HAL open science

Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur des coproduits de la transformation industrielle du bois d'okoumé : vers une valorisation des hémicelluloses

Errol Mougnala Moukagni

To cite this version:

Errol Mougnala Moukagni. Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur des coproduits de la transformation industrielle du bois d'okoumé : vers une valorisation des hémicelluloses. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université de Lorraine, 2022. Français. ⟨NNT : 2022LORR0090⟩. ⟨tel-03855980⟩

HAL Id: tel-03855980

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03855980v1

Submitted on 8 Feb 2024

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.

Autorisation HAL

HAL Authorization

UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université de Lorraine

Faculté des Sciences et Technologies
École doctorale Sciences et Ingénieries des Molécules, des Produits, des Procédés et de l'Énergie
Laboratoire d'Études et de Recherche sur le Matériau Bois EA 4370 INRAE

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 12 juillet 2022 pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : *Sciences du Bois et des Fibres*

Par **Errol MOUGNALA MOUKAGNI**

Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur des coproduits de la transformation industrielle du bois d'okoumé : vers une valorisation des hémicelluloses

Composition du jury

Fatima CHARRIER - EL BOUHTOURY	Maître de conférences - HDR, Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteur
Dominique TREBOUET	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
Cécile NOUVEL	Professeur, Université de Lorraine	Présidente du jury
Morad CHADNI	Docteur - Chargé de Recherche, AgroParisTec	Examinateur
Isabelle ZIEGLER - DEVIN	Maître de conférences - HDR, Université de Lorraine	Co-directeur de thèse
Nicolas BROSSE	Professeur, Université de Lorraine	Directeur de thèse
Rodrigue SAFOU - TCHIAMA	Maître de conférences, Université des Sciences et Techniques de Masuku	Invité

Dédicace

À mes chers parents, Albertine Kanga et Marcel Moukagni.

Remerciements

En préambule de ce mémoire, je tiens, avec beaucoup d'enthousiasme et de plaisir, à remercier toutes les personnes ainsi que toutes les structures, qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail. D'abord, mes directeurs de thèse, Nicolas Brosse et Isabelle Ziegler-Devin, pour leur disponibilité, leur rigueur scientifique et leurs relectures attentives, qui m'ont permis de progresser et d'arriver au terme de cette aventure scientifique.

Ensuite, l'Agence Nationale des Bourses du Gabon (ANBG) pour le financement de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier particulièrement Rodrigue Safou-Tchiama de l'Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM), pour son apport considérable dans mon initiation à la recherche.

Un grand merci à l'équipe « Green Process for Wood » du laboratoire LERMAB pour l'accueil et l'ambiance, en particulier Laurent Chrusciel pour son aide et sa bonne humeur.

Merci également à Romain Kapel du laboratoire LRGP et à Arnaud Besserer de l'INSTIB, pour l'accueil au sein de leurs différentes structures ainsi que pour leurs conseils bien avisés.

Je remercie chaleureusement mes compagnons de route, collègues et amis, pour le soutien, la bonne humeur et les moments conviviaux, qui ont rendu ces années de thèse agréables.

Je tiens enfin à exprimer ma reconnaissance envers ma famille, pour l'amour et le soutien multiforme. En vous, j'ai trouvé la force.

La nature est éternellement jeune, belle et généreuse. Elle possède le secret du bonheur, et nul n'a su le lui ravir. (George Sand)

Table de matières

Dédicace ..... ***i***
Remerciements ..... ***iii***
Résumé ..... ***xi***
Abstract ..... ***xiii***
Liste des figures ..... ***xv***
Liste des tableaux ..... ***xix***
Liste des abréviations ..... ***xxi***
INTRODUCTION GENERALE **1**
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **5**
1 LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE **5**
2 STRUCTURE ANATOMIQUE DU BOIS **5**
2.1 STRUCTURE MACROSCOPIQUE DU BOIS 6
2.1.1 Structure microscopique du bois *7*
2.1.2 Ultrastructure du bois *9*
2.2 COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE DU BOIS 10
2.2.1 La cellulose *11*
2.2.2 Les hémicelluloses *13*
2.2.3 Les hémicelluloses des résineux *14*
2.2.3.1 Les hémicelluloses des feuillus ***16***
2.2.3.2 Autres hémicelluloses ***17***
2.2.4 La lignine *17*
2.2.5 Les extractibles *19*
2.2.6 Les cendres *20*
2.3 INTERACTIONS ENTRE LES CONSTITUANTS DE LA PAROI CELLULAIRE 20
2.3.1 Interactions hémicelluloses-cellulose *21*
2.3.2 Interaction lignine-polysaccharides *21*
3 LES TRAITEMENTS PREALABLES A L'EXTRACTION DES HEMICELLULOSES **23**
3.1 AUTOHYDROLYSE 24
3.2 TRAITEMENTS CHIMIQUES 26
3.2.1 Extraction des hémicelluloses par solutions alcalines *27*
3.2.2 Extraction des hémicelluloses par des solvant organiques *29*
3.3 EXTRACTION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES 29
3.4 EXTRUSION BI-VIS 31
3.5 EXTRACTION PAR EXPLOSION A LA VAPEUR D'EAU 32
4 FRACTIONNEMENT ET SEPARATION DES HEMICELLULOSES **35**
4.1 PRECIPITATION PAR SOLVANT 35
4.2 SEPARATION MEMBRANAIRE 36
4.2.1 Généralités sur la séparation membranaire *36*
4.2.2 Choix des membranes et effets des paramètres de filtration *40*
4.2.3 Nettoyage et régénération des membranes de filtration *46*
4.2.4 Application des procédés membranaires pour le fractionnement des hémicelluloses. *48*
5 TECHNIQUES DE CARACTERISATION DES HEMICELLULOSES **49**
5.1 COMPOSITION CHIMIQUE 49
5.1.1 Méthodes colorimétriques *49*
5.1.2 Méthodes chromatographiques *50*
5.2 ANALYSES STRUCTURALES 51
5.2.1 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) *51*
5.2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) *52*
5.2.3 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) *54*
5.2.4 Spectroscopie de masse MALDI-TOF *55*
6 VALORISATION DES HEMICELLULOSES **56**
6.1 APPLICATION EN TANT QUE BIOCARBURANTS ET MOLECULES PLATEFORME 56
6.2 APPLICATION EN TANT QU'AGENTS ACTIF ET BIOACTIF 56
6.3 APPLICATION MATERIAUX 57

7 PRESENTATION DE L'ESPECE UTILISEE DANS CETTE ETUDE : L'OKOUME (*AUCOUMEA KLAINEANA* PIERRE) 58
7.1 ÉCOSYSTEME DE L'OKOUME 59
7.2 INDUSTRIE DU BOIS D'OKOUME AU GABONAIS 59
7.3 ANALYSES ET VALORISATIONS CHIMIQUES DE L'OKOUME 60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 64
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES 75
1 MATIERE PREMIERE 75
2 DEMARCHE GLOBALE 75
3 COMPOSITION CHIMIQUE DE L'OKOUME ET DE SES HEMICELLULOSES 76
3.1 MESURE DU TAUX DE MATIERE SECHE 76
3.2 LES EXTRACTIBLES 76
3.3 LIGNINE DE KLASON 77
3.4 COMPOSITION EN MONOSACCHARIDES 77
3.5 COMPOSITION EN CELLULOSE ET HEMICELLULOSES 78
3.5.1 Obtention de l'holocellulose 79
3.5.2 Extraction alcaline des hémicelluloses 80
3.5.3 Extraction des hémicelluloses par solvant organique 80
4 EXTRACTION DES HEMICELLULOSES PAR PRETRAITEMENT PAR EXPLOSION A LA VAPEUR D'EAU 81
5 PRECIPITATION PAR SOLVANT ET PURIFICATION DES HEMICELLULOSES ISSUES DU PRETRAITEMENT PAR EXPLOSION A LA VAPEUR 83
5.1 PRECIPITATION DES HEMICELLULOSES 83
5.2 PURIFICATION DES HEMICELLULOSES PAR DIALYSE 84
5.3 LYOPHILISATION DES HEMICELLULOSES 84
6 FRACTIONNEMENT DES HEMICELLULOSES PAR PROCEDE MEMBRANAIRE 85
6.1 ULTRAFILTRATION DES HYDROLYSATS D'EXPLOSION A LA VAPEUR 86
6.2 DIAFILTRATION DES HYDROLYSATS D'EXPLOSION A LA VAPEUR 86
7 CARACTERISATION DES DIFFERENTES FRACTIONS D'HEMICELLULOSES 87
7.1 COMPOSITION DES HEMICELLULOSES EN MONOSACCHARIDES 87
7.2 DOSAGE DE LA TENEUR EN ACIDES ACETIQUE FÉRULIQUE ET COUMARIQUE DANS LES HEMICELLULOSES 87
7.3 DETERMINATION DE LA TAILLE DES HEMICELLULOSES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE (SEC) 88
7.4 SPECTROMETRIE DANS LE PROCHE INFRAROUGE (NIRS) 88
7.5 CARACTERISATION DES HEMICELLULOSES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER (FTIR) 88
7.6 CARACTERISATION DES HEMICELLULOSES PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) 89
7.7 DOSAGE DES PRODUITS DE DEGRADATION DES MONOSACCHARIDES 90
7.8 MICROSCOPIE 90
8 VALORISATION DES HÉMICELLULOSES 91
8.1 OBTENTION DE FILMS PLASTIQUES 91
8.2 ESSAI DE TRACTION 91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 92
CHAPITRE 3 : EXTRACTION OF ACETYLATED GLUCURONOXYLANS AND GLUCOMANNANS FROM OKOUME (*AUCOUMEA KLAINEANA* PIERRE) SAPWOOD AND HEARTWOOD BY STEAM EXPLOSION 93
1 INTRODUCTION 98
2 MATERIAL AND METHODS 100
2.1 RAW MATERIAL 100
2.2 CONVENTIONAL HEMICELLULOSES EXTRACTION WITH NAOH AND DMSO 100
2.3 EXTRACTION OF HEMICELLULOSES BY STEAM EXPLOSION 101
2.4 MEASUREMENT OF MONOSACCHARIDES AND URONIC ACIDS BY HPEAC-PAD 102
2.5 DETERMINATION OF ACETIC ACID BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) 103
2.6 STERIC EXCLUSION CHROMATOGRAPHY 103

2.7 Fourier transform infrared spectroscopy 103
2.8 HSQC 2D NMR and calculation of the Degree of Acetylation (DS) 103
3 RESULTS AND DISCUSSION 104
3.1 Composition 104
3.2 Hemicelluloses yields 106
3.3 Sugar compositions and molecular masses 106
3.4 FTIR characterization 111
3.5 NMR characterization and acetylation degree 111
4 CONCLUSION 114
RESULTATS COMPLEMENTAIRES 116
CONCLUSION DU CHAPITRE 3 128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 129
CHAPITRE 4 : STEAM EXPLOSION OF *AUCOUMEA KLAINEANA* PIERRE SAPWOOD : MEMBRANE SEPARATION OF ACETYLATED HEMICELLULOSES 133
1 INTRODUCTION 137
2 MATERIEL AND METHOD 140
2.1 Raw material 140
2.2 Pretreatment by steam explosion 140
2.3 Recovery of hemicelluloses: ultrafiltration and diafiltration 140
2.4.1 Determination of sugars and uronic acids and soluble lignin 141
2.4.2 Steric exclusion chromatography (SEC) 141
2.4.3 Acetyl contents 142
2.4.4 Fourier transform infrared spectroscopy 142
2.4.5 2D HSQC NMR 142
3 RESULTS AND DISCUSSION 143
3.1.1 Ultrafiltration - Diafiltration 143
3.1.2 Composition of hemicelluloses 145
4 CONCLUSION 150
RESULTATS COMPLEMENTAIRES 151
CONCLUSION DU CHAPITRE 4 156
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 157
CHAPITRE 5 : EFFECT OF COMBINED TREATMENTS FOR THE EXTRACTION OF TROPICAL HARDWOOD POLYMERIC HEMICELLULOSES 161
1 INTRODUCTION 164
2 MATERIAL AND METHODS 166
2.1 Raw material 166
2.2 Combined pre-treatments for hemicelluloses extraction 166
2.3 Measurement of monosaccharides and uronic acids using HPAEC-PAD 168
2.4 Acetic acid measurement by high performance liquid chromatography (HPLC) 168
2.5 Steric Exclusion Chromatography 168
2.6 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) 169
2.7 Near infrared spectrometry (NIRS) 169
2.8 NMR analyses 169
2.9 Microscopy 169
3 RESULTS AND DISCUSSION 170
3.1 Microscopy 170
3.2 Characterization 172
3.3 Spectroscopic characterization 174
4 CONCLUSION 179
RESULTATS COMPLEMENTAIRES 180
CONCLUSION DU CHAPITRE 5 182
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 183
CONCLUSION GENERALE 185

Résumé

La présente étude s'inscrit dans le contexte général de la valorisation des coproduits de la filière bois du bassin du Congo en général, et *d'Aucoumea klaineana* Pierre (okoumé) du Gabon en particulier. Elle s'intéresse singulièrement au développement des procédés d'extraction et à l'analyse structurale des hémicelluloses, dont la valorisation à grande échelle a souvent été freinée par l'usage de traitements agressifs lors de leur extraction. Les travaux de cette thèse se focalisent premièrement sur la récupération, par précipitation, des hémicelluloses d'aubier et du bois de cœur d'okoumé, en se basant sur le procédé d'explosion à la vapeur (SE). Ensuite, l'étude s'est orientée vers la production des hémicelluloses par filtration membranaire des hydrolysats d'explosion à la vapeur d'okoumé. Enfin, une approche, qui combine une SE avant ou après une extraction séquentielle en milieu basique et/ou blanchiment, a été utilisée pour extraire les hémicelluloses d'okoumé. Les caractérisations analytiques des hémicelluloses ont montré une sélectivité d'extraction par SE, en fonction des paramètres de traitement appliqués (biomasse, température, durée et pH). Une imprégnation en milieu basique (NaOH), suivie d'une SE et d'une précipitation à l'éthanol, a permis d'isoler des glucuronoxylanes de masses moléculaires élevées (GX, Mw = 65-100 kDa). Cependant, une imprégnation en milieu neutre suivie d'une SE et d'une précipitation à l'éthanol a favorisé une coextraction des GX et des glucomannanes (GM) fortement acétylés. Par ailleurs, le fractionnement de l'effluent aqueux de SE d'okoumé par diafiltration avec une membrane de 10 kDa a permis une séparation efficace des hémicelluloses en fonction de leurs poids moléculaires et de leurs degrés d'acétylation. Enfin, il a été montré qu'une étape de blanchiment avant le SE a augmenté l'accessibilité du substrat lignocellulosique.

