ultraviolet microscopic spectroscopy.
Holzforschung, 45, 191-198.

Hartley R.D. et Harris P.J. (1981).
Phenolic constituents of the cell wall of dicotyledons.
Biochem. Systeme Ecol., 9, 189-203.

Heitz M., Capek-Menard E., Koeberle P.G., Gagne G., Chornet E., Overend R.P., Taylor J.D., Yu E. (1991).

Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pre-treatment conditions using the STAKE II technology.
Bioresource Technology, 35:23–32.

Hoopman, T., Birch, G., Serghat, S., Portmann, M.O. et Mathlouthi, M. (1993).
Solute-solvent interactions and the sweet taste of small carbohydrates. Part II: sweetness intensity and persistence in ethanol-water mixtures.
Food Chemistry, 46 147–153.

Hartley R.D. et Jones E.C. (1977).
Phenolic components and degradability of cell walls of grass and legume species.
Phytochemistry, 16, 1531-1534.

Heitz M., Carrasco F., Rubio M., Chauvette G., Chornet E., Jaulin L., Overend R.P. (1986).
Generalized correlations for the aqueous liquefaction of lignocellulosics.
Canadien Journal of Chemical Engineering, 64, 647-650.

Hespell R. (1998).
Extraction and characterization of hemicellulose from the corn fiber produced by cornwet milling processes.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 2615-2619.

Hollman J. et Lindhauer M. (2005).
Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran.
Carbohydrate Polymers, 59 (2), 225-230.

Holtzapple M.T. (1993a).
Cellulose.
In: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Ed. Academic Press. London. 758-767.

Holtzapple M.T. (1993b).
Hemicelluloses.
In: *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*. Ed. Academic Press. London, 2324-2334.

Holtzapple M.T., Cognate M., Shu Y. et Hendrickson, C. (1990).
Inhibition of *Trichoderma reesei* Cellulase by Sugars and Solvents.
Biotechnology and Bioengineering, 36, 275-287.

Holtzapple M.T., Jun J-H., Ashok G., Patibandla S.L. et Dale B.E. (1991).
The ammonia freeze explosion (AFEX) process: a practical lignocellulose pretreatment.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 28/29, 59–74.

Holtzapple M.T., Lundeen J.E. et Sturgis R. (1992).

Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 34/35, 5–21.

Hörmeyer H.F., Schwald W., Bonn G., Bobleter O. (1988).
Hydrothermolysis of birch wood as pretreatment for enzymatic saccharification.
Holzforschung, 42, 95-98.

Houtemen C.J. et Atalla R.H. (1995).
Cellulose-lignin interactions.
Plant Physiology, 107, 997-984.

Hrmova M., Biely P. et Vrsanska M. (1986).
Specificity of cellulase and β-xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414.
Archives of Microbiology, 144, 307-311.

Iiyama K., Lam T.B.T. et Stone B.A. (1990).
Phenolic acid bridrges between polysaccharides and lignin in wheat internodes.
Phytochemistry, 29, 733-737.

Jiménez L. et López F. (1993).
Characterization of paper sheets from agricultural residues.
Wood Science and Technology, 27, 468-474.

Jiménez L., Maestre F., Pérez I. et Ferrer J.L. (1996).
Residuos agrícolas para la fabricación de papel.
Ingeniería Química, 4, 165-171.

John M., Schmidt B., Schmidt J. (1979).
Purification and some properties of five endo-1,4-β-D-xylanases and β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*.
Can. J. Biochem, 57, 125-134.

Johnson D.G., Silva M.C., Mac Kenzie C.R., Schneider H. et Fontana J.D. (1989).
Microbial degradation of hemicellulosic materials.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 20/21, 245-258.

Johnson B.D., Moore W.E. et Zank L.C. (1961).
The spectrometric determination of lignin in small wood samples.
Tappi J., 44, 793-798.

Jollez P., Chornet E. et Overend R.P. (1994).
Steam-Aqueous Fractionation of Sugar cane Bagasse: An Optimization Study of Process Conditions at the Pilot Plant Level.
Adv. Thermoch. Biomass Conv., 2, 1659-1669.

Joseleau J.P. et Kesraoui R. (1986).
Glycosidic bonds between lignin and carbohydrates.

Holzforschung, 40, 163-168.

Kabel M., Carvalheiro F., Garrote G., Avgerinos E., Koukios E., Parajó J., Gírio F., Schols H. et Voragen A. (2002).
Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 50, 47-56.
Kaji A. (1984).
L(arabinosidases).
Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry, 42, 383-394.

