

Libération de substrats fermentescibles à partir de matrices lignocellulosiques issues de l'industrie papetière

Luc Fillaudeau, Maud Babau, Xavier Cameleyre, Eric Lombard, Dominique Anne-Archard

► To cite this version:

Luc Fillaudeau, Maud Babau, Xavier Cameleyre, Eric Lombard, Dominique Anne-Archard. Libération de substrats fermentescibles à partir de matrices lignocellulosiques issues de l'industrie papetière. 13. Congrès de la Société Française du Génie des Procédés, SFGP 2011, Nov 2011, Lille, France. hal-02306117

HAL Id: hal-02306117 https://hal.science/hal-02306117

Submitted on 3 Jun2020

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.

Libération de substrats fermentescibles à partir de matrices lignocellulosiques issues de l'industrie papetière

FILLAUDEAU Luc^a*, BABAU Maud^a, CAMELEYRE Xavier^a, LOMBARD Eric^a et ANNE-ARCHARD Dominique^{b, c}

^aLaboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (Université de Toulouse ; INSA ; INRA UMR792, CNRS UMR5504) ; 135, avenue de Rangueil ; F-31 077 Toulouse, France

^bUniversité de Toulouse ; INPT, UPS ; IMFT (Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse) - Allée Camille Soula, F-31400 Toulouse, France

^cCNRS ; IMFT (Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse) - Allée Camille Soula, F-31400 Toulouse, France

Résumé

Le travail proposé se focalise sur l'étude macroscopique des phases de mise en suspension et de liquéfaction du substrat par biocatalyse. Les expérimentations sont conduites dans un bioréacteur (0,3L) couplé à un rhéomètre, pour différentes matrices (pâte chimique papetière). Dans un premier temps, la mise en suspension de la cellulose est analysée à travers l'évolution de la consommation de puissance et l'estimation de la viscosité apparente. En second lieu, la réaction de liquéfaction est suivie par analyses biochimiques (dosages des oses) et physiques en-ligne (consommation de puissance) et hors ligne (microscopie, rhéométrie, granulométrie/morphologie) sur un couple matrice modèle/pool enzymatique sélectionné. L'objectif ultime consiste à intégrer une modélisation rhéologique structurée en lien avec l'avancement de la cinétique réactionnelle.

Abstract

In order to achieve economic viability, the biorefining of lignocellulosic resources must be operated at very high feedstock dry matter content. The paper pulp product is rather appropriate for modern biorefining, because it displays low lignin content, is free of inhibitory compounds that can perturb fermentations and is devoid of microbial contaminants. Nevertheless the enzyme liquefaction and saccharification of paper-like pulps are subject to the same constraints as other pulps obtained via alternative methods such as steam explosion or dilute acid hydrolysis. Therefore, the better scientific understanding and ultimately the technical mastering of these critical biocatalytic reactions, which involve complex matrices at high solids content, is currently a major challenge that must be met in order to facilitate the intensification of biorefining operations. Our aim is to investigate dynamic of transfer phenomena and limitation of biocatalytic reactions with lignocelluloses resources under high concentration conditions. Our action focuses on the identification of rate limiting steps of the liquefactions mechanisms by physical and biochemical characterization of pre-treated lignocellulosic resources at a macroscopic scale (power consumption, rheology), microscopic scale (particle size, morphology) and molecular scale (chemical analysis). The complex relationships between fibre structure, degradation, chemical composition and rheological behaviour will be investigated.

Mots-clés : cellulose, fibres, attaque enzymatique, liquéfaction.