Mots-clés : hémicellulose, explosion à la vapeur, diafiltration, *Aucoumea klaineana* Pierre,

Abstract

The present study is part of the general context of the valorization of the co-products of the wood sector of the Congo Basin in general, and of *Aucoumea klaineana* Pierre (Okoumé) from Gabon in particular. It is particularly interested in the development of extraction processes and the structural analysis of hemicelluloses, whose large-scale valorization has often been hindered by the use of aggressive treatments during their extraction. The work reported focuses first on the recovery, by precipitation, of hemicelluloses from sapwood and heartwood of okoumé, based on the steam explosion (SE) process. Then, the study was oriented towards the production of hemicelluloses by membrane filtration of okoumé steam explosion hydrolysates. Finally, an approach, which combines SE before or after sequential extraction in basic and/or bleaching media, was applied to extract okoumé hemicelluloses. Analytical characterizations of the hemicelluloses showed an extraction selectivity by EM, depending on the applied treatment parameters (biomass, temperature, duration and pH). Impregnation in basic medium (NaOH), followed by SE and precipitation with ethanol, produced high molecular weight glucuronoxylans (GX, Mw = 65-100 kDa). However, impregnation in neutral medium followed by SE and ethanol precipitation favored coextraction of GX and highly acetylated glucomannans (GM). Furthermore, fractionation of the aqueous okoume SE effluent by diafiltration with a 10 kDa membrane allowed efficient separation of hemicelluloses based on their molecular weights and degrees of acetylation. Finally, it was shown that a bleaching step before SE increased the accessibility of the lignocellulosic substrate.

Key words : hemicellulose, steam explosion, diafiltration, *Aucoumea klaineana* Pierre

Liste des figures

Figure 1. Structure macroscopique et microscopique du bois (Clair, 2001) 6
Figure 2. Section transversale du bois d'okoumé (Obame, 2020). 7
Figure 3. Orthotropie locale d'un tronc d'arbre (Dubois, 1997) 8
Figure 4. Vaisseaux d'okoumé observés en microscopie électronique à transmission. (a, b) : vaisseaux accolés ; (c) : Vaisseaux bouchés totalement par des thylles. (Medzegue, 2007) 9
Figure 5. Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique M : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, S3 : paroi secondaire. (Sjöström and Westermark, 1999a) 9
Figure 6. Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution d'après Moine (2005)(Moine, 2005). LM : Lamelle Moyenne ; P-I : Paroi primaire ; P-II : Paroi secondaire. 10
Figure 7. Structure chimique de la cellulose. Monomères de glucose reliés par des liaisons β - (1→4) formant un polymère linéaire de cellulose. Ceux-ci sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes formant ainsi la structure fibreuse de la cellulose (Obame, 2020) 11
Figure 8. Organisation supramoléculaire des microfibrilles (Obame, 2020). 12
Figure 9. Structure fine des fibres de cellulose montrant les cristallites (A), des zones amorphes (B), des jonctions interfibrilles (C), les clusters (D) et des espaces vides (E) (Safou-Tchiama, 2005).... 13
Figure 10. Oses simples composant les hémicelluloses (Fengel et Wegener 1989) 14
Figure 11. Hémicelluloses des résineux : (a) Arabino-4-O-methylglucuronoxylane, (b) O-Acetylgalactoglucomannan (Jeffrie, 1994) 15
Figure 12**.** Hémicelluloses de feuillus : (a) chaine de xylane avec position des principales substitutions, (b) principale structure des glucuronoxylanes (Laine, 2005). 16
Figure 13. L-Phénylalanine 17
Figure 14. Monolignols à l'origine de la lignine 18
Figure 15. structures des principales liaisons inter-unités rencontrées au sein de la lignine (Giummarella et al., 2019). 19
Figure 16. Modèle détaillé de l'association des fibrilles de cellulose, des hémicelluloses et de la lignine dans la paroi à l'état anhydre : (a) section transversale, (b): section longitudinale. (Navi and Heger, 2005). 20
Figure 17. Liaisons covalentes entre les hémicelluloses et les lignines dans la paroi végétale. D'après Barbat (2006) 22
Figure 18. Evolution de la constante diélectrique relative de l'eau avec la température (Ziegler-Devin et al., 2021). 25
Figure 19. Réactions des monosaccharides au cours de l'hydrolyse des matières lignocellulosiques (Hu et al., 2008) 26
Figure 20. Peeling reaction of glucomannan and stopping reaction of arabinoxylan (Y. Wang et al., 2015) 28
Figure 21. Extrudeuse bi-vis (d'après Clextral) 32
Figure 22. Schéma synoptique du pilote d'explosion à la vapeur situé au LERMAB 33
Figure 23. Schéma de principe de la filtration tangentielle et frontale (Membrane Filtration Process from GEA Process Engineering) 37
Figure 24. les différents modes de fonctionnement en filtration tangentielle (Steinmetz, 2020)..... 38
Figure 25. Domaine d'application des procédés de filtration membranaire en fonction de la taille des particules retenues (Steinmetz, 2020) 39
Figure 26. Illustration des mécanismes de colmatage : blocage complet (a), blocage intermédiaire (b), blocage standard (c) et gâteau de filtration (d) (Innocent et al., 2008) 44

Figure 27. Modélisation de la polarisation de concentration : sans formation de gel (a) ; avec formation de gel (b) (Aimar and Bacchin, 2010). 46
Figure 28. Réactifs les plus utilisés pour le dosage colorimétrique des hémicelluloses 49
Figure 29. Schéma représentant les corrélations $^{3}J_{H,C}$ (en rouge) carbone / proton observées à partir du proton H-1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique liaison glycosidique d'après Moine, (2005). 54
Figure 30. Principe de la technique MALDI d'après Moine, (2005) 55
Figure 31. Aire naturelle de l'okoumé tracée par le (CTFT) (1975). D'après Brunck et al., (1990). 58
Figure 32. Évolution de la production et exportation de grumes au Gabon entre 2007 et 2014. (Ministère des Eaux et Forêts du Gabon, 2016). D'après Obame, (2020). 60
Figure 33. Procédure expérimentale d'extraction chimique des hémicelluloses 79
Figure 34. Procédure expérimentale d'extraction des hémicelluloses par explosion à la vapeur 81
Figure 35. Pilote d'explosion à la vapeur (LERMAB). 1 : filtration de l'eau entrante ; 2 : générateur de vapeur ; 3 : ouverture du réacteur ; 4 : réacteur ; 5 : vanne d'ouverture pneumatique ; 6 : éclateur ; 7 : évent (évacuation de la vapeur) 83
Figure 36. Diagramme de phase de l'eau en fonction de la température et de la pression. Le point triple défini le point d'équilibre entre les trois phases 85
Figure 37. Installation du pilote de séparation membranaire 86
Figure 38. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier 89
Figure 39. Experimental procedures for hemicelluloses extraction from okoume sawdust 102
Figure 40. Polymeric hemicelluloses yields (% of dry mass of the initial wood) 106
Figure 41. FT-IR Spectra of SE-extracted hemicelluloses (H_2O - SE HW and NaOH - SE HW, S = 3.1) 111
Figure 42. 2D HSQC NMR Spectral analysis of SE extracted hemicelluloses (S=3,1). X: (1→4) β-D-Xylopyranosyl ; U: 4-O-methyl- β -D-glucuronic acid ; M: (1→4) β -D-Mannosyl; G: (1→4) β -D- Glucosyl ; Ac: acetyl. 112
Figure 43. Spectres des hémicelluloses par le DMSO et par explosion à la vapeur (S = 3,1) 119
Figure 44. Spectres 2D HSQC NMR des hémicelluloses 121
Figure 45. Spectres RMN ^{1}H des hémicelluloses (S = 3,1) 122
Figure 46. Spectres RMN ^{13}C des hémicelluloses (S =3,1) 124
Figure 47 présentant l'effet des conditions de prétraitement sur les aspects visuels des films d'hémicelluloses issus de l'explosion à la vapeur (S = 3,1) du cœur d'okoumé. a) Film d'hémicelluloses extraite par H_2O-SE. b) Film d'hémicelluloses extraite par NaOH-SE 126
Figure 48. Separation of hemicellulose 143
Figure 49. Permeate flow rate evolution during diafiltration 144
Figure 50. Mw distribution determined by SEC of Permeate, Retentate and SE effluent 145
Figure 51. FTIR spectra of Retentate and Permeate 147
Figure 52.2D HSQC NMR Spectral analysis of hemicellulose: X: (1➔4) ***β***-D-Xylopyranosyl ; U: 4-O-methyl-***α***-D-glucuronic acid ; M: (1➔4) ***β***-D-Mannosyl ; G: (1 ➔4) ***β***-D- Glucosyl ; A: α-L-Araninosyl ; Ac: acetyl; A: Cγ/Hγ in β-O-4 linkage ; A: Cβ/Hβ in *β*-O-4 linkage from guaiacyl units ; C: Cγ/Hγ in phenylcoumaran substructure ; S: C2,6/H2,6 in syringyl units ; G: C2/H2 in guaiacyl units; G': C2/H2 in oxidized guaiacyl units; G: C5/H5 in guaiacyl units ; G: C6/H6 in guaiacyl units ; p-CA2,6: C2,6/H2,6 in p-hydroxybenzoate units; 148
Figure 53. Chromatographie d'exclusion de tailles lors de l'UF 151
Figure 54. Matières sèches 152
Figure 55. Chromatographie d'exclusion de tailles de l'effluent SE et des diavolumes (DV) 153
Figure 56. Spectre RMN 2D HSQC du perméat 155

Figure 57. Process of extraction of hemicelluloses. The five different routes are shown. See text for more details. B / Alc: hemicelluloses recovered after bleaching and alkaline extraction. B / SE: hemicelluloses recovered after okoumé sapwood bleaching and steam explosion. SE - NaOH: hemicelluloses after steam explosion of alkali impregnated biomass. hemicelluloses recovered after okoumé sapwood bleaching and steam explosion. SE-H_2O : hemicelluloses after steam explosion of water impregnated biomass. SE / B: hemicelluloses after steam explosion under neutral conditions and subsequent bleaching and alkaline extraction of hemicelluloses. 167
Figure 58. Effect of the steam explosion pretreatment on wood cell wall observed by optical microscopy after dyeing 171
Figure 59. Cell morphology and cellulose/lignin distribution of raw and treated materials 172
Figure 60. Principal component analysis of NIR spectra of the different hemicelluloses and pulp fraction isolated during the process. The clusters are identified by different letters 175
Figure 61. Mean spectra of the different samples investigated. Informative bands resulting from PCA loadings analysis are indicated on spectra. See text for details 176
Figure 62. FT-IR spectra of B / SE and SE / B / Alc hemicelluloses 177
Figure 63. ^{1}H NMR spectra of B / SE hemicellulose 178
Figure 64. 2D HSQC NMR spectral analysis of B/SE hemicelluloses 179
Figure 65. SEM des fractions d'hémicelluloses B / SE et SE / B 180
Figure 66. Procédé global de valorisation des coproduits d'okoumé 187

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition relative des différents constituants chimiques des feuillus et résineux, exprimée en pourcentage de la matière sèche initiale (Condassamy, 2015). 10
Tableau 2. Récapitulatif de quelques études sur l'extraction assistée par micro-ondes des hémicelluloses issus de la biomasse lignocellulosique. Adapté de Chadni et al., (2019) 30
Tableau 3. Principaux paramètres de fonctionnement de la filtration membranaire (Steinmetz, 2020) 40
Tableau 4. Matériaux membranaires (Adapté de Remigy and Desclaux, (2007). 42
Tableau 5. Modèles de colmatage à pression constante (Rohmdane, 2006) 45
Tableau 6. Quelques classes de produits entrant dans la composition des détergents pour le nettoyage des membranes et leurs modes d'action (Zaouk, 2018) 47
Tableau 7. Longueurs d'ondes des principales bandes du spectre IR du bois (Esteves et al., 2013) 52
Tableau 8. Teneur des principaux constituants chimiques de l'okoumé. D'après Obame, (2020) ... 62
Tableau 9. Liste des produits purs utilisés pour l'étalonnage en HPAE-PAD 78
Tableau 10. Conditions du prétraitement d'explosion à la vapeur 81
Table 11. Chemical composition (% of dry wood) of raw wood 105
Table 12. Composition of sugars, acetic acid (% of dry mass of hemicelluloses molar mass of hemicelluloses) and average (Mw in kDa) of hemicelluloses 108
Table 13. Chemical shifts (ppm) of ^{1}H NMR spectra (S=3.1) 110
Table 14. Acetylation degree of hemicelluloses 114
Tableau 15. Poids moléculaire (Mw), masse molaire en nombre (Mn) et polydispersité (IP) des hémicelluloses 116
Tableau 16. Déplacements chimiques (ppm) des spectres RMN ^{13}C des hémicelluloses d'okoumé (S=3,1) 125
Table 17. Sugar composition of okoumé sapwood, SE effluent, Retentate and Permeate 146
Table 18. Acetylation degree 149
Tableau 19. Valeurs des poids moléculaires (Mw) et des indices de polydispersité (Mw / Mn) 154
Table 20. Molecular weight distribution of recovered hemicelluloses 172
Table 21. Composition of sugars and acetic acid (% of dry mass of hemicelluloses molar mass of hemicelluloses) of hemicelluloses 173
Tableau 22. Tableau des bandes les plus contributives après l'analyse des charges de l'ACP 181

Liste des abréviations

DMSO : Diméthylsulfoxide

HPAEC-PAD : High Performance Anion Exchange Chromatography coupled with a Pulsed Amperometric Detector

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Correlation

HW : Heartwood

IRTF : Infrarouge à Transformée de Fourier

LCC : Complexes de lignine et d'hydrates de carbone ou « Lignin Carbohydrate Complexe »

NREL-LAP : National Renewable Energy Laboratory-Laboratory Analytical Procedure

RMN ^{13}C : Résonance Magnétique Nucléaire du Carbonne

RMN ^{1}H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton

SEC : Steric Exclusion Chromatography

SW : Sapwood

TAPPI : Technical Association of the Pulp and Paper Industry

Introduction générale

Introduction générale

La forêt gabonaise fait partie des forêts du bassin du Congo qui constituent le deuxième plus grand massif forestier tropical, après celui de l'Amazonie. Elle couvre environ 22 millions d'hectares, soit près de 80 % du territoire national, et abrite un écosystème forestier très riche en diverses espèces, avec près de 400 essences de bois.

À l'instar des autres pays du bassin du Congo, le Gabon a entrepris depuis 2001, une profonde mutation des activités industrielles de sa filière forêt-bois, en adoptant un nouveau code forestier qui vise un développement durable de la filière. Pour atteindre cet objectif, le Gabon a décidé en 2010 d'interdire l'exportation des grumes. Ce choix s'est traduit par le développement des segments de première, de deuxième et de troisième transformation du bois, qui générèrent une quantité mal estimée de déchets. Selon Nze Nguema, environ $1{,}5 \times 10^6$ m^3 de bois transformé sont produits au Gabon chaque année (placages, contreplaqués, et tranchées) produisant environ 750 000 m^3 de déchets par an. Ces rebuts sont dominés par *Aucoumea klaineana* Pierre (okoumé) qui produirait environ 25 milles tonnes de déchets composés de copeaux de sciage, de plaquettes, de dosses d'aubier et de cœur de déroulage. En effet, sur 400×10^6 m^3 de volume potentiel exploitable pour les arbres sur pied, l'okoume représente 130×10^6 m^3, soit 31 % de la réserve totale de bois de la forêt gabonaise (Yoan et al., 2018).