Kanda T., Amano Y. et Nisizawa K. (1985).
Purification and properties of two endo-1,4-béta-xylanase from Irpex lacteus (*Polyporus tulipiferae*).
Journal of chemistry, 98, 1545-1554.

Kato A., Azuma J. et Koshijima T. (1983).
A new feruloylated trisaccharide from bagasse.
Chem. Lett., 12, 137-140.

Kato A., Azuma J. et Koshijima T. (1987).
Isolation and identification of a new ferulated tetrasaccharide from bagasse lignin-carbohydrate complex containing phenolic acid.
Agricultural Biology and Chemistry, 51, 1691-1693.

Keskar S.S., Srinivasan M.C. et Deshpande V.V. (1989).
Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. Evidence for essential tryptophan and cystein residues at the active site.
Biochemistry Journal, 261, 49-55.

Khosravi-Darani K. et Zoghi A. (2008).
Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse : Experimental design for citric acid production.
A Bioresource Technology

Kidby D.K. et Davidson D.J.A. (1973).
Convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range.
Anal Biochem. 55, 321-325.

Knappert H., Grethlein H. et Converse A. (1981).
Partial acid hydrolysis of poplar wood as a pretreatment for enzymatic hydrolysis.
Biotechnology and Bioengineering Symposium, 11, 67–77.

Kohlmann K., Westgate P.J., Weil J. et Ladisch M.R. (1993).
Biological-Based Systems for Waste Processing.
Papier SAE #932251, Society of Automotive Engineers, Inc., Warrendale, PA.

Kubikova J., Zemann A., Krkoska P., Bobleter O. (1996).

Hydrothermal pretreatment of wheat straw for the production of pulp and paper.
TAPPI Journal, 79, 63–9.

Kuznetsov B.N., Efremov A.A., Levdanskii V.A., Kutznetsova S.A., Polezhayeva N.I., Shilkina T.A. et Krotova I.V. (1996).
The use of non isobaric pre-hydrolysis for the isolation of organic compounds from wood and bark.
Bioresource Technology, 58, 181-188.

Lamblin F., Saladin G., Dehorter B., Crônier D., Grenier E., Lacroux J., Bruyant P., Laine E., Chabbert B., Monties B., Morvan C., David H. et David D. (2001).
Overexpression of heterologous sam gene in flax (Linum usitatissimum) cells, consequences on methylation of lignin precursors and pectins.
Physiologia Plantarum, 112, 223-233.

Lam T.B.T., Iiyama K. et Stone B.A. (1992).
Cinnamic acid bridges between cell wall polymers in wheat and phalaris internodes. *Phytochemistry*, 31, 1179-1183.

Lamptey J., Robinson C.W., Moo-Young M. (1985).
Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass pretreated by lowpressure steam autohydrolysis.
Biotechnology Letters, 7, 531-536.

Laser M., Schulman D. et Allen S.G. (2002).
A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol.
Bioressource Technology, 81, 33-44.

Lawther J., Sun R. et Banks W. (1995).
Extraction, fractionation and characterization of structural polysaccharides from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 667-675.

Lee Y.H. et Fan L.T. (1982).
Kinetics studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: analysis of initial rates. *Biotechnology and Bioengineering* , 24, 2383-2406.

Lee Y.Y., Lin C.M., Johnson T. et Chambers R.P. (1978).
Selective hydrolysis of hardwood hemicellulose by acids.
Biotechnology and Bioengineering Symposium, 8, 75–88.

Legin-Copinet E. (1997).
Mise en évidence et étude des propriétés d'une α-glucosidase thermostable du nouvel archaeon hyperthermophile *Thermococcus hydrothermalis* AL662 isolé d'un écosystème hydrothermal sous marin.

Thèse de l'Université de Reims Champagne- Ardenne.

Liu C.F., Sun R.C., Qin M.H., Zhang A.P., Ren J.L., Xu F., Ye J. et Wu S.B. (2007).
Chemicel modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. *Industrial Crops and Products*, 26, 212-219.

Liu C.F., Sun R.C., Qin M.H., Zhang A.P., Ren J.L., Ye J., Luo W. et Cao Z.N. (2008).
Succinoylation of sugarcane bagasse under ultrasound irradiation.
Bioresource Technology, 99, 1465-1473.

Lora J.H. et Wayman M. (1978).
Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction.
TAPPI Journal, 61, 47-50.

Mamers H. et Menz D.N.J. (1984).
Explosion Pretreatment of *Pinus radiata* Woodchips for the Production of Fermentation Substrates.
Appita, 37, 8, 644-649.