Key-words: cellulose, fibers, enzymatic attack, liquefaction

1. Introduction

Les ressources lignocellulosiques, disponibles en grandes quantités et peu coûteuses, constituent des ressources alternatives particulièrement intéressantes comme source de glucose pour l'obtention de molécules énergétiques ou chimiques par bioconversion [Sim *et al.*, 2008, Jary *et al.*, 2010]. L'industrie

Récents Progrès en Génie des Procédés – Numéro 101 – 2011 2-910239-75-6, Ed. SFGP, Paris, France

papetière est en capacité de produire une matrice cellulosique prétraitée présentant de nombreux avantages (aucune ou faible concentration de lignine, absence d'inhibiteur microbien) pour de nouveaux bioprocédés [Valette et Choudens, 1987, Gibbons et Hugues, 2009]. Cette matrice doit subir des traitements physico-chimiques et enzymatiques pour libérer les substrats fermentescibles en concentration compatible avec une transposition industrielle réaliste et répondant aux contraintes énergétiques et environnementales [Howard et al., 2003]. Au cours de ces traitements, la matrice solide complexe évolue d'une structure solide fibreuse dense vers des fibres dégradées plus courtes jusqu'à une solubilisation des oligomères. Notre action se focalise sur la dynamique des phénomènes de transfert et les limitations des réactions biocatalytiques. Elle porte sur l'étude macroscopique des phases de mise en suspension et de liquéfaction du substrat par biocatalyse. La dynamique de cette étape est liée à la diffusion (dans les phases solide ou liquide), à la convection et à la libération d'inhibiteur (gradient de concentration). Elle est donc fortement influencée par le comportement rhéologique du milieu [Tatsumi et Matsumoto, 2007, Negro et al., 2007]. Dans un premier temps, la mise en suspension de la cellulose est analysée à travers l'évolution de la consommation de puissance et la viscosité apparente estimée. En second lieu, la réaction de liquéfaction et son suivi par analyses biochimiques (activité enzymatique, dosages des oses) et physiques en ligne (consommation de puissance) et hors ligne (rhéométrie, granulométrie et morphologie) sont présentés pour un couple matrice modèle/pool enzymatique.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Montage et dispositif expérimental

Le dispositif expérimental mis en place se compose d'une cuve et d'un système d'agitation montés sur un viscosimètre. Les mesures de couple en ligne se font à l'aide du viscosimètre Viscotester VT 550 Haake (Thermo Fisher Scientific) travaillant à vitesse imposée. Le viscosimètre peut balayer des vitesses de rotation allant de 0,5 à 800 RPM et mesurer des couples compris entre 100 et 30000 μ N.m. La cuve en verre à fond plat (Øint: 82.2 mm, Hmax: 76 mm, soit 0.4L volume utile) est à double enveloppe. Elle est surmontée d'un couvercle en verre avec des lumières permettant soit une instrumentation, soit un prélèvement. L'agitateur utilisé est une turbine à quatre pales inclinées (type IKA A200, acier inoxydable, d: 50 mm, l: 21 mm, w: 8 mm, angle 45°) positionné à 25 mm du fond de cuve. La régulation de température et la circulation d'eau se font via un cryostat (Haake DC30). Le viscosimètre et le cryostat sont pilotés par le logiciel Haake Rheowin job Manager (Thermo Fisher Scientific).

2.2 Substrats et enzymes

La pâte à papier utilisée (FPP31) provient de l'usine Tembec de Saint-Gaudens (31). Il s'agit d'une pâte issue de bois de conifère, sa teneur en matière sèche est de 26,1% dont 75,1% de cellulose, 19,1% d'hémicellulose et 2,2% de Klason lignine et des cendres. Cette pâte à papier brute est soit séchée (50°C pendant 5 jour) puis broyée (Bosch MKM6003), soit extrudée dans une filière 7/8 mélange et 1/8 cisaillement (Prism TSE24MC, filière 400mm, Thermo Electron Corp.). Un mélange enzymatique (Accellerase 1500 Genencor, réf: 3015155108), constitué principalement d'exoglucanases, d'endoglucanases (2800 CMC U/g), d'hémicellulases et de β -glucosidases (775 pNPG U/g) a été utilisé. Leur activité enzymatique est optimale à 50°C et à pH 4,8.