À l'exception de la production artisanale séculaire de charbons de bois à partir des déchets d'okoumé, les initiatives de valorisation locale des dosses pour la fabrication des palettes, ou celle consistant en la réalisation des piliers de cabarets, ou de cases secondaires à partir des rondins de déroulage d'okoumé, constituent les voies de valorisations courantes des déchets de cette essence phare de l'industrie du bois au Gabon. Les seuils de rentabilité significatifs mis en évidence par une étude portant sur la valorisation des rebus d'okoumé (Rodrigue, 2017) ouvrent des perspectives intéressantes à la création de segments de valorisation des fourches et des coursons de cette ressource ligneuse souvent abandonnée au cours de l'exploitation forestière.

Par ailleurs, le défi de substituer des produits pétroliers et leur application dans l'énergie et d'autres produits dérivés, par des bioproduits et des énergies renouvelables a ouvert la voie à la production de biocarburants, de biomatériaux et de produits chimiques à partir de la biomasse d'origine végétale. Cette approche a permis, par exemple, à un pays tel que le Brésil de se positionner

en leader mondial sur le marché des biocarburants de première génération dominé par l'éthanol issu de la canne à sucre.

Toutefois, la production de biocarburants, de biomatériaux et de produits chimiques à partir des ressources agroalimentaires s'avère concurrentielle des terres agricoles, ce qui constitue une limite sérieuse de l'exportation de cette technologie dans les pays en voie de développement tels que ceux du bassin du Congo au sein desquels l'autosuffisance alimentaire qui nécessite d'importantes surfaces arables constitue l'un des objectifs prioritaires de ces nations. Par conséquent, il apparait que la mise en œuvre des techniques de production des biomatériaux des biocarburants dits de deuxième génération, et des produits chimiques à partir des déchets de la biomasse végétale marque un tournant dans les stratégies de valorisation des rebuts issus des industries de transformation du bois dans le bassin du Congo.

La production des substituts aux produits pétroliers à partir de la biomasse est à l'origine du concept de bioraffinerie. D'après l'Agence internationale de l'Énergie (International Energy Agence – IEA) une bioraffinerie est une installation qui permet de valoriser la biomasse par la production de matériaux, de produits chimiques, de carburants ou d'énergie. Il se trouve cependant que l'ensemble des constituants de la biomasse n'y est pas toujours valorisé de façon optimale, c'est le cas notamment des hémicelluloses, qui sont le plus souvent brûlées pour produire de l'énergie. Or, ces hémicelluloses présentent un pouvoir calorifique relativement faible, ce qui ne les rend pas efficace pour la production d'énergie par combustion. Une solution serait alors d'orienter la valorisation de ces hémicelluloses vers d'autres utilisations plus rentables ; ceci implique alors une bonne connaissance du matériau dont elles sont issues, une maîtrise des procédés permettant leur extraction et une meilleure connaissance de leurs composition et structure.

Dans le cas du bois, les hémicelluloses sont étroitement liées à la lignine et à la cellulose, ce qui complique leur extraction sans les dégrader. Du fait de leurs faibles poids moléculaires, les hémicelluloses sont particulièrement sensibles à l'hydrolyse. De plus, l'hétérogénéité et la grande variété des hémicelluloses entravent leur utilisation sous leur forme native.

Sur le plan analytique, la complexité intrinsèque des hémicelluloses ainsi que leurs interactions, covalentes ou non, avec les autres polymères du bois rendent leur caractérisation particulièrement difficile. De ce fait, le bois doit être soumis à des prétraitements adaptés à une extraction des hémicelluloses *in situ*. Ces prétraitements doivent être choisis de manière à préserver

les propriétés physico-chimiques des hémicelluloses extraites (poids moléculaire, degré d'acétylation, …).

L'objectif de ce travail est de valoriser les produits connexes de la transformation industrielle du bois d'okoumé dans une approche de bioraffinerie. Cette étude se concentre particulièrement sur l'extraction et l'analyse physico-chimique des hémicelluloses extraites par le prétraitement par explosion à la vapeur d'eau. La caractérisation des hémicelluloses extraite fournira des orientations théoriques pour le développement ultérieur de procédés de bioraffineries. Pour y parvenir, l'étude a été subdivisée en 5 chapitres :

Le premier chapitre est dédié à une étude bibliographique qui présente l'anatomie et la composition chimique du bois. Cette partie décrit aussi quelques procédés de prétraitement de la biomasse lignocellulosique pour l'extraction des hémicelluloses. Par la suite, les méthodes de purification des hémicelluloses sont exposées. Quelques techniques de caractérisation des hémicelluloses sont également décrites. Cette partie s'achève par la présentation de la filière forêt-bois du Gabon, et de l'intérêt d'avoir choisi l'okoumé comme matière première dans cette étude.

Le deuxième chapitre est consacré à la description globale du protocole expérimental utilisé dans cette étude. Ce chapitre présente d'abord la matière première étudiée, en suite les différentes méthodes d'extraction d'hémicelluloses utilisées, et enfin les différentes analyses physico-chimiques ayant servi pour l'analyse des hémicelluloses extraites.

Les troisième, quatrième et cinquième chapitres présentent et discutent des résultats obtenus tout au long de cette étude. Ces chapitres évaluent le mode d'isolement des hémicelluloses, l'impact des conditions opératoires et le potentiel des hémicelluloses extraites.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1 La biomasse lignocellulosique

La biomasse est généralement définie comme la « masse totale de l'ensemble des êtres vivants occupant, à un moment donné, un biotope bien défini (Dictionnaire Larousse). Parmi les typologies qui la caractérisent, on distingue la biomasse végétale, divisée en 3 catégories : la biomasse à glucides (comme les céréales, la betterave sucrière et la canne à sucre), la biomasse oléagineuse (comme le palmier et le tournesol) et la biomasse lignocellulosique (comme l'okoumé). La biomasse lignocellulosique est la biomasse végétale la plus abondante sur terre ; elle regroupe les bois de feuillus (angiospermes) et de résineux (gymnosperme) ainsi que les plantes annuelles. Le bois est un matériau biodégradable composé de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ses propriétés sont assujetties non seulement à son anatomie, mais aussi aux multiples interactions chimiques qui y sont identifiées. Afin de valoriser la biomasse lignocellulosique, il est nécessaire de connaître au préalable sa structure morphologique et sa composition chimique.

2 Structure anatomique du bois

Les études sur le matériau bois nécessitent une localisation des différents niveaux de description, en fonction du type de valorisation envisagé. Ainsi dans la matrice bois, on différentie les échelles macroscopique, microscopique et moléculaire. Ces différents niveaux d'observation du bois sont illustrés dans la Figure 1.

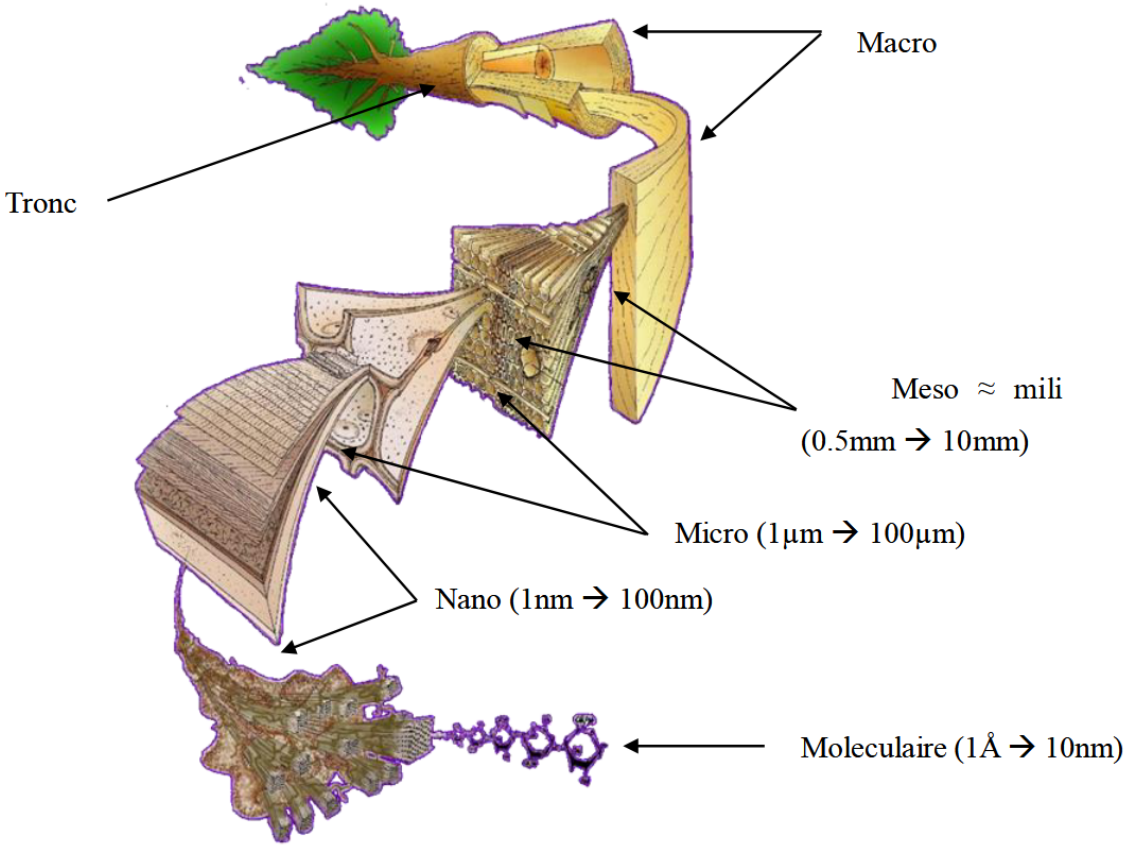


Figure 1. Structure macroscopique et microscopique du bois (Clair, 2001)

2.1 Structure macroscopique du bois

Qu'il s'agisse des gymnospermes ou des angiospermes, l'arbre est principalement divisé en trois grandes parties : les racines, le tronc et le houppier. Suivant le plan transversal, le tronc d'arbre est constitué de deux zones distinctes : l'écorce et le bois, séparés par une couche mince appelée cambium. Le cambium est la partie la plus importante de l'arbre. Par division cellulaire le cambium produit l'écorce vers l'extérieur et le bois vers l'intérieur. L'écorce est constituée d'une partie externe appelée suber (composé de cellules inertes) qui sert de barrière de protection, et d'une partie interne appelée liber (formé de cellules vivantes) responsable de la conduction de la sève élaborée, qui est la sève descendante riche en métabolites organiques. Le bois est constitué généralement de l'aubier, du duramen et de la moelle (Figure 2). L'aubier est la partie physiologiquement fonctionnelle du bois. Au fils du temps, les cellules vivantes (vaisseaux ou trachéides) cessent d'alimenter l'arbre, se bouchent et s'imprègnent de différentes substances comme les tanins, les résines, transformant l'aubier en bois parfait par le processus de duramenisation (Bergström, 2000). Chez certaines essences, l'aubier est plus clair que le duramen, c'est le cas par exemple de l'okoumé, le chêne, le châtaignier et le mélèze. Parfois, le bois parfait ne se duraminise pas et il ressemble à un prolongement

de l'aubier, comme par exemple chez le doussier et le sapin (Dirol and Diglise, 2000). Contrairement à l'aubier, le duramen possède selon les essences une durabilité naturelle et résiste aux champignons lignivores, ainsi qu'aux larves xylophages. Il est peu ou non imprégnable.

Figure 2. Section transversale du bois d'okoumé (Obame, 2020).

2.1.1 Structure microscopique du bois

L'analyse du bois à l'échelle de quelques dizaines de micromètres permet une description plus fine, et donne une connaissance bien meilleure de sa structure et de la fonction de chaque élément qui le constitue. Le plan ligneux est formé de trois coupes réalisées dans trois plans perpendiculaires : le plan transversal perpendiculaire à l'axe de la tige, sur lequel sont observés les cernes annuels ; le plan radial passant au centre de la tige et le plan tangentiel qui est excentré, parallèle à l'axe de la tige et tangent aux cernes annuels. Les trois directions axiale (L), radiale (R) et tangentielle (T) sont les directions d'anisotropie du bois (Figure 3).

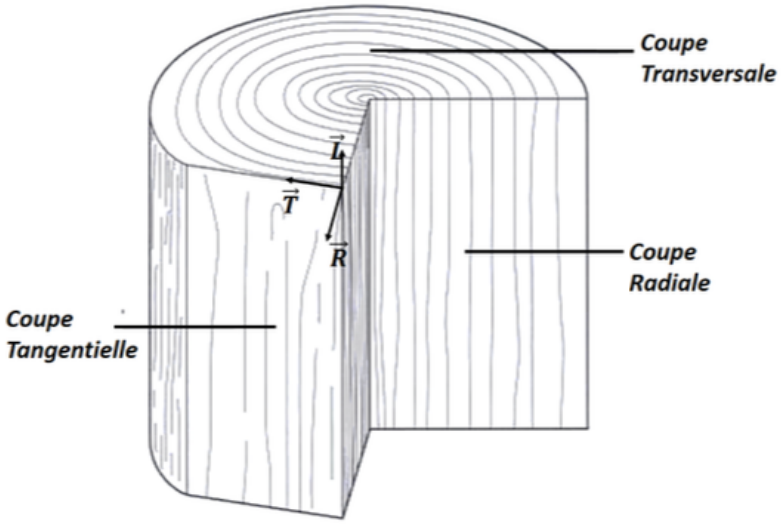


Figure 3. Orthotropie locale d'un tronc d'arbre (Dubois, 1997)

L'examen du plan ligneux permet de définir l'organisation des cellules du bois, et ainsi d'apprécier les relations entre l'anatomie et les caractéristiques de ce matériau. Chez les résineux, la structure anatomique est simple et composée principalement de cellules longitudinales, les trachéides qui assurent l'échange des différentes substances (trachéides du bois de printemps), et le soutien mécanique (trachéides du bois d'été). L'anatomie des résineux présente également des cellules de parenchyme en orientation axiale et radiale qui jouent le rôle de stockage de substances nutritives. Chez certains résineux, on note la présence des canaux résinifères.

Les feuillus présentent un plan ligneux plus différencié. On y trouve les fibres libriformes et les fibres trachéides orientées dans le sens axial, qui remplissent la fonction de soutien mécanique. Les parenchymes en orientation axiale et radiale permettent le stockage des substances nutritives. Les vaisseaux quant à eux assurent la fonction de conduction de la sève. Chez certains feuillus telles que *Bursera gummifera* (burseracée), *Shorea hopeifolia*, *Parshorea smythiesii*, on note la présence des canaux sécréteurs ; par contre chez l'okoumé l'absence des canaux sécréteurs a été signalée (Minkué., 2000). En outre, les formes cellulaires et l'organisation des tissus d'une espèce varient selon l'origine biologique, et de l'adaptation en réponse aux besoins et aux conditions environnementales de l'arbre (Figure 4).