Manz U., Vanninen E. et Voirol F. (1973).
Xylitol-its properties and use as sugar substitute in foods.
Food R.A. Symp. on sugar and sugar replacement, London, October 1973.

Marchessault R.H., Malhotra S.L., Jones A.Y. et Perovic A. (1983).
The wood explosion process: characterization and uses of lignin/cellulose products.
In: *Wood and agricultural residues*. Ed. Academic Press New York, 401-413.

Martínez J., Granado J., Montané D., Salvadó J. et Farriol, X. (1995).
Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: Application to almond shells.
Bioresource Technology, 52, 59-67.

Martínez J., Reguant J., Montero M., Montané D., Salvadó J. et Farriol, X. (1997).
Hydrolytic pretreatment of softwood and almond shells. Degree of Polymerization and Enzymatic digestibility of the cellulose fraction.
Industrial and Engineering Chemistry Research, 36 (3), 688-696.

Mathlouthi M. et Rogé B. (2003).
Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders.
Food chemistry, 82 (1), 61-71.

Mc cleary B.V. et Matheson N.K. (1983).
Action patterns and substrate-binding requirements of β-D-mannanase with mannosaccharides and mannan-type polysaccharides.
Carbohydr. Res., 119, 191-219.

McMillan J.D. (1994).

Pretreating Lignocellulosics Biomass: a Review.
In: Enzymatic Conversion for Fuels Production, M.E. Himmel, J.O. Baker, and R.P. Overend, eds., ACS Symposium Series 566, chap. 15, *American Chemical Society*, 411-437.

Mejri M., Mathlouthi M. (2001).
Effect of small carbohydrates on the catalytic activity of protease and two glycohydrolases.
Carbohydrate Polymers, 45, 161-167.

Mejri M. (1998).
Contribution à l'étude de la modulation de l'activité enzymatique de quelques hydrolases par des additifs glucosidiques et des polyols.
Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.

Mejri M., Pauthe E., Larreta-Garde V., et Mathlouthi M. (1991).
Effect of polyhydroxylic additives on the catalytic activity of thermolysin.
Enzyme and Microbial Technology, 23, 392-396.

Mes-Hartree M., Dale B.E. et Craig W.K. (1988).
Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose.
Applied Microbiology and Biotechnology, 29, 462–468.

Methacanon P., Chaikumpollert O., Thavorniti P. et Suchiva K. (2003).
Hemicellulosic polymer from Vetiver grass and its physichochemical properties.
Carbohydrate Polymers, 54, 335-342.

Miceli A., Cuna D., Viggiano D. et de Leo P. (1996).
Integrated treatments of steam explosion and enzymatic hydrolysis to produce energetic and industrial products from lignocellulosic biomasses.
Agro-Food-Ind Hi Tech, 7, 25–28.

Modler, H.W., 1994.
Bifidogenic factors. Sources, metabolism and applications.
Int. Dairy J., 4, 383–407.

Mok W.S. et Antal M.J. (1992).
Uncatalysed Solvolysis of Whole Biomass Hemicellulose by Hot Compressed Liquid Water.
Industrial and Engineering Chemistry Research, 31, 4, 1157-1161.

Montané D., Farriol X., Salvadó J., Jollez P. et Chornet E. (1998a).
Fractionation of wheat straw by Steam-explosion pretreatment and alkali delignification. Cellulose pulp and byproducts from hemicellulose and lignin.
Journal of Wood Chemistry and Technology, 18 (2), 171-191.

Montané D., Salvadó J., Farriol X. et Chornet E. (1993).
The Fractionation of Sugar Almond Shells by Thermo-Aqueous-Phase Pretreatment.
Biomass and Bioenergy, 4, 6, 427-437.

Montané D., Salvadó J., Torras C. et Farriol, X. (2002).
High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production.
Biomass and Bioenergy, 22, 295-304.

Montané D., Salvadó J. et Farriol X. (1994).
Chemical analysis of partially hydrolyzed lignocellulosic biomass.
Affinidad, 51, 109-116.

Montané D., Salvadó J. et Farriol X. (1997).
Fractionation of wheat straw via steam-explosion pretreatment. Characteristics of the lignin obtained by alkali delignifcation of the steamed straw.
Holzforschung, 51, 135-141.

Morjanoff P.J. et 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.

Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch M. (2005).
Features of promising technologies for pre-treatment of lignocellulosic biomass.
Bioresource Technology, 96, 673-686.