2.3 Mode opératoire

La première étape de ce protocole de dégradation enzymatique consiste à mettre en suspension le substrat (45g) dans le milieu réactionnel (0.3L d'eau distillée soit 150g/L ou 39.1gMS/L, équivalent à une hauteur de liquide H~65 mm), à ajuster le pH du milieu à 4,8 (ajout d'acide orthophosphorique à 85%) et à ajouter 5 μ L d'une solution chloramphénicol (5g/L) pour éviter les contaminations microbiologiques. La température est maintenue à 40°C sous 300RPM.

Puis, une fois la suspension homogène et la température stabilisée, l'ajout des enzymes (1 mL avec 231 FPU U/mL) est effectué (instant t=0). La réaction est suivie pendant une centaine d'heures sous agitation (300RPM) avec des périodes plus fortes (300 à 600s, 500 à 650 RPM) toutes les heures pour homogénéiser. Les prélèvements (3-4mL) sont effectués toutes les 6 à 10h. Les échantillons sont agités vigoureusement dans un tube de 14 mL contenant 50μ L de potasse 10M afin d'inactiver les enzymes (pH>12) puis stockés à 4°C. Le volume total prélevé n'excède pas 15% du volume réactionnel initial.

2.4 Analyses physiques et biochimiques

• Dosage des oses par HPLC. Le dosage des sucres est effectué par chromatographie liquide hautes performances (Waters Alliance 2690, détecteur d'indice de réfraction Waters 2414 à barrette d'iode 996, 190< λ <300 nm, logiciel d'exploitation Millenium). La colonne est de type HPX-87H (Biorad Aminex) et l'élution se fait avec une solution d'acide sulfurique (0.005M) à 0.5mL/min et 50°C. Avant analyse, les échantillons sont filtrés (filtre PA, 0,45 µm). La calibration autorise la quantification des cellobiose, xylose et glucose jusqu'à 20g/L avec une LOQ de 1g/L et LOD de 0.3g/L.

• Granulométrie et morphologie. La granulométrie laser permet d'obtenir une distribution statistique de la taille des particules en suspension par méthode optique (Mastersizer 2000, Malvern Instruments). Les échantillons sont dilués entre 1 et 5/100^{ème} avant analyse. La morphologie des fibres est évaluée au moyen d'un morpho-granulomètre (Morpho G3S, Malvern Instrument) autorisant l'observation des échantillons avec un microscope optique et l'analyse d'image. Les échantillons sont analysés en voie humide entre lame et lamelle, sous un grossissement x2.5 (zone d'observation 8x8mm²) après dilution au 1/30^{ème}.

• Rhéométrie. Le comportement rhéologique est étudié avec un rhéomètre Bohlin C-VOR 200 (Malvern Instrument) et des géométries plan-plan striées (rugosités 500µm). Ceci permet de minimiser les phénomènes de glissement observés dans ce type de suspensions de fibres. La taille de l'entrefer est fixée à 1,5mm. Pour prévenir l'évaporation au cours des mesures, la surface libre des échantillons est entourée d'un film de vaseline. La mesure du comportement rhéologique est faite par oscillations à 20°C. Un balayage en contrainte à 1 Hz de 0,1 à 10 Pa est tout d'abord effectué pour identifier la zone de comportement linéaire puis on réalise un balayage en fréquence de 0,05 à 20 Hz dans le domaine linéaire.

3. Résultats et discussion

3.1 Prétraitement et mise en suspension

De nombreux paramètres (physiques, biochimiques) affectent les performances de l'attaque enzymatique de matrices complexes telles que la pâte à papier. Parmi les critères pouvant être optimisés, notre approche se focalise sur l'étude de la dynamique des mécanismes de dégradation/solubilisation, où interviennent des transferts couplés de matière, chaleur et quantité de mouvement. Nos objectifs initiaux visent donc à :

- mettre en suspension une concentration en matière sèche maximale,
- atteindre une suspension solide-liquide homogène,
- augmenter la surface spécifique des fibres pour faciliter leur dégradation.