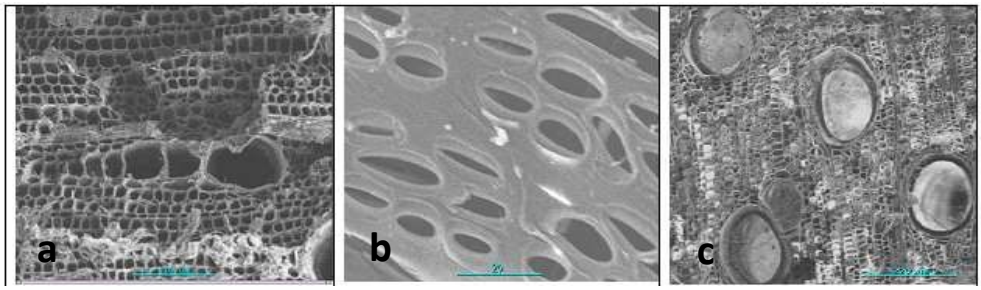


Figure 4. Vaisseaux d'okoumé observés en microscopie électronique à transmission. (a, b) : vaisseaux accolés ; (c) : Vaisseaux bouchés totalement par des thylles. (Medzegue, 2007)

2.1.2 Ultrastructure du bois

Après différenciation, la cellule du bois est multicouche. Elle est essentiellement constituée de l'extérieur vers l'intérieur par une couche intercellulaire, une paroi primaire et une paroi secondaire (Figure 5).

- La couche intercellulaire, ou lamelle moyenne (M), permet la cohésion cellulaire. Dépourvue de cellulose, elle renferme de la lignine et des pectines. Son une épaisseur varie de 0,5 à 1,5 µm.
- La paroi primaire (P) est composée de microfibrilles de cellulose enchevêtrées, de lignine et d'hémicelluloses. Son épaisseur est très fine mesurant entre 0,1 et 0,2 µm.
- La paroi secondaire est une couche d'épaisseur relativement dense. Elle est plus rigide que la paroi primaire et ne permet plus la croissance de la cellule. Elle renferme une grande proportion de cellulose dont les microfibrilles sont disposées en hélices et organisées en trois sous-couches : S1 (0,1-0,3 µm), S2 (1-5 µm) et S3 (0,1 µm) (Timell, 1967a).

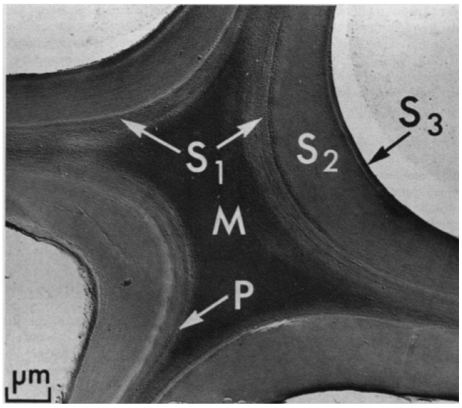


Figure 5. Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique M : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, S3 : paroi secondaire. (Sjöström and Westermark, 1999a).

2.2 Composition chimique de la paroi cellulaire du bois

Le bois est principalement constitué des substances de masses moléculaires élevées telles que la cellulose, les hémicelluloses, et la lignine. On y trouve aussi des composés de faibles masses moléculaires comme les substances extractibles de nature organique et minérale (cendres). La proportion relative de ces constituants varie selon les essences et la localisation dans la paroi cellulaire. Dans le cas du bois, d'une manière générale, l'ordre de prépondérance des trois grandes catégories de molécules (cellulose, hémicelluloses et lignine) dépend de la localisation dans la paroi cellulaire végétale (Figure 6 et Tableau 1).

Tableau 1. Composition relative des différents constituants chimiques des feuillus et résineux, exprimée en pourcentage de la matière sèche initiale (Condassamy, 2015).

	Cellulose	**Hémicelluloses**	**Lignine**	**Extractibles**
Résineux	38 - 52	16 - 27	26 - 36	2 -3
Feuillus	37 - 57	20 - 37	17 - 30	3 - 5

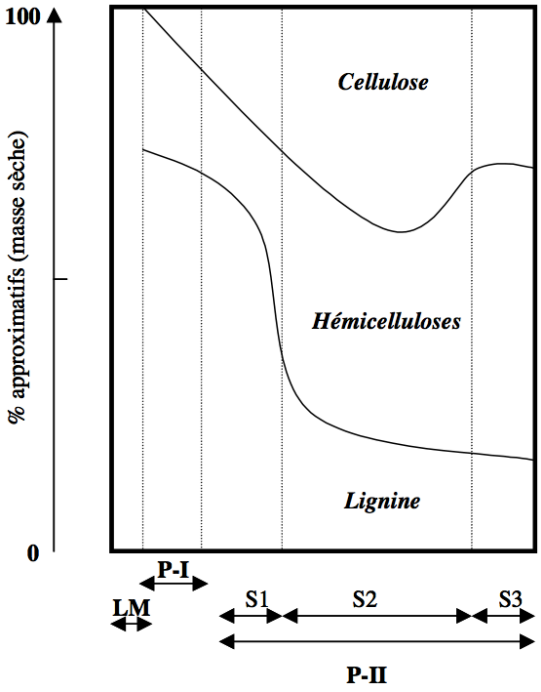


Figure 6. Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution d'après Moine (2005)(Moine, 2005). LM : Lamelle Moyenne ; P-I : Paroi primaire ; P-II : Paroi secondaire.

2.2.1 La cellulose

La cellulose est un polymère organique directement issu de la photosynthèse. Il est synthétisé par des complexes dynamiques qui se déplacent à l'intérieur de la membrane plasmique tout en déposant la cellulose directement dans la paroi. En effet, les unités de β-D-glucanes constitutives de la cellulose sont raccordées par la cellulose synthase qui se présente sous forme de « complexes enzymatiques transmembranaires » ayant la forme des rosettes hexagonales. Ces rosettes contiennent des sous-unités catalytiques qui synthétisent les chaines de β-D-glucanes en utilisant de l'UDP-glucose (uridine- diphosphoglucose). Les chaînes de de β-D-glucanes vont ensuite s'organiser en microfibrilles (Lerouxel et al., 2006).

La cellulose est le composé organique le plus abondant de la paroi végétale. C'est un homopolymère linéaire dont l'unité répétitive est un dimère de cellobiose formé d'unités de β-D-glucopyranose liées entre elles par des liaisons covalentes hémiacétaliques entre la fonction hydroxyle (OH) du carbone C4 en position équatoriale d'une molécule de glucose et le carbone C1 de l'autre molécule de glucose (Figure 7).

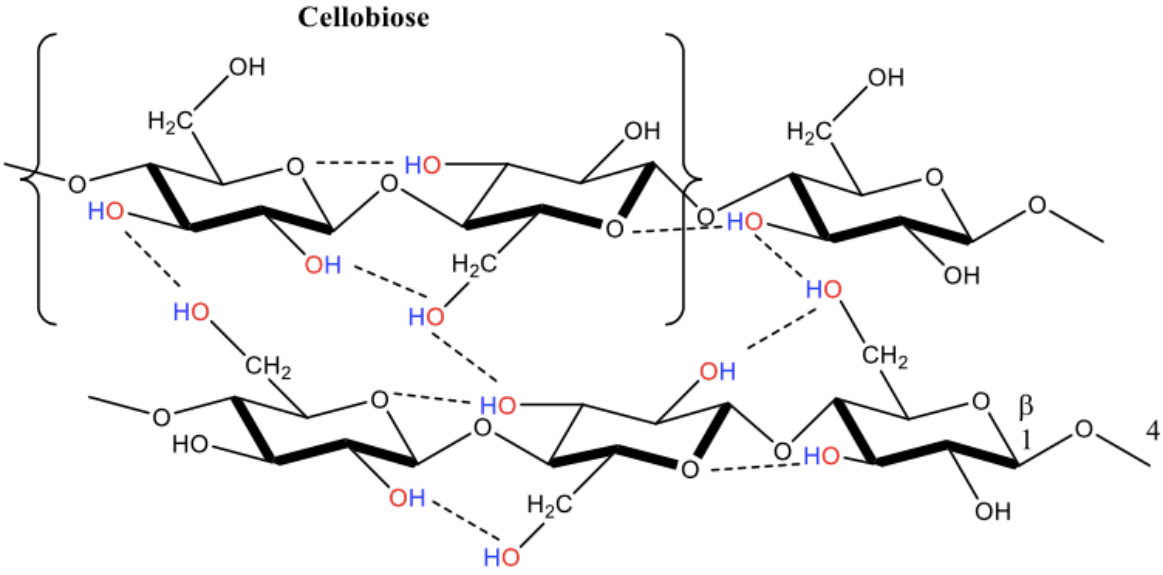


Figure 7. Structure chimique de la cellulose. Monomères de glucose reliés par des liaisons β - (1→4) formant un polymère linéaire de cellulose. Ceux-ci sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes formant ainsi la structure fibreuse de la cellulose (Obame, 2020)

La cellulose du bois possède une extrémité réductrice composée d'une fonction hémiacétale et une extrémité non réductrice constituée d'un groupement alcool. Elle est caractérisée par un degré de polymérisation moyen compris entre 700 et 1500. Les chaînes de celluloses s'associent les unes

aux autres par les liaisons hydrogènes inter et intramoléculaires entre les groupes hydroxyles présents sur les carbones C2, C3 et C6 formant ainsi un faisceau de microfibrilles (Figure 8). Ces microfibrilles présentent des zones ordonnées dites cristallines et des zones moins ordonnées dites amorphes. Le degré de cristallinité de la cellulose est de l'ordre de 60 à 70 % (Fengel et Wegener 1984 ; D. Klemm et al., 1998).

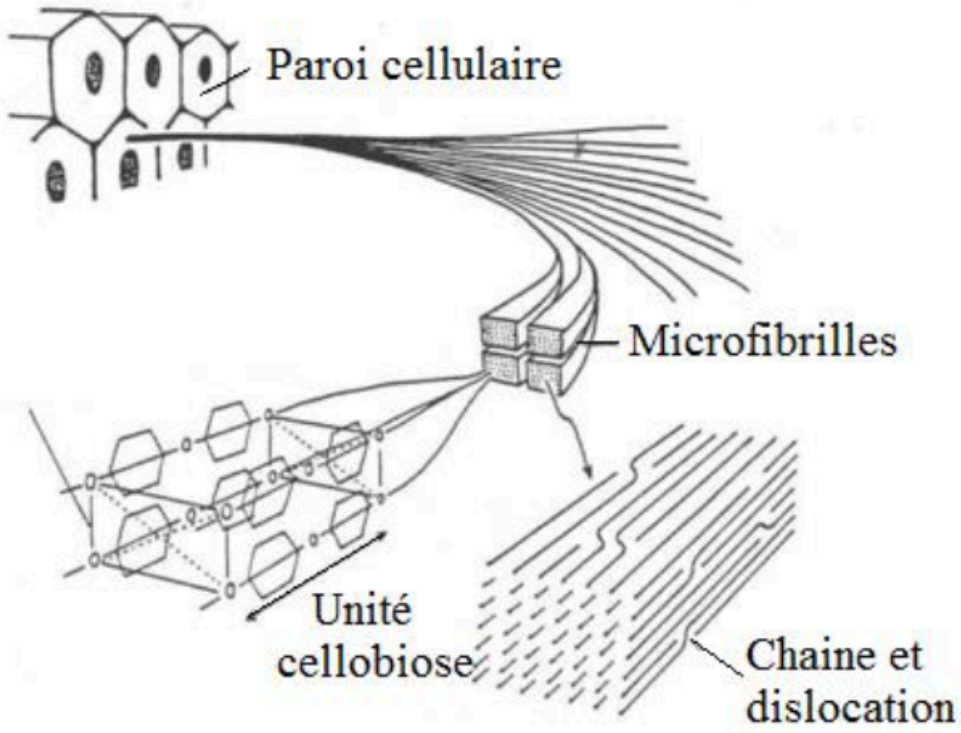


Figure 8. Organisation supramoléculaire des microfibrilles (Obame, 2020).

Les techniques d'analyse structurale de diffraction des rayons-X (DRX), de résonnance magnétique nucléaire (RMN), de microscopie électronique (ME) ont montré que la cellulose cristalline possède plusieurs formes cristallographiques dont les deux principales sont la cellulose I et la celluloses II (Figure 9). Selon Kolpak et Blackwell (1976) (Kolpak and Blackwell, 1976), la cellulose I est la structure cristalline de la cellulose native. Elle est constituée d'une hélice formée de deux chaînes de cellulose parallèles à son axe. Elle se décline sous deux organisations : la cellulose I_α et la cellulose I_β. La cellulose I_α présente une maille triclinique à une chaîne. La cellulose I_β quant à elle répond à forme cristalline monoclinique à deux chaînes (Pérez and Mazeau, 2004). S'agissant de la cellulose II, elle est obtenue par dissolution puis régénération de cellulose I ou par mercerisation. Elle est formée de chaînes antiparallèles favorisant une stabilité plus élevée que celle de la cellulose I. la maille correspondante est de type monoclinique à deux chaînes. Les principales liaisons

hydrogènes intramoléculaires mises en évidence pour la cellulose I et la cellulose II sont O3-H-O5 et O2-H-O6.

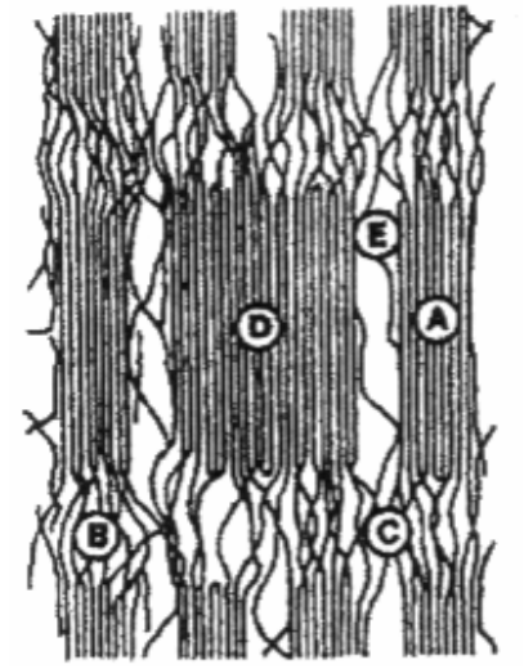


Figure 9. Structure fine des fibres de cellulose montrant les cristallites (A), des zones amorphes (B), des jonctions interfibrilles (C), les clusters (D) et des espaces vides (E) (Safou-Tchiama, 2005).

La cellulose est très peu soluble dans l'eau et les solvants organiques usuels du fait des zones cristallines qu'elle renferme, et de la solidité des arrangements des chaînes causée par les liaisons hydrogènes. Cependant, elle peut être solubilisée dans divers milieux tels que les complexes métal/amine (solutions d'hydroxyde de cuprammonium ou cupriéthylènediamine, les oxydes d'amines tertiaires cycliques (N-méthylmorpholine-N-oxyde ou MMNO) (Johnson, 1969), et le système chlorure de lithium /N,N-diméthylacétamide (McCormick et al., 1985)).