Müller F.M. (1960).
On the relationship between properties of straw pulp and properties of straw.
Tech. Ass. Paper Pulp Ind., 43 (2), 209A-218A.

Muzzy J.D., Roberts R.S., Fieber C.A., Faass G.S., Mann T.M. (1983).
Pretreatment of hardwood by continuous steam hydrolysis.
In: *Wood and Agricultural Residues*. Academic Press. New York, 351-368.

Nabarlatz D., Ebringerová A. et Montané D. (2007).
Autohydrolysis of agriculture by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69, 20-28.

Nabarlatz D.A. (2006).
Autohydrolysis of agricultural by-product for the production of xylo-oligosaccharides.
Thèse de l'Université Rovira I Virgili.

Ninni L., Camargo M.S. et Antonio J.A. Meirelles (2000).
Water activity in Polyol systems
J. Chem. Eng. Data, 45, 654-660.

Ogier J.C., Ballerini D., Leygue J.P., Rigal L. et Pourqué J. (1999).
Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique.
Oil and Gas Science and Technology- Revue de l'IFP, 54, 67-94.

Orlando U.S., Base A.U., Nishijima W., Okada M. (2002a).
Preparation of agricultural residue anion exchangers and its nitrate maximum adsorption capacity.
Chemosphere ,48, 1041-1046.

Orlando U.S., Base A.U., Nishijima W., Okada M. (2002b).
Anew procedure to produce lignocellulosic anion exchangers from agricultural waste materials.
*Bioresource Technolo*gy, 83, 195-198.

Overend R.P. et Chornet E. (1987).
Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. A, 321, 523-536.

Panbangred W., Shinmyo A., Kinoshita S. et Okada H. (1983).
Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*.
Agric Biol Chem, 47 (5), 957-963.

Pandey, A. et Soccol, C.R., (1998).
Bioconversion of biomass: a case of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation.
Braz. Arch Biol. Technol. 41, 379–390.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R., (2000a).
Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse.
Bioresource Technology, 74, 81–87.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., (2000b).
Biotechnological potential of agro industrial residues. I: sugarcane bagasse.
Bioresource Technology, 74, 69–80.

Parajó J., Garrote, G. Cruz J. et Dominguez H. (2004).
Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials.
Trends in Food Science and Technology, 15, 115-120.

Parajó J.C., Alonso J.L., Vàzquez D. (1993).
On the behaviour of lignin and hemicelluloses during the Acetosolv processing of wood.
Bioresource Technology, 46, 233-240.

Parisi F. (1989).
Advances in lignocellulosics hydrolysis and the utilization of the hydrolysate.
Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 53-87.

Patel M.M. et Bhatt R.M. (1992).
Optimisation of the alkaline peroxide pretreatment for the delignification of wheat straw and its applications.
Journal of *Chemical Technology & Biotechnology*, 53, 253-263.

Pepper, T., et Olinger, P. M. (1988).

Xylitol in sugar-free confections.
Food Technology, 42, 98–106.

Pereira H. (1988).
Variability in the chemical composition of plantation Eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.). *Wood and Fiber Science*, 20, 82-90.

Playne M.J. (1984).
Increased digestibility of bagasse by pre-treatment with alkalis and steam explosion.
Biotechnology and Bioengineering. 26, 426-433.

Popa V. (1998).
Enzymatic hydrolysis of hemicelluloses and cellulose.
In: *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, S. Dumitriu, Editor., Marcel Dekker: Quebec. p. 969-1006.

Pou-Ilinas J., Canellas J., Driguez H., Excoffier G. et Vignon M. (1990).
Steam pretreatment of almond shells for xylose production.
Carbohydrate Research, 207, 126-130.

Pourquié J. et Vandecasteele J.P. (1993).
Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et fermentation.
In : *Biotechnologie*, 4e édition, René Scriban, coordinateur Lavoisier TEC & DOC, Paris, 677-700.

Poutanen K. (1988).
Characterization of xylanolytic enzyme for potential applications.
Technical research centre of Finlind, Publication 47. Espoo.

Poutanen K. et Puls J. (1984).
Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials.
Third Eur Cong Biotechnol Munich, 2, 217–22.

Puls J. et Schuseil J. (1993).
Chemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis.
In *Hemicellulose and Hemicellulases*, M. Coughlan and G. Hazlewood, Editors. London. 1-27.

Puls J., Gast D. et Körner H. (1985a).
Characterization of straw cellulose after steaming and organosolv pre-treatment.
In *New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates*, R.D.H.a.L. Munck, Editor., Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, Netherlands, 305-312.