Figure 1. Evolution de la puissance dissipée en fonction de la concentration (A) et de la viscosité apparentes (B) en fonction de la vitesse d'agitation (Pate à papier extrudée, 10<N<800RPM, 40°C).

L'impact de la concentration, des conditions d'agitation et du prétraitement mécanique sur la mise en suspension des fibres est étudié à partir des mesures de couple (Figure 1-A). La mise en suspension de la pâte à papier séchée et broyée est difficile (hétérogénéité macroscopique du mélange). A 800RPM, la concentration maximale qu'il a été possible d'atteindre est de 33,3 g/L. Sous les mêmes conditions, la pâte à papier extrudée permet une mise en suspension beaucoup plus aisée et la concentration maximale atteinte est alors de 186 g/L. Outre des concentrations maximales plus élevées, elle offre une granulométrie plus fine et donc une surface spécifique plus élevée. L'étude sera poursuivie sur la pâte à

Récents Progrès en Génie des Procédés – Numéro 101 – 2011 2-910239-75-6, Ed. SFGP, Paris, France

papier extrudée. La courbe de consommation de puissance, Np vs Re_{ag} , correspondant au système d'agitation mélange a été identifiée et peut être décrite par une corrélation semi-empirique couvrant les régimes laminaire et turbulent (Eq. 1) soit $0.1 < Re_{ag} < 30000$. Elle permet d'estimer la viscosité apparente des suspensions en fonction de la vitesse d'agitation (cisaillement moyen) et de la concentration. Cette analyse est retreinte aux limites techniques du dispositif c'est-à-dire C>70µN.m et N<500 RPM. La Figure 1-B montre, d'une part une augmentation importante de la viscosité apparente pour des concentrations supérieures à 15g/L et d'autre part le caractère non-newtonien des suspensions à travers un comportement rhéofluidifiant. Malgré l'utilisation de la courbe de consommation de puissance en régime turbulent pour les suspensions de faible concentration, la viscosité apparente estimée est cohérente, en particulier pour l'eau.

$$N_{p} = \left(\left(\frac{Kp}{Re_{ag}} \right)^{n} + \left(\alpha \cdot Re_{ag}^{\beta} \right)^{n} \right)^{n} \quad avec \ n = 2, \ Kp = 68,83 \ \alpha = 3,22 \ et \ \beta = -0,208$$
(1)

3.2 Suivi de la réaction de dégradation : consommation de puissance

La figure 2 montre l'évolution du couple normé (référence: couple nominal après mise en suspension) et des concentrations en glucose libéré en fonction du temps pour deux expériences. La mise en suspension de la pâte à papier extrudée se traduit logiquement par une augmentation importante du couple. Pour l'expérience 1, une décroissance rapide du couple est observée pour t<10h. Pour l'expérience 2, l'ajout des enzymes entraîne une première et courte phase d'augmentation (+17%) de la puissance consommée (t<0.3h), suivie par une phase de décroissance pendant environ 10h. Une dernière phase correspond à une stabilisation du couple entre 25 et 40% de sa valeur nominale, soit environ 1500 μ Nm pour les deux essais. Les remontées soudaines du couple correspondent aux phases d'agitation plus importantes destinées à maintenir l'homogénéité de la suspension ; elles se caractérisent par une courbe en dents de scie entre 1 et 10h. La variabilité des résultats peut être induite par la complexité structurelle macroscopique de la matrice et des phases de mise en suspension.

Simultanément, la concentration en glucose (Figure 2) croît ce qui correspond à un avancement du pourcentage de bioconversion mais les cinétiques sont hétérogènes. Pour l'expérience 2, la libération du glucose se fait quasi-linéairement entre 1 et 120 heures. En fin d'expérimentation, on observe dans les deux expériences la présence de fibres, traduisant des réactions enzymatiques inachevées. Il est probable que la réaction se heurte à une moindre accessibilité des fibres par les enzymes, impliquant une limitation des transferts.