2.2.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses sont biosynthétisées dans l'appareil de Golgie, puis déposées dans la paroi cellulaire par exocytose. Suite à la grande diversité des hémicelluloses, un panel d'enzymes est nécessaire pour leur biosynthèse : des glycosyltransférases, des hydrolases, des lyases et des estérases (Brett and Waldron, 2005).

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères représentant le second groupe de polysaccharides de la paroi végétale. Contrairement à la cellulose, ces macromolécules révèlent une

grande diversité de structure selon le tissu ou le type cellulaire, l'âge de la cellule et leur localisation au sein de la paroi végétale. Aussi, les hémicelluloses diffèrent de la cellulose par leur hétérogénéité en monosaccharides (hexoses et pentoses), en acides uroniques, en désoxyoses et par leur faible degré de polymérisation souvent inférieur à 200. La structure des différentes unités osidiques présentes dans les hémicelluloses est rapportée sur Figure 10. Comme la cellulose, les hémicelluloses possèdent une extrémité non-réductrice et une extrémité réductrice (Fengel and Wegener, 2003)

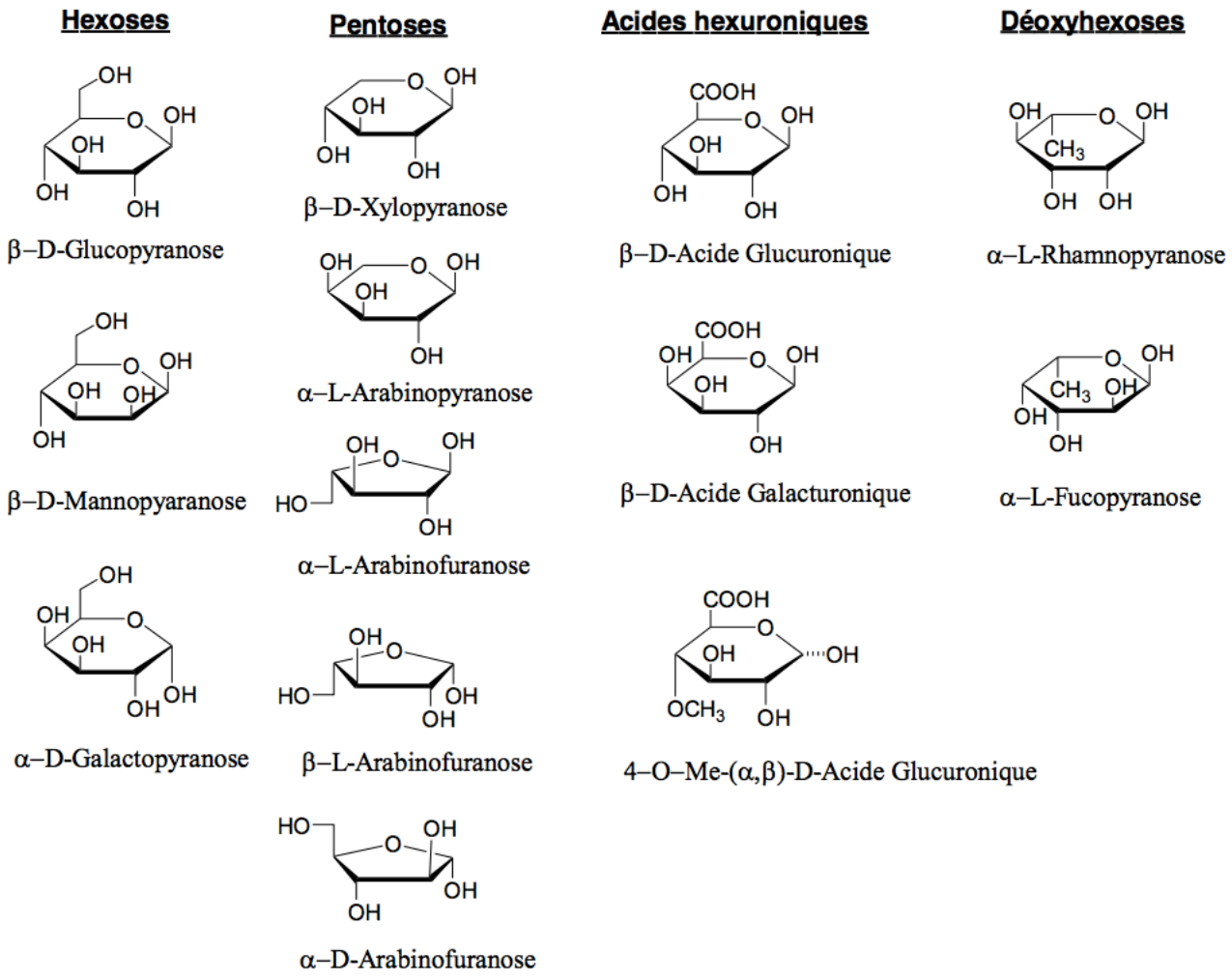


Figure 10. Oses simples composant les hémicelluloses (Fengel et Wegener 1989)

2.2.3 Les hémicelluloses des résineux

Les hémicelluloses du bois des résineux sont principalement des *O*-acétyl-galactoglucomannanes qui représente 10 à 25% de la masse du bois. Ils se composent d'un squelette formé d'unités alternées de β-D(1→ 4)-glucopyranosyle (Glc*p*) et β-D(1→4)-mannopyranosyle (Man*p*), avec des unités α-D(1→6)-galactopyranosyle (Gal*p*) liées aux unités de l'épine dorsale de

Man*p*. Les unités Man*p* sont acétylées en C-2 et/ou C-3 avec environ un groupe pour 3 à 4 hexoses. Les galactoglucomannanes peuvent être divisés en deux fractions ayant des teneurs différentes en galactose. Dans la fraction à faible teneur en galactose, le rapport galactose : glucose:mannose est d'environs 0,1 :1 :4, alors que dans la fraction riche en galactose, le rapport correspondant est d'environ 1 :1 :3. La fraction de faible teneur en galactose est souvent appelée glucommanne. La différence vient aussi de la non acétylation des glucomanannes et du faible ratio du mannose:glucose qui chute aux environs de 2.

Les résineux contiennent aussi des arabino-4-*O*-methylglucuronoxylanes, qui sont des chaines de β-D-xylopyranosyl (Xyl*p*), liées par des liaisons (1→4) ramifiées par des 4-*O*-methylglucuronique à travers les liaisons β-D(1→2), et les unités β-L(1→3) arabinofuranosyles. Les arabinoglucurunoxylanes des résineux peuvent être moins acétylés. Ils peuvent également contenir de faibles quantités d'acide galacturonique et de rhamnose (Fengel and Wegener, 2003; Gírio et al., 2010; Sjöström, 1993a). Les structures des principales familles des hémicelluloses des bois des résineux sont présentées à la Figure 11.

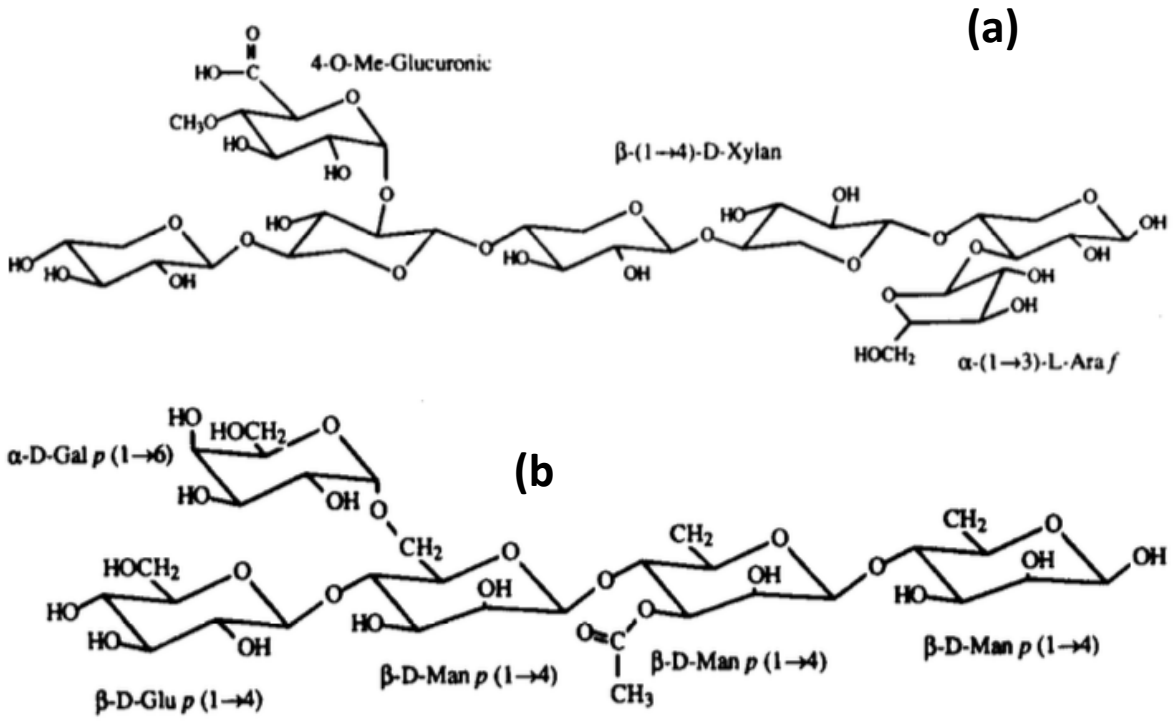


Figure 11. Hémicelluloses des résineux : (a) Arabino-4-O-methylglucuronoxylane, (b) O-Acetylgalactoglucomannan (Jeffrie, 1994)

2.2.3.1 *Les hémicelluloses des feuillus*

Les feuillus sont constitués majoritairement d'hémicelluloses de type *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylanes (Figure 12) représentant 10 à 35 % de la masse du bois. Ces hémicelluloses consistent en un squelette linéaire d'unités β-D-xylopyranosyles (xyl*p*) liées par des liaisons glycosidiques β-(1→4). Certaines unités xylose sont acétylées en C2 et / ou C3 et une molécule sur dix possède un groupe acide uronique (acide 4-*O*-méthylglucuronique) lié par des liaisons β-(1,2) (Teleman et al., 2000). Plusieurs auteurs ont mis en évidence la présence des chaînes latérales constituées d'une molécule de xylose interne non substitué, et d'une unité terminale non réductrice sur certaines structures (Johansson and Samuelson, 1977; Teleman et al., 2000, 2003a). L'extrémité réductrice est identique à celles des xylanes des résineux. Les xylanes des feuillus peuvent aussi contenir du rhamnose et de l'acide galacturonique pouvant faire partie intégrante de la structure, ou être la conséquence d'une contamination par des pectines ou des galactanes (Johansson and Samuelson, 1977).

Le bois feuillu contient aussi des hémicelluloses de type O-acétylglucomannes (Figure 12) avec un ratio de deux unités de mannose pour une unité de glucose formant des liaisons β-(1→4). Les glucomannanes sont acétylés sur les carbones C2 et/ou C3 des mannoses à hauteur d'un groupe toutes les trois unités (Teleman et al., 2003). Ils représentent 3 à 5 % de la masse du bois.

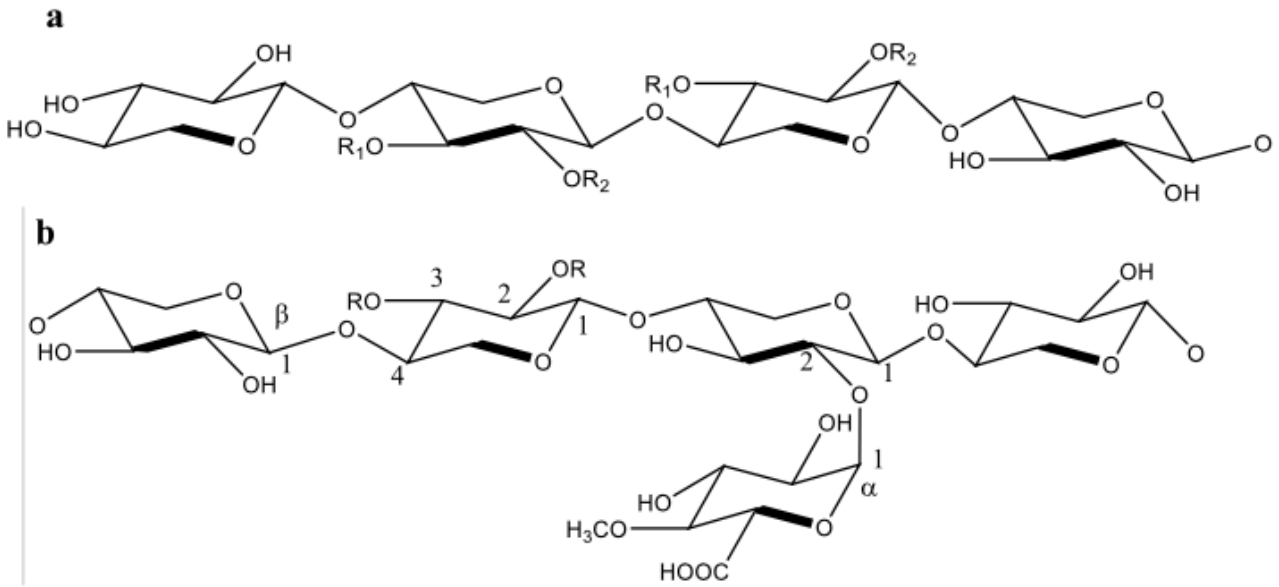


Figure 12. Hémicelluloses de feuillus : (a) chaine de xylane avec position des principales substitutions, (b) principale structure des glucuronoxylanes (Laine, 2005).

2.2.3.2 *Autres hémicelluloses*

D'autres types d'hémicelluloses sont rencontrés, mais en faible teneur, composant moins de 5% de la masse du bois. Les xyloglucanes participent à la constitution des bois de feuillus. Leur principale chaîne est composée de xylose et de glucose ramifié à 75% par des arabinoses, des galactoses et des xyloses.

Les arabinoxylanes de composition similaire à celle des *O*-acétyl-4-*O*-méthylglucuronoxylanes, avec cependant une grande teneur en arabinoses constituent les hémicelluloses des feuillus. Ils existent en grande quantité chez le mélèze et les plantes annuelles.

2.2.4 La lignine

Les unités constitutives de la lignine ne diffèrent que par les substitutions sur leur cycle aromatique. Ils dérivent tous d'un seul acide aminé qui est la phénylalanine (Figure 13).

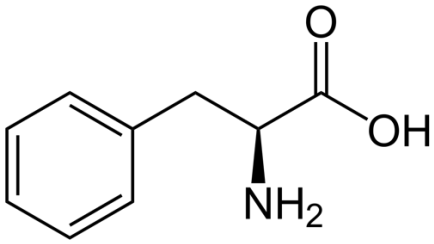


Figure 13. L-Phénylalanine

La lignine peut être décrite comme une macromolécule dont l'une des fonctions est d'ordre structurel. Elle confère de la rigidité aux fibres de bois et aux plantes annuelles et agit comme matrice pour la cellulose. Grace à ses propriétés antibiotiques, la lignine protège les fibres contre les intrusions microbiennes. Elle réduit aussi la perméabilité des fibres lors du transport des matières nutritives et des métabolites (Zemek et al., 1979). La lignine occupe des proportions importantes dans toutes les plantes vasculaires. Elle oscille entre 15 et 35% de la masse des matériaux lignocellulosiques. Il s'agit d'un polymère phénolique tridimensionnel amorphe et irrégulier ayant un degré de polymérisation inférieur à 100 unités. Son squelette résulte de la copolymérisation oxydative de trois molécules aromatiques de type phénylpropène : l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, que l'on désigne sous le terme de monolignols **(**Figure 14**)**.