Puls J., Poutanen K., Korner H.U. et Viikari L. (1985b).
Biotechnical Utilization of Wood Carbohydrates after Steaming Pretreatment.

Applied Microbiology and Biotechnology, 32, 416-423.

Ramos L.P., Breuil C., Kushner D.J. et Saddler J.N. (1992).
Steam pre-treatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus vitaminalis* wood chips.
Holzforschung, 46, 149-154.

Rasul M.G., Rudolph V. et Carsky M. (1999).
Physical properties of bagasse.
Fuel, 78, 905-910.

Ranganathan S., McDonald D.G. et Bakhshi N.N. (1985).
Kinetic studies of wheat straw hydrolysis using sulphuric acid.
Canadian Journal of Chemical Engineering, 63, 840-844.

Rémond-Zilliox C. (1996).
Etude des mécanismes de dégradation enzymatique des parois végétales. Application à l'hydrolyse de la paille de blé par une endoxylanase purifiée.
Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, France.

Reilly P.J. (1981).
Xylanase: structure and function.
In: *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals*. Plenum Press, New York, 14, 111-129.

Reshamwala S., Shawky B.T. et Dale B.E. (1995).
Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 51/52, 43–55.

Rewell R.M. et Keany F.M. (1991).
Fibreboards made from acetylated bagasse fiber.
Wood and Fiber Science, 23, 15-22.

Rijkens B.A. (1984).
Hydrolyses process for lignocellulosic materials.
CECD Workshop Cellulose Programme. Braunschweig, Germany.

Ropars M., Marchal R., Pourquié J. et Vandecastelee J.P. (1992).
Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures.
Bioresource Technology, 42, 197-204.

Rubio M., Tortosa J.F., Gómez D., Miňana A., Soler A. (1994).
El fraccionamiento de los materiales vegetales mediante procesos combinados de autohidrólisis-organosolvolisis.
Afinidad, 51, 95-102.

Saddler J.N., Ramos L.P. et Breuil, C. (1993).
Steam Pretreatment of Lignocellulosic Residues.
In *Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues,* Saddler, J.N., éd., Wallingford, R.U., 73-91.

Saha B.C. (2003).
Hemicellulose bioconversion.
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30, 279-291.

Saha S.K. et Brewer G.F. (1994).
Determination of the concentration of oligosaccharides complex type carbohydrates and glycoproteins using the phenol sulfuric acid method.
Carbohydrate Research, 254, 157-167.

Saha B.C. et Bothast R.J. (1999).
Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 76, 65–77.

Sakai T., Sakamoto T., Hallaert J. et Vandamme E.J. (1993).
Pectin, pectinases, and protopectinase: production, properties and applications.
Adv. Appl. Microbiol., 39, 213-294.

Samain E., Debeire P., Debeire-Gosselin M., Touzel J.P.
Xylanase, xylanase Bacillus and application thereof.
Brevet N° FR 90 01 191, dépôt: 1 Février 1991.

Samain E., Touzel J.P., Brodel B. et Deberire P. (1992).
Isolation of a thermophilic bacterium producing high levels of xylanase.
In: Xylans and Xylanases, J. Visser G. Beldman, M.A. Kusters-van Someren, A.G.J. Voragen (eds). Elsevier, London, New York, Tokyo, pp 467-470.

Sangnark A. et Noomhorm A. (2003).
Effect of particle sizes on functional properties of dietary fibre prepared from sugarcane bagasse.
Food Chemistry, 80, 221–229.

Sanjuan R., Anzaldo J., Vargas J., Turrado J. et Patt R. (2001).
Morphological and chemical composition of pith and fibres from Mexican sugarcane bagasse.
Holz als Roh-Werkstoff, 59, 447-450.

Sarkanen K.V. (1980).
Acid-catalyzed delignification of lignocellulosics in organic solvents.
Progress in biomass conversion, 2, 127–144.

Sasaki M., Adschiri T. et Arai K. (2003).
Fractionation of sugarcane by hydrothermal treatment.
Bioresource Technology, 86, 301-304.

Saska M. et Ozer E. (1995).
Aqueous extraction of sugarcane bagasse hemicellulose and production of xylose syrup. *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 517-523.

Scalbert A., Monties B., Lallement J.Y., Guittet E. et Rolond C. (1985).
Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw.
Phytochemistry, 24, 1359-1362.

Schaffeld G. (1994b).
Pretratamiento del material lignocelulósico.
In: *Etanol de lignocelulósicos. Tecnología; perspectivas*. Ed. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico da Universidade de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela., 35-60.