Figure 2. Evolution du couple normée et des concentrations en glucose en fonction du temps (Exp. 1 et 2).

3.3 Suivi de la réaction de dégradation : évolution granulométrique et morphologique

La figure 3 présente la distribution volumique en particules en fonction du diamètre de sphère équivalente et de l'avancement de la réaction (Exp. 2). Étant donné la dispersion de taille des fibres et la présence d'un réseau fibrillaire hétérogène, et malgré toutes les précautions prises, le prélèvement d'échantillons quantitativement représentatifs demeure difficile. Les analyses morphologiques nécessitent un second échantillonnage et une dilution. Aussi, ces caractéristiques seront analysées d'un point de vu qualitatif, le biais des mesures devenant trop important pour que les données quantitatives soient significatives.

Récents Progrès en Génie des Procédés, Numéro 101 - 2011 ISSN 1775-335X - ISBN 2-910239-75-6, Ed. SFGP, Paris, France



Figure 3. Evolution de la distribution granulométrique (A) et des populations I et II (B) en fonction du temps (Exp.2)

La suspension se caractérise par une distribution bimodale: la première population est centrée sur 600 μ m et la seconde sur 100 μ m. Le chevauchement de ces distributions traduit une large dispersion et résulte du prétraitement mécanique de la pâte à papier (Fig 4-A). Initialement, la population de "fines" est majoritaire (env. 60% v/v). L'attaque enzymatique induit différentes évolutions corrélées à la fois aux mesures de puissance et à la libération des oses. Dès les premières heures (t<10h), une césure plus accentuée apparaît entre les deux populations, traduisant une rupture entre des fibres et fibrilles plus ou moins solidaires et une diminution du diamètre moyen. La première population tend à se translater vers les fines, ce qui se traduit par une diminution de la taille moyenne des fibres et une dispersion asymétrique accentuée. Cette tendance se prolonge par l'apparition d'une troisième population (t>30h), autour de 40 μ m. La seconde population se translate rapidement vers les fines (t<10h, dp~300-400 μ m) puis se maintient au cours de la bioréaction (t<25h). Enfin, elle devient progressivement majoritaire avec une dispersion accrue s'accompagnant d'un gonflement et d'une augmentation du diamètre moyen (t>30h).



-A- Ech. 1, t=0

-B- Ech. 6, t=28.4h

-*C*- *Ech.* 15, *t*=134*h*

Figure 4. Evolution morphologique des fibres en suspension (Exp. 2, dilution 1/30ème)

Ces résultats indiquent donc deux phénomènes: (i) l'activité de "découpage" des enzymes entraînant une diminution de taille de la première population, et simultanément (ii) une activité de déstructuration des fibres plus grossières correspondant à une augmentation de la taille apparente. Les hypothèses proposées sont confortées par les figures 4-A, B et C. Initialement, la présence de macro-fibres et de particules plus petites est observée et concorde avec la distribution granulométrique. La présence de fibres "débobinées" s'accentue avec l'avancement de la réaction pendant que fines s'amenuisent. La figure 4-C confirme la persistance de macro-fibres très fortement débobinées et le caractère inachevé de la réaction enzymatique.

3.4 Suivi de la réaction de dégradation : évolution du comportement rhéologique

Il n'a pas été possible de réaliser des mesures de viscosité du milieu réactionnel sous cisaillement ou contrainte imposés car les fibres s'agglomèrent extrêmement rapidement lors d'un cisaillement uniforme et le milieu devient alors très différent du milieu réactionnel. Afin que le milieu ne subisse pas de réorganisation, les caractérisations sont effectuées en oscillations (petites déformations). Les résultats obtenus à différents instants sont présentés sur les figures 5-A et B avec, respectivement, une caractérisation en fréquence et l'évolution temporelle des modules G' et G'' dans le domaine linéaire.