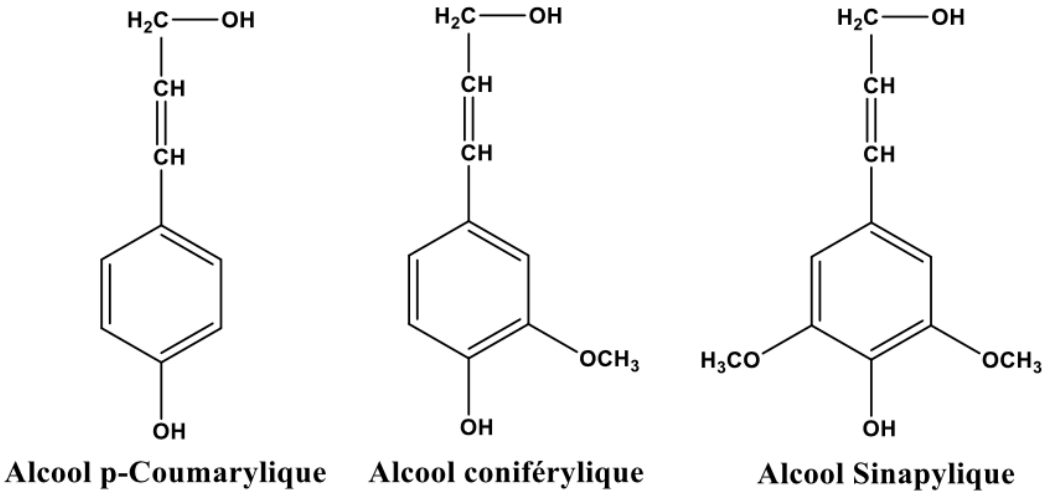


Figure 14. Monolignols à l'origine de la lignine

La structure de la lignine reste complexe à définir, elle varie selon le matériau lignocellulosique étudié. Cette différence de constitution peut se traduire par la variabilité des trois monolignols de base. Ainsi, la lignine des bois résineux est majoritairement constituée des unités guaiacylpropane, tandis que la lignine des bois feuillus est mélange des unités syringylpropane (unités S) en majorité et guaiacylpropane (unités G). Quant aux unités p-hydroxyphénylpropane (unités H), elles présentent des teneurs plus élevées chez les bois résineux que chez les bois durs (Lapierre et al., 1989; Manders, 1986).

Au sein de la lignine, les unités sont liées entre elles par les liaisons carbone-carbone telles que les liaisons β-5, β-1, 5-5', β-β, α-β et par des liaisons alkyles aryles éthers type α-O-4 et β-O-4 (Figure 15). La liaison β-O-4, de type (C-OC) est qualifiée de labile à cause de polarisation générée par l'atome de l'oxygène qui favorise la rupture de cette liaison. Les autres liaisons de type (C-C), dites condensées parce qu'elles sont beaucoup plus stables et résistante (Adler, 1977; Giummarella et al., 2019).

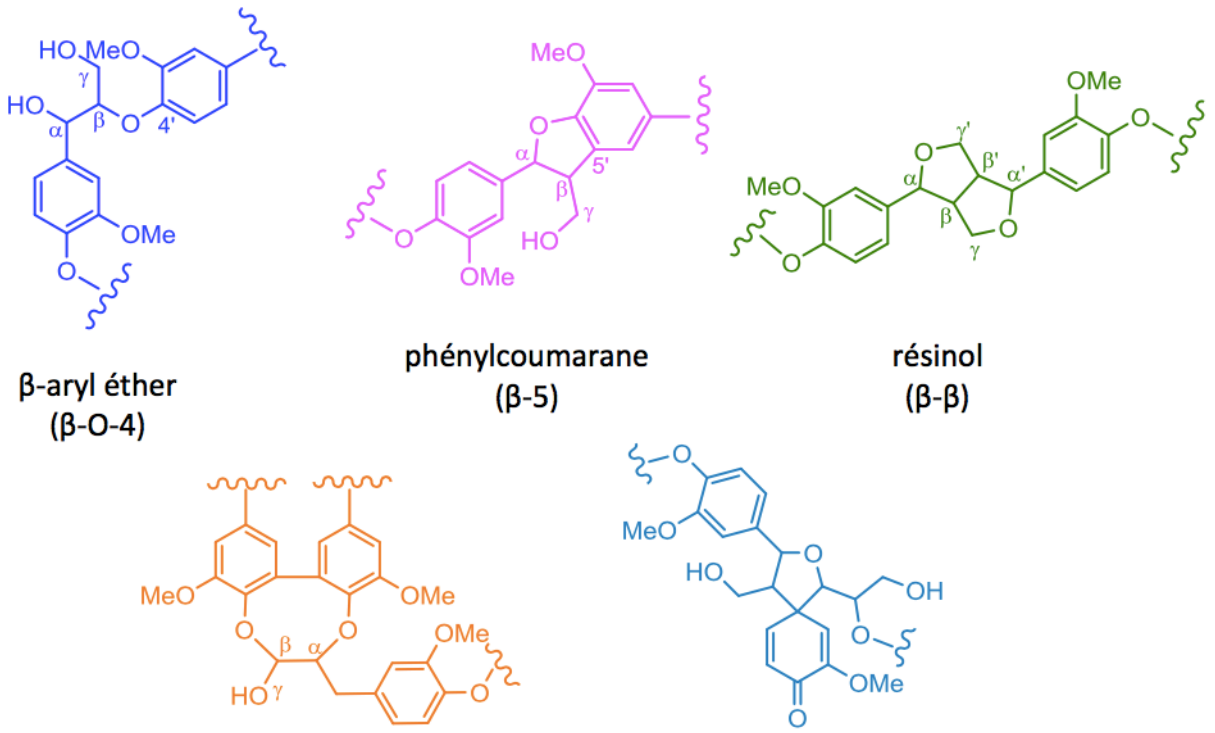


Figure 15. structures des principales liaisons inter-unités rencontrées au sein de la lignine (Giummarella et al., 2019).

2.2.5 Les extractibles

Les extractibles sont des composés de faible masse moléculaire pouvant être extraits du bois par des solvants polaires (eau, acétone, éthanol) ou apolaire (toluène, cyclohexane, dichlorométhane). Bien qu'ils ne représentent qu'un faible pourcentage du bois, l'odeur, la couleur et la résistance aux agents de dégradation biologique dépendent en grande partie de ces extraits. La teneur et la composition de ces extractibles varient fortement en fonction de la nature du bois, de la localisation dans l'arbre et de la partie échantillonnée. Les bois feuillus des zones tempérées contiennent souvent une teneur en extractibles plus élevée que celle des résineux. Les bois tropicaux quant à eux, présentent une quantité d'extractibles qui peut être beaucoup plus grande (Bhat et al., 2005; Thulasidas and Bhat, 2007). Certains extractibles sont lipophiles, alors que d'autres sont hydrophiles. Suivant leur nature chimique, les extractibles peuvent êtres repartis en trois groupes occupant certains sites morphologiques dans le bois (Sjöström, 1993a).

- Les graisses et cires : Ils se trouvent dans les cellules du parenchyme des rayons.
- Les substances phénoliques constituées des phénols simples, les flavonoïdes, des stilbènes, les lignanes et les tannins, présents principalement dans l'écorce et dans le bois de cœur.
- Les acides résiniques, localisés dans les canaux résinifères.

Certaines distinctions peuvent être relevées entre les extractibles des feuillus et ceux des résineux, notamment la présence des tanins et une plus faible teneur en terpènes chez les feuillus.

2.2.6 Les cendres

Les cendres sont les résidus inorganiques qui subsistent après combustion complète de la biomasse à haute température (Calcium, Potassium, Sodium, Magnésium, Fer...). Ils ne participent pas dans la structuration du bois. Cependant, ils constituent moins de 1 % des bois tempérés, et peuvent atteindre les 5 % dans certains bois tropicaux. La variabilité des cendres dépend du sol et de l'environnement dans lequel a grandi l'arbre.

2.3 Interactions entre les constituants de la paroi cellulaire

Comme décrit précédemment, la paroi cellulaire végétale, est un matériau composite. Ainsi, les différents composants de la paroi cellulaire sont étroitement connectés et interagissent fortement entre eux, par le biais des liaisons covalentes, ioniques ou hydrogènes (Figure 16). Ces liaisons jouent un rôle crucial dans la structure et les propriétés de la paroi, et conditionnent la qualité de l'extraction des polymères constitutifs.

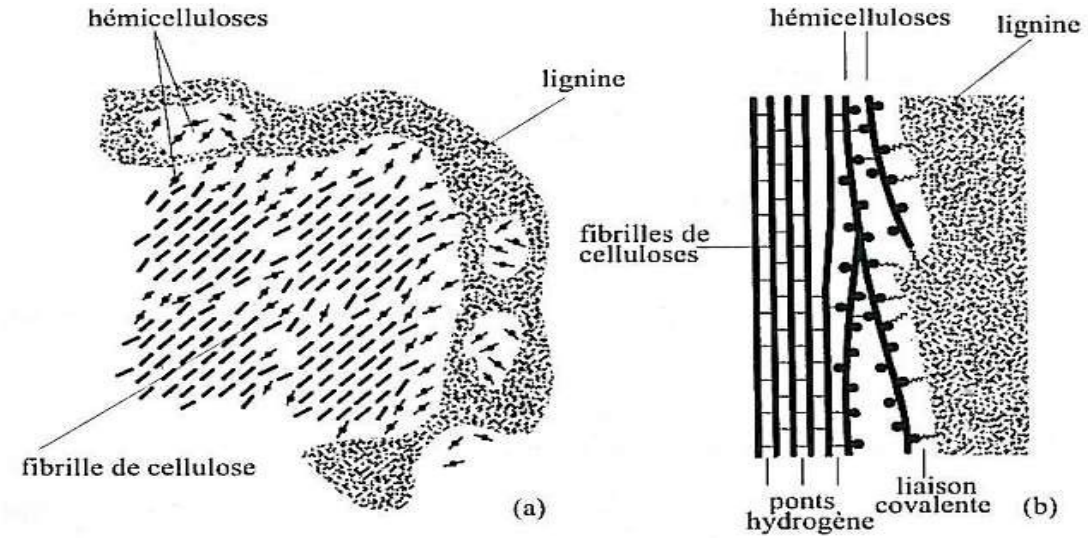


Figure 16. Modèle détaillé de l'association des fibrilles de cellulose, des hémicelluloses et de la lignine dans la paroi à l'état anhydre : (a) section transversale, (b): section longitudinale. (Navi and Heger, 2005).

2.3.1 Interactions hémicelluloses-cellulose

Les informations sur les assemblages cellulose-hémicelluloses sont rares. Cependant, il a été rapporté que les hémicelluloses et la cellulose pouvaient être soudées par plusieurs liaisons hydrogènes, mais que des liaisons plus fortes pourraient exister (Gurjanov et al., 2008). Les interactions entre les hémicelluloses et la cellulose dépendent fondamentalement de la nature du polysaccharide impliqué. Ainsi, une différence de comportement entre les xylanes et les glucomannanes vis à vis de la cellulose d'épicéa mise en évidence par Akerholm et al., (2000) indique que les glucomannanes sont plus étroitement associés à la cellulose que les xylanes.(Åkerholm and Salmén, 2001). Cette analyse conforte l'observation faite préalablement sur les galactoglucomannes qui révélaient des interactions plus généralisées, impliquant environs 70 % des résidus de mannosyle (Newman and Hemmingson, 1998).

2.3.2 Interaction lignine-polysaccharides

Les fonctionnalités chimiques, les attributs physico-mécaniques et les propriétés biologiques de la biomasse lignocellulosique sont fortement conditionnés par la réticulation entre les polysaccharides et la lignine des parois cellulaires des plantes. Les interactions entre la lignine et les hémicelluloses sont similaires à celles établies entre la lignine et la cellulose. En 1866 Erdmann a émis une hypothèse selon laquelle la lignine et les polysaccharides se lient de façon covalente formant une « glycolignose » (Erdmann, 1866). Par la suite, plusieurs études sur les complexes lignine-carbohydrates (LCC) ont fait l'objet d'allégations mettant en évidence une variabilité de combinaisons. Ainsi, 4 principaux groupes de liaisons lignine-glucides sont proposés, à savoir : les phénylglycosides, les éthers, les esters, et les hémiacétal / acétal (Giummarella et al., 2019; Nishimura et al., 2018). Ces liaisons dépendent de la nature du sucre impliqué. Dans le cas des liaisons esters, elles se forment entre l'acide uronique d'un glucuronoxylane et les groupements hydroxyles de la lignine, et sont facilement clivables en milieu alcalin (Das et al., 1981; Hoang et al., 2001). Les liaisons éthers qui sont quant à elles plus stables en milieux alcalin et acide, associent dans le cas des glucurunoxylanes les carbones C2 ou C3 des unités de xylose avec les carbones Cα et Cγ des groupements phénylpropane de la lignine (barbat, 2006). Ces liaisons peuvent aussi se former entre le Cα de la lignine avec le C3 ou le C2 des unités d'arabinose ou bien entre le Cα de la lignine et le C3 des unités de galactose.

La Figure 17 récapitule les différents types de liaisons ester et éther entre les polysaccharides et la lignine. On peut observer que les acides hydroxycinnamiques peuvent directement être estérifiés ou éthérifiés sur les surfaces de lignine. Il est également rapporté que l'acide férulique est capable de former les ponts ester-éther covalents entre la lignine et les polysaccharides, et que les ponts diester entre les polysaccharides peuvent aussi s'établir par l'intermédiaire de l'acide déhydrodiférulique, et être estérifié par la lignine. L'acide paracoumarique n'intervient pas dans des ponts similaires, mais se lie après lignification aux constituants de la paroi sous forme de liaison éther et surtout ester (Iiyama et al., 1994).

Concernant les liaisons phénylglycosides, elles s'établissent très souvent par réaction des groupements hydroxyles phénoliques terminaux ou des chaînes latérales de la lignine avec les unités réductrices des saccharides.