Schaffeld G., (1994a).
El material lignocelulósico.
In: *Etanol de Lignocelulósicos. Tecnología; Perspectivas*. Ed. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico da Universidade de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, 15-34.

Schell D.J., Torget R., Power A., Walter P.J., Grohmann K. et Hinmann N.D. (1991).
A technical and Economic Analysis of Acid-Catalysed Steam Explosion and Dilute Sulfuric Acid Pretreatment Using Wheat Straw or Aspen Wood Chips.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 28/29, 87-97.

Schultz T.P., Templeton M.C., Biermann C.J. et McGinnins G.D. (1984).
Steam explosion of mixed hardwoods chips, rice hulls, corn stalks and sugar cane bagasse.
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 32, 1166-1172.

Seaman J.F., Moore W.E., Mitchell R.L. et Millet M.A. (1954).
Techniques for determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography.
Tappi J. 37, 336-343.

Shah R.B., Clausen E.C. et Gaddy J.L. (1984).
Production of chemical feedstocks from biomass.
CEP Newlt., January, 76.

Shimizu K., Sudo K., Ono H. et Fujii T. (1989).
Total utilisation of wood components by steam explosion pretreatment.
In: *Wood Processing and Utilisation*. Chichester: Ellis Horwood, 407–12.

Shimizu K., Sudo K., Ono H., Ishihara M., Fujii T. et Hishiyama S. (1998).
Integrated process for total utilization of wood components by steam explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 14 (3), 195 - 203.

Shleser R. (1994).

Ethanol production in Hawaii. State of Hawaii, Energy Division, Department of Business, Economic Development and Tourism.
Honolulu HI USA,. 62pp+appendices.

Sivers M.V. et Zacchi G. (1995).
A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*, 51, 43–52.

Sun J.X., Sun X.F., Sun R.C. et Su Y.Q. (2004).
Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* (56) 195-204.

Sun X., Sun R., Lu Q., Xu F. et Lin L. (2002).
Fractional isolation and physicho-chemical characterization of hemicelluloses by a two-stage treatment from Haloxylon ammodendron and Elaeagnus angustifolia.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 6400-6407.

Sun X.F., Sun R.C. Tomkinson J., Baird M.S. (2003).
Preparation of sugarcane bagasse hemicellulosic succinates using NBS as a catalysr. Carbohydrates Polymers, 53, 483-495.

Sun Y., Cheng J. (2002).
Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.
Bioresource Technology, 83, 1–11.

Sun, R.C., Lawther J.M. et Banks W.B. (1996).
Carbohydr Polym 29 325
Tech Ass Paper Pulp Ind., 43 (2), 209A-218A.

Tengerdy R.P. et Nagy J.G. (1988).
Increasing the feed value of forestry waste by ammonia freeze explosion treatment.
Biol. Wastes, 25, 149–153.

Therdyothin, A. (1992).
Assessment of cogeneration potential of Thailand's sugar mills.
PhD Dissertation. Thailand: Asian Institute of Technology.

Thomson J.A. (1993).
Molecular biology of xylan degradation.
FEMS Microbiology Reviews, 104, 65-92.

Thring R.W., Chorent E. et Overend R. (1990).
Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperature.
Biomass, 23, 289–305.

Torget R., Himmel M. et Grohmann K. (1992).
Dilute-acid pre-treatment of two short-rotation herbaceous crops.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 34/35, 115–123.

Torget R., Tsu T.A. (1994).
Two-temperature dilute-acid prehydrolysis of hardwood xylan using a percolation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/46, 5-22.

Torget R., Walter P., Himmel M. et Grohmann K. (1991).
Dilute acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 28/29, 75–86.

Torget R., Werdene P., Himmel M. et Grohmann K. (1990).
Dilute acid pretreatment of short rotation woody and herbaceous crops.
Applied Biochemistry and Biotechnology. 24/25, 115–126.

Tortosa J.F., Rubio M., Demetrio G. (1995).
Autohidrólisis de tallo de maíz en suspensión acuosa.
Afininidad, 52, 181-188.

US DOE. Advanced bioethanol technology—website:
http://www.ott.doe.gov/biofuels/http://www.ott.doe.gov/ biofuels/. US Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Office of Transportation Technologies. Washington DC USA. 2003.

Valent B.S. et Albersheim P. (1974).
The structure of plant cellwalls. V On the binding of xyloglucan to cellulose fibers.
Plant Physiology, 54, 105-108.

Van Doorslaer E., Kesters-Hilderson et De Bruyne C.K. (1985).
Hydrolysis of béta-D-xylooligosaccharides by béta-D-xylosidase from *Bacillus pumillus*. *Carbohydrate Research*, 140, 342-346.