Le comportement est très élastique avec des modules élevés au temps t=0 (avant l'introduction des enzymes). On observe ensuite une décroissance régulière tout en conservant un caractère fortement élastique. Le comportement dynamique de ces suspensions (Fig. 5-A) évoque un comportement de type viscoplastique, ce qui est en adéquation avec les résultats d'Agoda-Tandjawa *et al.*, 2010. En outre,

Récents Progrès en Génie des Procédés – Numéro 101 – 2011 2-910239-75-6, Ed. SFGP, Paris, France

l'estimation de la valeur de seuil que l'on peut extraire des mesures dynamiques $(G'=f(\tau))$ pour la suspension initiale est d'environ 40 Pa. Les échantillons prélevés au cours du temps contiennent de moins en moins de fibres. Corrélativement, les caractérisations en oscillations deviennent plus délicates et la dispersion des mesures augmente (cf. Fig. 4-A). La figure 5-B montre que lorsque le milieu s'appauvrit en fibres, les modules visqueux et élastiques diminuent, mais l'angle de perte varie très peu au cours de la réaction. Ceci est cohérent avec l'évolution des propriétés granulométriques et morphologiques (Fig. 3).



Figure 5. Evolution temporelle du comportement dynamique des différents prélèvements et des modules élastique et visqueux (f=1Hz, Exp. 2)

4. Conclusion

Ce travail rapporte la caractérisation et l'analyse de la dégradation par réaction biocatalytique de matrices lignocellulosiques complexes. Une étude préliminaire confirme que le prétraitement mécanique de la pâte est une étape cruciale pour accroître la dissociation et la surface spécifique des fibres, réduire la granulométrie, faciliter leur mise en suspension à haute concentration en matière sèche, réduire la consommation de puissance et enfin favoriser la biocatalyse. Une seconde étape met en évidence un fort impact de l'attaque enzymatique sur la dérive des propriétés mécaniques macroscopiques, ainsi que l'existence de plusieurs phases au cours de la réaction. Il propose une interprétation des phénomènes de limitation observés dans les transferts par une corrélation entre dégradation des fibres et comportement rhéologique macroscopique en-ligne et hors-ligne. La poursuite de ce travail visera à conforter les résultats expérimentaux obtenus et à élargir notre analyse pour proposer un modèle rhéologique structuré.

Références

Agoda-Tandjawa G., S. Durand, S. Berot, C. Blassel, C. Gaillard, C. Garnier et J.-L. Doublier, 2010, Carbohydrate Polymers 80(3), 677.

Gibbons W. R. et S. R. Hughes, 2009, In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 45, 218.

Howard R.L., E. Abotsi, E. L. Jansen van Rensburg et S. Howard, 2003, African J. Biotechnol. 2(12), 602.

Jary B, P. Caseau, F de Charentenay, G. Choux, P. Fillet, M. Fribourg, M. Girard, J. Grenier, J. Lunel, A. Zagraib, Académie des technologies, 2010, Les Biocarburants, Chap 4, ISBN: 978-2-304-03052-5, 59-76.

Negro C., A. Blanco, E. Fuente, J. Tijero, 2007, Chem. Eng . Processing A, 46, 37.

Quemada D., 2006, Modélisation rhéologique structurelle. Lavoisier, Ed. Tech&Doc, ISBN: 2-7430-0920-9.

Sims R., M. Taylor, J. Saddler et W. Mabee, 2008, OECD/IEA Bioenergy.

Tatsumi D. et T. Matsumoto, 2007, J. Cent. South Univ. Technol. 14, 250.

Vallette P. et C. de Choudens, 1987, Ed. Centre Technique de l'Industrie des Papiers, Cartons et Celluloses, ISBN: 2-906579-00-9.

Remerciements:

Les auteurs remercient la fédération de recherche FERMaT (fédération INPT/UT3/CNRS/INSA Toulouse FR3089).