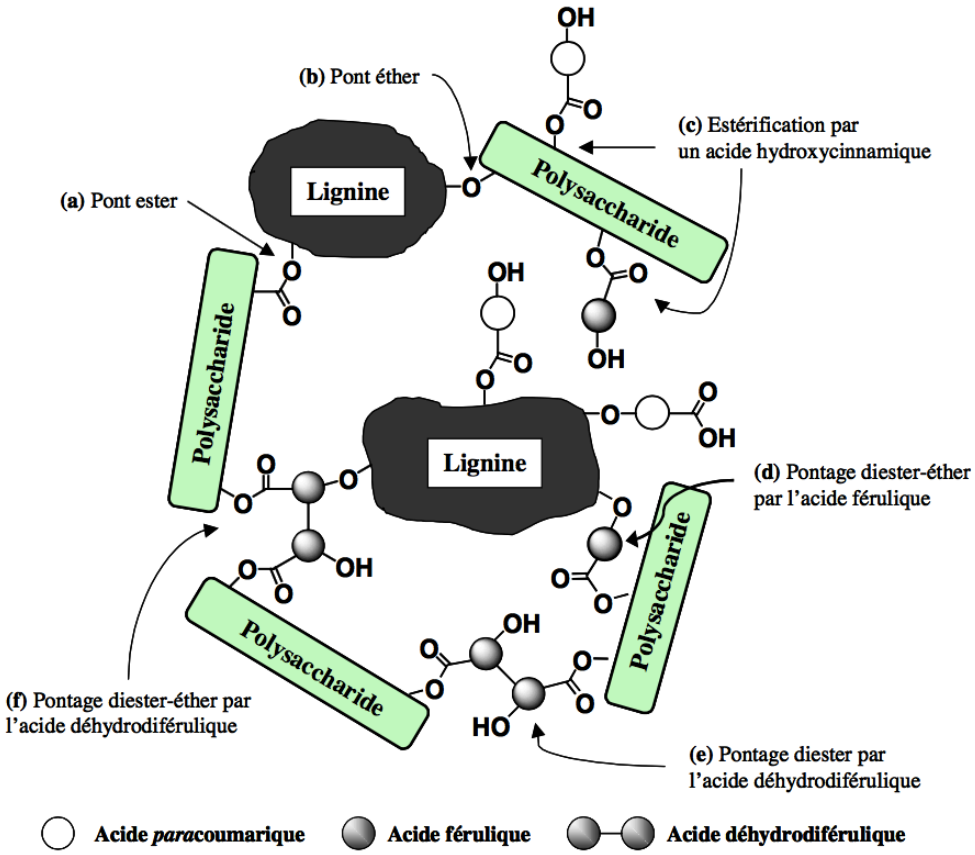


Figure 17. Liaisons covalentes entre les hémicelluloses et les lignines dans la paroi végétale. D'après Barbat (2006)

3 Les traitements préalables à l'extraction des hémicelluloses

La complexité structurale de la paroi cellulaire végétale qui se traduit par une grande diversité des macromolécules implique des traitements préalables afin d'améliorer l'extractabilité de ces constituants pariétaux. Les différents procédés utilisés ont pour objectif de déconstruire le matériau lignocellulosique, en ayant une forte sélectivité pour l'extraction d'une catégorie de macromolécules, et en protégeant dans la mesure du possible l'intégrité structurale des molécules. Or l'existence des liaisons chimiques entre les différents polysaccharides de la paroi, et entre la lignine et les polysaccharides, complique considérablement l'extraction des hémicelluloses. Cette ossature de la paroi cellulaire végétale rend impossible l'extraction d'hémicelluloses sans rompre les interactions moléculaires et donc sans modifier la macromolécule par rapport à sa forme native. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser des procédés d'extraction suffisamment efficaces pour favoriser la rupture de ces liaisons, sans dénaturer les macromolécules extraites.

La littérature concernant l'extraction d'hémicelluloses fait état d'une grande diversité de procédés. Cela est dû à la grande variété structurale des hémicelluloses présentes dans la paroi cellulaire végétale. L'élaboration d'un procédé de traitement de la biomasse pour l'extraction des hémicelluloses doit donc prendre en compte les paramètres suivants : le type d'hémicelluloses extraites, le matériel végétal utilisé, les propriétés souhaitées et les applications visées. Ces dernières années, plusieurs technologies de prétraitement de la biomasse ont été développées. Qu'elles soient physiques (broyage, irradiation aux microondes, ultrasons …) ou chimiques (alcalis, agents chélateurs de métaux, oxydants acides, solvant, …), ces méthodes s'avèrent souvent peu efficaces pour l'extraction d'hémicelluloses lorsqu'elles sont employées toutes seules. Par conséquent, une combinaison de méthodes physiques et chimiques est souvent utilisée pour une extraction optimale des hémicelluloses.

En plus des paramètres opératoires définissant la sévérité de chaque prétraitement, la nature de la biomasse joue un rôle crucial dans l'efficacité du procédé. Parmi les facteurs qui peuvent influencer une solubilisation efficace des hémicelluloses polymériques, notons :

- *La taille des particules :* la granulométrie et la forme des particules jouent un rôle très important dans l'efficacité du traitement de la biomasse lignocellulosique, puisqu'elles influencent le rendement d'extraction. Ainsi, la réduction de la taille des particules augmente la surface d'échange disponible pour le solvant d'extraction par exemple, et favorise ensuite

l'accessibilité aux hémicelluloses. Il a été rapporté que le rendement d'extraction en hémicelluloses est inversement proportionnel à la taille des particules solides (Li et al., 2013; Song et al., 2008). Dans la même dynamique, Li et al. (2013) ont montré que la réduction de la taille des copeaux de bois favorise l'extraction des hémicelluloses de poids moléculaire élevé. Toutefois, pour certains prétraitements comme l'explosion à la vapeur, l'utilisation de très petites particules ne serait pas souhaitable pour optimiser l'efficacité du procédé (Ballesteros et al., 2002).

- *L'effet barrière de la lignine* : la présence d'une trame phénolique intimement liée aux hémicelluloses dans la paroi végétale rend difficile leurs extractions. De ce fait, la délignification se présente comme une étape incontournable dans le processus de fractionnement de la biomasse lignocellulosique. En effet, la lignine joue le rôle de barrière physique empêchant la digestibilité des substrats, réduisant ainsi le taux d'hydrolyse enzymatique (Auxenfans et al., 2014; Chang and Holtzapple, 2000).

3.1 Autohydrolyse

L'autohydrolyse est un prétraitement qui consiste à traiter le substrat lignocellulosique dans un dans un milieu aqueux à température comprise entre 120 et 240 °C pendant un temps de séjour allant de quelques minutes à quelques heures. La température de la réaction étant supérieure à 100 °C, l'expérience se déroule donc à une pression supérieure à la pression atmosphérique.

L'autohydrolyse est un procédé similaire au traitement à l'acide dilué, à la seule différence que l'autohydrolyse utilise l'eau comme seul réactif, ce qui en fait un procédé écologique et peu coûteux (Conner, 1986) Ainsi, l'autohydrolyse de la biomasse est catalysée par les ions hydronium (H_3O^+) qui proviennent de l'auto-ionisation de l'eau à haute température (Figure 18). Le rendement d'extraction, la masse molaire et l'utilisation finale des hémicelluloses extraites dépendent fortement des conditions expérimentales et donc du pH d'extraction (Leppänen et al., 2011).

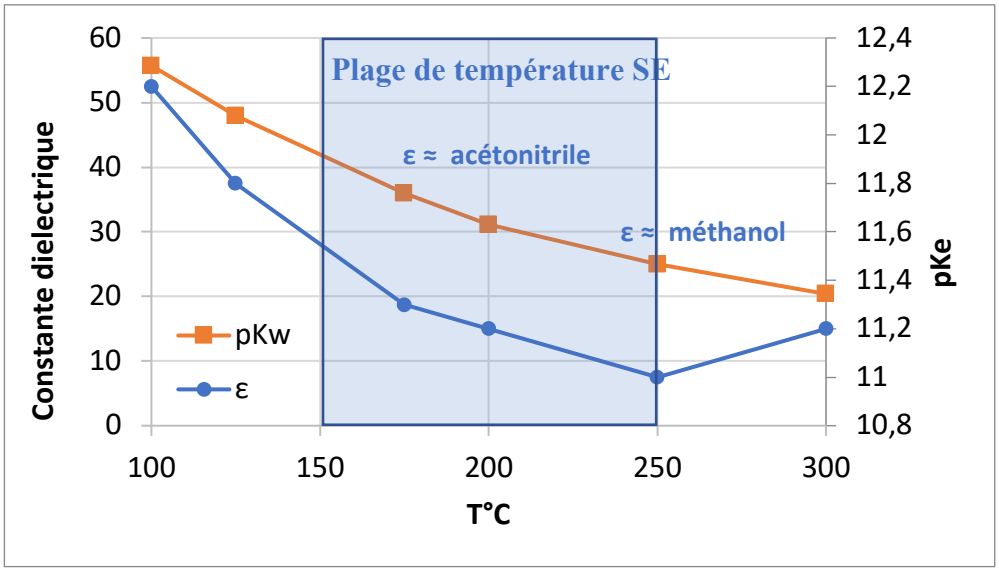


Figure 18. Evolution de la constante diélectrique relative de l'eau avec la température (Ziegler-Devin et al., 2021).

À faible sévérité, on observe une élimination de la fraction la moins stable des hémicelluloses (arabinoxylanes notamment), de même que les acides hydroxycinnamiques rattachés aux hémicelluloses et à la lignine. En outre, les groupements acétyles des hémicelluloses sont partiellement libérés sous formes d'acide acétique, et les sucres sont hydrolysés sous formes de oligomères et monomères solubles dans le milieu réactionnel.

À des sévérités plus hautes, la plus grande partie des hémicelluloses ainsi que la cellulose amorphe sont hydrolysées, ce qui augmente la cristallinité « globale » de la biomasse. Il s'en suit une diminution du degré de polymérisation des hémicelluloses (Dhabhai et al., 2013). Ensuite, les réactions de déshydratation des sucres ont également lieu, conduisant à la production d'hydroxyfurfural (5-(hydroxyméthyl)-2-furaldéhyde ou HMF) et de furfural à partir d'hexoses et de pentoses, respectivement (Fengel and Wegener, 2003). Ceux-ci sont à leur tour dégradés en acides aliphatique tels que l'acide formique et l'acide lévulinique (Figure 19). La lignine n'est pas éliminée, mais sa structure est altérée par des phénomènes de recondensation.

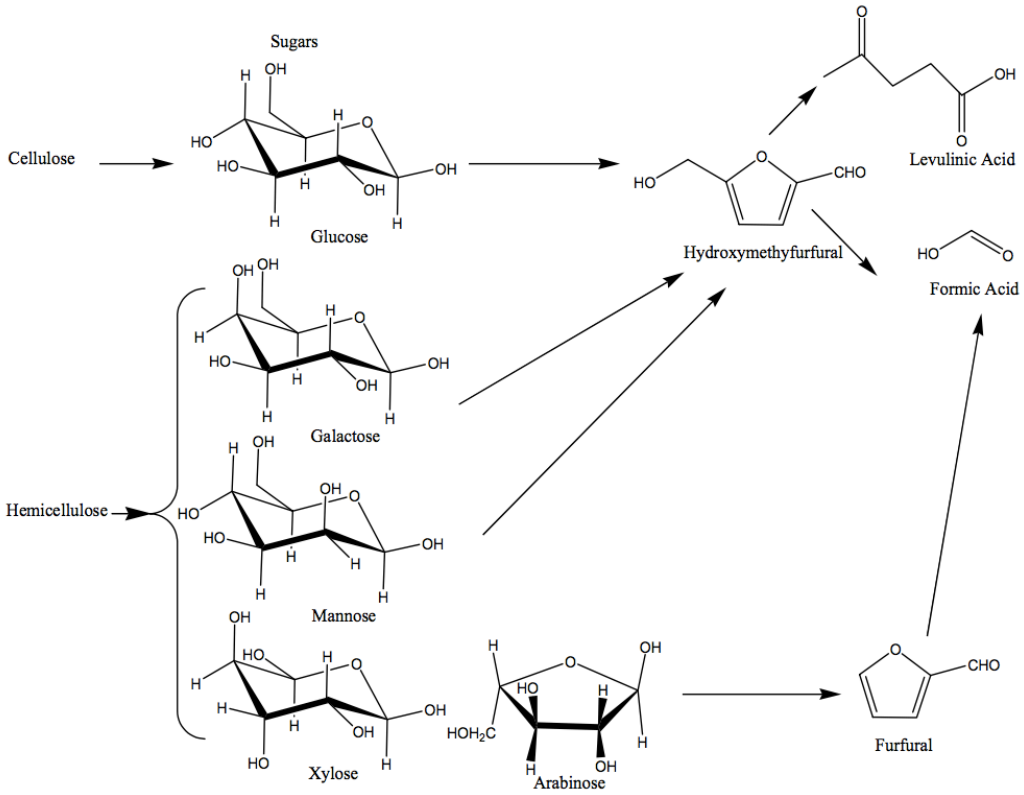


Figure 19. Réactions des monosaccharides au cours de l'hydrolyse des matières lignocellulosiques (Hu et al., 2008)

3.2 Traitements chimiques

Parmi les procédés d'extraction d'hémicelluloses utilisés à l'échelle du laboratoire et très souvent transposés à l'échelle industrielle, les traitements chimiques qui utilisent les acides, les bases ou encore les chélateurs des métaux sont les plus couramment utilisés.

L'extraction des hémicelluloses est difficile à cause de la complexité structurale de la biomasse lignocellulosique qui se traduit par la présence du réseau tridimensionnel de la lignine, les liaisons ester et éther entre les hémicelluloses et la lignine et la coexistence dans la paroi végétale de la cellulose et d'autres produits minoritaires (lipides, protéines, pigments, sucres circulants, etc.). Pour contourner cette difficulté, plusieurs auteurs ont utilisé des prétraitements préalables tels que l'élimination des extractibles, des pectines et de la lignine, pour améliorer et rendre plus accessible l'extraction chimique des hémicelluloses (Barbat et al., 2008; Moine et al., 2007).

Concernant l'élimination des extractibles, elle est le plus souvent réalisée par un mélange de solvants tels que le mélange l'éthanol/benzène, ou le mélange éthanol/toluène dans le but de retirer les composés organiques polaires et apolaires. On peut aussi procéder par une extraction

supplémentaire à l'eau bouillante afin d'éliminer les extractibles hydrosolubles (sucres circulants, lipides, protéïnes etc.).

La déprotéination peut être faite à l'eau froide ou chaude. Cependant, ce prétraitement peut présenter le risque de solubiliser une partie des hémicelluloses. Les prétraitements enzymatiques peuvent également être utilisés pour éliminer les protéines.

Les pectines quant à elles sont extraites en fonction de leur degré de méthylestérification. Ainsi, les pectines fortement méthylestérifiées sont facilement extraites à l'eau chaude, tandis que l'usage des chélateurs de calcium tel que le CDTA, l'EDTA, l'imidazole ou encore l'oxalate d'ammonium est nécessaire pour l'extraction des pectines faiblement méthylestérifiées.

S'agissant de la délignification, elle permet l'élimination de la lignine en utilisant des agents oxydants qui agissent sur les structures phénoliques. Ainsi le chlore, le dioxyde de chlore ou encore le chlorite de sodium utilisé plutôt à l'échelle du laboratoire, sont des oxydants employés classiquement. Aussi, la délignification au peroxyde d'hydrogène en présence de soude a été employée avec succès y compris à l'échelle pilote (Ebringerová and Heinze, 2000; Gabrielii and Gatenholm, 1998).