Van Walsum, G.P., Allen, S.G., Spencer, M.J., Laser, M.S., Antal, M.J. et Lynd, L.R. (1996).
Conversion of Lignocellulosics Pretreated with Liquid Hot Water to Ethanol.
Applied. Biochemistry and Biotechnology, 57/58, 157-170.

Vâzquez D., Lage M.A., Parajó J.C. et Vâzquez G. (1991).
Transformación de materiales lignocelulósicos: Composición, fraccionamiento y aprovechamiento.
Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 31, 143-164.

Vazquez M., Alonso JL, Dominguez H, et Parajó JC. (2001).
Production of xylose-containing fermentation media by enzymatic post-hydrolysis of oligomers produced by corn cob autohydrolysis.
World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 817-822.

Vlasenko E.Y., Ding H., Labavitch J.M. et Shoemaker S.P. (1997).
Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw.
Bioresource Technology, 59, 109–119.

Wakarchuk W.W., Campbell R.I., Sung W.L., Davoodi J. et Yaguchi M. (1994).
Mutational and crystallographic analysis of the active residues of *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Science*, 3, 467-475.

Walch E.A., Zemann A., Schinner F., Bonn G. et Bobleter O. (1992).
Enzymatic Saccharification of Hemicellulose Obtained from Hydrothermally Pretreated Sugar Cane Bagasse and Beech Bark.
Bioresource Technology, 39, 173-177.

Wallis A.F.A. et Wearne R.H. (1985).
Fractionation on the polymeric components of hardwoods by autohydrolysis-explosion-extraction.
Appita Journal, 38, 432-437.

Watanabe T., Ohnishi J., Yamasaki Y., Kaizu S. et Koshijima Y. (1989).
Binding-site analysis of the ether linkages between lignin and hemicelluloses in lignin-carbohydrate complexes by DDQ-oxydation.
Agric. Biol. Chem. 53, 2233-2252.

Weil J., Sarikaya A., Rau S.L., Goetz J., Ladisch C.M., Brewer M., Hendrickson R. et Ladisch M.R. (1997).
Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 68, 21–40.

Weil J., Sarikaya A., Rau S.L., Goetz J., Ladisch C.M., Brewer M., Hendrickson R., Ladisch M.R. (1998).
Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water.
Applied Biochemistry and Biotechnology, 76, 1–17.

Wenzl H.F.J. (1970).
The chemical technology of wood.
New York: Academic Press.

White B.A., Mackie R.I. et Doerner K.C. (1993).
Enzymatic hydrolysis of forage cell walls.
In: *Forage cell wall structure and digestibility* (H. G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hafield and J. Ralph, eds), 455-484.

Winkelhausen, E. et Kuzmanova, S. (1998).
Microbial conversion of D-xylose to xylitol.
Journal of Fermentation and Bioengineering, 86,1–14.

Wong K.K.Y., Tan L.U.I. et Saddler J.N. (1986).
Purification of a third distinct xylanase from the xylanolytic system of *Trichoderma harzianum. Canadian Journal of Microbiology*, 32, 570-574.

Wood T.M. et Bhat K.M. (1988).
Methods for measuring cellulose activities.
In *methods in enzymology* (Wood W.A., Kellogg S.T. eds) 160, 87-116.

Wood T.M. et Mc Crae S.I. (1986).
Studies of two low-molecular-weight endo-(1,4)-béta-D-xylanases constitutively synthetised by the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*.
Carbohydrate research, 148, 321-330.

Wright J.D. (1988).
Ethanol from Biomass by Enzymatic Hydrolysis.
Chemical Engineering Progress, 84, 8, 62-74.

Xu F. et Sun R.C. (2004).
Analysis and Characterization of Acetylated Sugarcane Bagasse Hemicelluloses.
International Journal of Polymer Anal. Charact., 9, 229-244.

Yang R., Xu S., Wang Z. et Yang W. (2005).
Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides.
Lebensmittel - Wissenschaft u Technologie, 38, 377-382.

Ylikahri R. (1979).
Metabolic and nutritional aspects of xylitol.
Adv. Food Res. 25, 159-80.

Yoshioka H., Chavanich S., Nilubol N., Hayashida S. (1981).
Production and characterization of a thermostable xylanase from Talromyces byssochlamydoides YH-50.
Agric. Biol. Chem., 45, 579-586.

Zheng Y.Z., Lin H.M. et Tsao G.T. (1998).
Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion.
Biotechnology Progress, 14, 890–896.

Zilliox C., et Debeire P. (1998).
Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase : Adsorption and kinetic studies.
Enzyme and Microbiol Technology, 22, 58-63.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is one of the co-products of agro-industries the most widely present on earth. Because of its composition and its availability as a renewable resource, bagasse constitutes a good candidate for valorization in view of the production of added value molecules.

A reasonable approach of bagasse valorization should be integrated to the principal activity using sugarcane, namely, sugar factory with application of the concept of biorefinery. Such an approach would consist in installing a workshop of extraction of xylose which will be fed with bagasse coming out of the crushers or diffusion of sugarcane and will give it back to the factory for traditional use in vapor and electricity generators after dewatering in presses. A small workshop can be installed for enzyme production in a solid fermentor using bagasse as a carbon source for the chosen fungi.

The sample of bagasse used in this work was supplied by CERF, a center of research on sugar cane at La Réunion. The high content of xylan (26%) particularly rich in xylose (92%) of the experimented bagasse makes it a good source of extraction of this pentose. Moreover, we have shown the validity of bagasse as a carbon source for induction of different enzyme activities by different microorganisms among which xylanase and ß-glucosidase are the most important.

To extract xylose, an optimized hydro-thermal treatment (170°C – 2h) was applied. It allowed solubilization of the hemicellulotic fraction of bagasse. This step was followed by an enzymatic treatment.

Two enzymes were used to catalyse hydrolysis of xylans in the soluble fraction. These enzymes were a purified endo-xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus* and a supernatant from *Humicola insolens* fungal broth rich in endo-xylanase. Comparison between the 2 enzymes incited us to use the non purified supernatant. Another supernatant of *Trichoderma Reesei* was used because it was rich in β-xylosidase. It allowed hydrolyzing the oligo-xylan fractions liberated by the endo-xylanase into xylose. Optimization of enzyme concentrations was achieved. Conditions for obtaining a yield of about 60% of xylose were defined.

Key words: *bagasse, hemicellulose, xylose, xylanase, β-xylosidase, hydrothermal treatment*

RESUME

La bagasse de canne à sucre est l'un des co-produits d'industries agricoles les plus générés de la planète. Elle constitue, du fait de sa composition, une source renouvelable de matière lignocellulosique pouvant être d'un grand intérêt pour la production de molécules à haute valeur ajoutée.

Une démarche valorisation de la bagasse qui ne lui ferait pas perdre sa valeur énergétique et s'intégrerait parfaitement à l'activité principale – la sucrerie – consisterait à se baser sur le concept de la bioraffinerie. On installerait alors un atelier de fabrication de xylose qui recevrait la bagasse à la sortie des moulins ou des diffusions de canne à sucre et la restituerait après passage dans des presses à la sucrerie. Un petit atelier de fermentation fongique sur milieu solide constitué de bagasse permettrait de préparer les enzymes nécessaires au traitement.

La bagasse ayant servi à ce travail provient de l'Ile de la Réunion. Elle a été fournie par le CERF (Centre d'Etude, Recherche et Formation sur la canne à sucre). Sa teneur élevée (26%) en xylane pratiquement pur (92% xylose) en fait une bonne source d'extraction de ce pentose. De plus, la bagasse de canne à sucre semble être intéressante pour une utilisation comme source de carbone pour l'induction de production d'activités enzymatiques par des microorganismes.

Pour extraire le xylose, un traitement hydrothermique optimisé (170°C – 2h) a été appliqué. Cela a permis la solubilisation de la fraction hemicellulosique de la bagasse qui a par la suite été soumise à l'hydrolyse enzymatique

Deux enzymes ont été utilisées pour catalyser le fractionnement des hémicelluloses de la bagasse : une enzyme purifiée *de Thermobacillus xylanilyticus* et un surnageant de culture *d'Humicola insolens* à activité xylanolytique prédominante. Une comparaison entre ces deux enzymes a été réalisée et a montré l'intérêt d'utiliser le surnageant de culture plutôt qu'une enzyme purifiée. Un surnageant de culture de *Trichoderma Reesei* riche en β-xylosidase a été utilisé pour poursuivre la saccharification jusqu'à obtenir du xylose. Les concentrations optimales d'enzymes et de substrat ont été déterminées. Les conditions d'obtention d'un bon rendement, de l'ordre de 60% de xylose en présence d'un taux réduit d'impuretés sont définies.

Mots clés : *bagasse, hémicellulose, xylose, xylanase, β-xylosidase, traitement hydrothermique*