3.2.1 Extraction des hémicelluloses par solutions alcalines

L'extraction chimique des hémicelluloses est généralement réalisée à partir de solutions alcalines à savoir : la soude, la potasse, la chaux, ou encore le carbonate de potassium, le formiate de sodium et l'ammoniac. Hormis la potasse et la soude, les autres bases ne réagissent efficacement que lorsqu'elles sont utilisées en grande quantité, et pendant des temps de traitement relativement longs (Rutenberg and Herbst, 1957). Généralement, l'utilisation des solutions alcalines sur les biomasses lignocellulosiques provoque l'augmentation de la capacité d'absorption de l'eau, entraînant par la suite le gonflement des fibres cellulosiques, l'augmentation de la surface spécifique et l'abaissement de leur cristallinité (Wen et al., 1988). Plusieurs hypothèses ont été formulées pour décrire le mécanisme d'action de la soude. Ainsi, sous l'action de la soude, la proportion de liaisons hydrogène intermoléculaires serait réduite par solvatation, de même que celle des liaisons entre les hémicelluloses et la lignine (Wen et al., 2011). De plus, les alcalis hydrolysent les liaisons esters entre les sucres et les acides hydroxycinnamiques (Mares and Stone, 1973). Concernant la potasse, elle apparaît beaucoup plus sélective que la soude vis-à-vis de l'extraction des xylanes (Bochicchio and Reicher, 2003).

Les hémicelluloses étant constituées d'un mélange de différents polysaccharides, leur composition et leur rendement d'extraction varient fortement en fonction de la méthode d'extraction. Afin d'obtenir des fractions polysaccharidiques homogènes, on peut procéder par extractions successives avec des solutions alcalines de concentration croissantes.

L'utilisation de solutions alcalines pour l'extraction des hémicelluloses entraîne des modifications importantes de la structure par des réactions de saponification, et d'élimination des groupes -OCH_3 en position 4 des acides uroniques pour donner un intermédiaire acide 4 - déoxyhex - 4-ènuronique. Il est aussi bien connu qu'en solution alcaline, des réarrangements peuvent survenir sur l'extrémité réductrice des polysaccharides, s'accompagnant des phénomènes d'isomération - rétroaldolisation (Hansson and Hartler, 1970). En effet, l'extraction en milieu alcalin engendre des réactions de dégradation des hémicelluloses par les ions hydroxyles, dont le « peeling » qui est une réaction qui clive l'unité terminale de la chaîne des polysaccharides portant la fonction réductrice **(**Figure 20**)**.

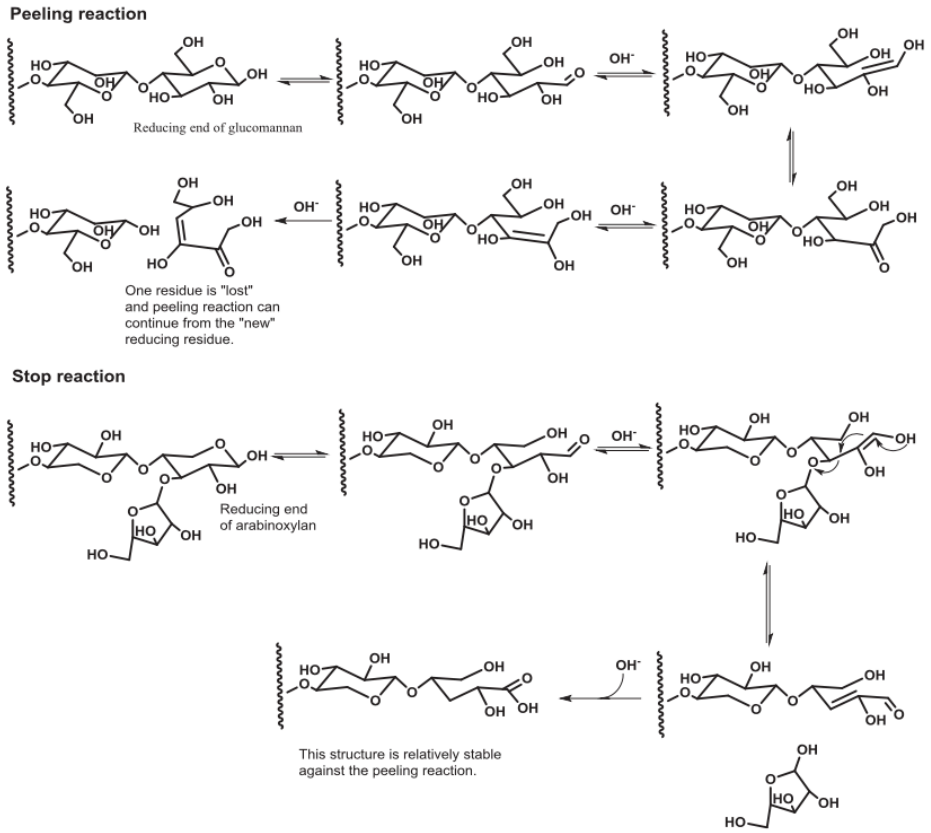


Figure 20. Peeling reaction of glucomannan and stopping reaction of arabinoxylan (Y. Wang et al., 2015).

3.2.2 Extraction des hémicelluloses par des solvant organiques

Le diméthylsulfoxide (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) sont les solvants les plus utilisés pour l'extraction des hémicelluloses, en particulier les xylanes compte tenu de leur solubilité élevée dans ces solvant (Hägglund et al., 1956). Par rapport aux solutions alcalines, les solvants organiques favorisent l'extraction des hexosanes et présentent un avantage de conserver l'acétylation des hémicelluloses. Ce mode d'extraction fournit des fractions très proches des hémicelluloses *natives*, mais le rendement d'extraction et le degré de polymérisation restent relativement faibles.

3.3 Extraction assistée par micro-ondes

L'utilisation des micro-ondes pour l'extraction des polysaccharides à partir de la biomasse lignocellulosique s'est avérée particulièrement intéressante, car les micro-ondes permettent un meilleur accès aux fibres sans être limité par les proportions de fibres en milieu aqueux. En outre, les micro-ondes présentent des avantages comme l'efficacité énergétique, un temps de réaction plus rapide et une température de réaction plus basse (Tsubaki et al., 2016). A la différence du traitement thermique classique où l'énergie est transférée à la matière par convection, conduction ou rayonnement à partir de la surface du matériau, le chauffage micro-ondes délivre directement au matériau une énergie grâce à une interaction moléculaire avec un champ électromagnétique. Cette interaction conduit au chauffage du matériau et un transfert d'énergie de l'intérieur vers l'extérieur du matériau (Chemat et al., 2013). Lors du chauffage micro-ondes, deux phénomènes ont lieux simultanément : la conduction ionique et la rotation dipolaire. La conduction ionique est la migration électrophorétique des ions lorsqu'un champs magnétique est appliqué. La solution est alors chauffée grâce à la friction causée par la résistance de la solution aux flux des ions. La rotation dipolaire correspond quant à elle au réalignement des dipôles avec le champ qui est appliqué (Sparr Eskilsson and Björklund, 2000).

De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet des micro-ondes sur l'extraction des hémicelluloses à partir de la biomasse lignocellulosique (Lundqvist et al., 2002; Panthapulakkal, 2014; Shi et al., 2011; Song et al., 2013). Il a été rapporté que l'extraction par micro-ondes est fortement liée à la nature du solvant utilisé. Ainsi, les systèmes aqueux conviennent parfaitement à l'application des micro-ondes car l'eau est une molécule hautement polaire (Tsubaki et al., 2016). Il a ainsi été observé un rendement d'extraction de xylanes légèrement supérieur à partir des fibres de bois par micro-ondes (58%) que par extraction conventionnelle (54 %) (Panthapulakkal, 2014). Des

observations similaires ont été faites sur le prétraitement par micro-ondes de la tige de maïs avec de l'eau et de l'acide, et dans le prétraitement alcalin de *Panicum virgatum* (Hu et al., 2008; Shi et al., 2011).

La plupart des études sur le prétraitement par micro-ondes ont été menées à une température supérieure à 100 °C et à pression atmosphérique, ce qui conduit à une dépolymérisation des chaînes d'hémicelluloses. Dans une étude récente, un chauffage par micro-ondes a été utilisé pour l'extraction d'hémicelluloses polymérique dans des conditions douces (température <100 °C) dans le but d'éviter toute dégradation et dépolymérisation possible. Cette étude a montré une forte solubilisation du bois et une extraction sélective des hémicelluloses polymériques, en fonction de la puissance du traitement et de la nature du solvant dans lequel la biomasse a été imprégnée (Chadni et al., 2019a). Quelques études sur l'extraction assistée par micro-ondes des hémicelluloses du bois sont présentées dans le Tableau 2**.**

Tableau 2. Récapitulatif de quelques études sur l'extraction assistée par micro-ondes des hémicelluloses issus de la biomasse lignocellulosique. Adapté de Chadni et al., (2019)

Source	**Solvant**	**Temps et température**	**Puissance microondes**	**Rendement**	**Mw (Da)**	**Référence**
Picea abeis	Eau Imprégnation dans 0,05 % NaOH	5 min, 200 °C		75 % Mannose 30 % Manose		Lundqvist et al., 2002)
Bois de bouleau	4 % NaOH	30 min, 100 °C	110 W	60 % Xylose	16271a	(Panthapulakkal & Sain, 2013)
Epicéa	Eau	5 min, 200°C		70 % Mannose 33 % Xylose	24000-870	(Palm & Zacchi, 2003)
Epicéa	Eau Imprégnation dans 1M de NaOH	60 min	125-573 W	Galactoglucomannanes Arabinoglucuronoxylanes	~41000 ~66000	Chadni et al., 2019

a : masse molaire moyenne viscosimétrique

3.4 Extrusion bi-vis

Une extrudeuse bi-vis est constituée de deux arbres rotatifs parallèles sur lesquels sont disposées deux séries de vis sans fin co-pénétrantes contenues dans un fourreau bilobé (Figure 21). Les vis peuvent tourner dans le même sens (extrusion corotative) ou en sens inverse (extrusion contre rotative).

L'extrusion est un procédé continu qui assure le transport et la compression, le mélange de polymère, le mélange de milieux visqueux, la cuisson de polymère, la texturation de produit, le défibrage, l'imprégnation chimique des matériaux fibreux ou encore des réactions chimiques (Bouvier and Campanella, 2014.). En effet, l'extrusion bi-vis est une technologie qui offre de nombreuses possibilités dans divers secteurs comme la papeterie, la plasturgie, l'agro-alimentaire... L'extrudeuse peut aussi être utilisée pour le fractionnement de la matière première. Le principal avantage de cette technique, est qu'elle permet de réaliser de façon simultanée une extrusion, une cuisson, une extraction liquide-solide et une séparation liquide-solide dans un seul appareil fonctionnant en continu.

L'extraction bi-vis se présente souvent comme un procédé thermo-mécano-chimique (TMC), car il conjugue les actions chimiques (usage d'eau avec ou sans solvants / réactifs) et mécaniques (liées à la configuration des vis et des modules) (Markessini et al., 1997). Dans le cas du fractionnement de la biomasse, l'extracteur bi-vis fonctionne en continu avec un haut débit qui favorise la pénétration de la solution dans la biomasse, provoque la rupture de la paroi végétale et améliore par agitation l'interaction entre les molécules du soluté et du solvant. Il a été rapporté que les essais menés sur le fractionnement de polysaccharides pariétaux contenus dans la paille, ont révélé une efficacité du traitement, avec 75 % de solubilisation des hémicelluloses (Magro, 1995). En outre, l'extraction bi-vis a permis d'extraire jusqu'à 90 % des hémicelluloses présentes dans le bois de peuplier en utilisant une solution de 5 % de soude, pendant 3 min de réaction (N'Diaye, 1996).

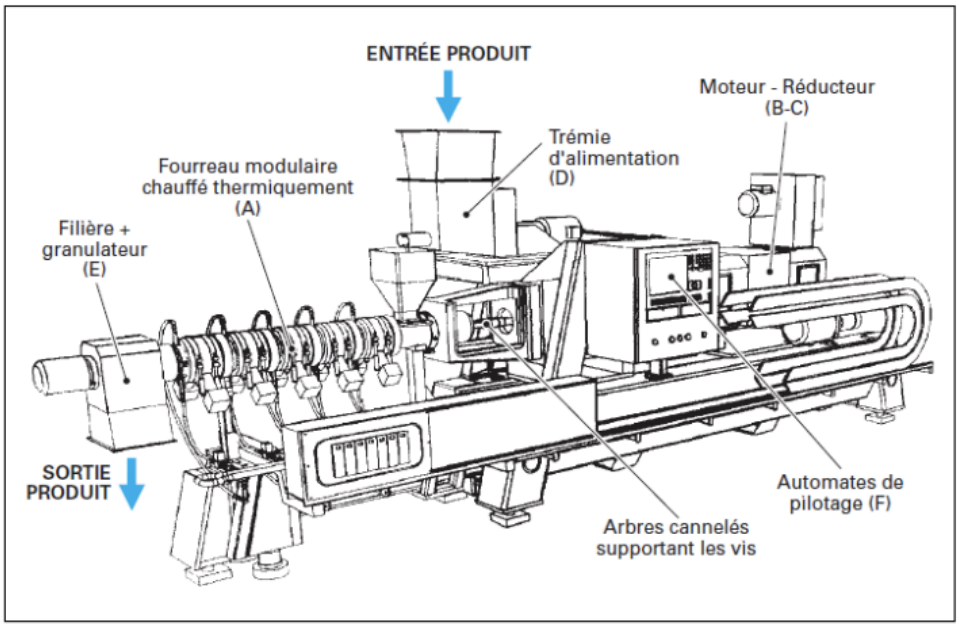


Figure 21. Extrudeuse bi-vis (d'après Clextral)

3.5 Extraction par explosion à la vapeur d'eau

Développé en 1926 par W.H. Mason (Mason, 1926), l'explosion à la vapeur (Figure 22) est le traitement thermo-mécano-chimique le plus prometteur pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique. L'explosion à la vapeur est actuellement mise au point à l'échelle pilote et/ou industrielle pour diverses applications (éthanol,molécules plateformes et énergies) (Rahardjo et al., 2021; Ziegler-Devin et al., 2021). Ce procédé peut avoir lieu en continu ou en batch. Il consiste à utiliser de la vapeur d'eau saturée à haute pression, par injection dans un réacteur batch ou continu. La biomassse est placée dans le réacteur et chauffée à la température de consigne par injection de vapeur saturée, pendant un certain temps de séjour. Ensuite, une dépressurisation soudaine est déclenchée par une vanne à boisseau sphérique commandée pneumatiquement, ce qui permet la vaporisation de l'eau et la destructuration du réseau lignocellulosique.

L'effet de l'explosion à la vapeur est fonction de la sévérité des conditions expérimentales. Ainsi, les gammes classiques des conditions opératoires afin d'optimiser les rendements d'extraction sont :

- Une température de 170 à 270 °C
- Une pression de 4 à 50 bars
- Un temps de séjour de 1 min à 30 min

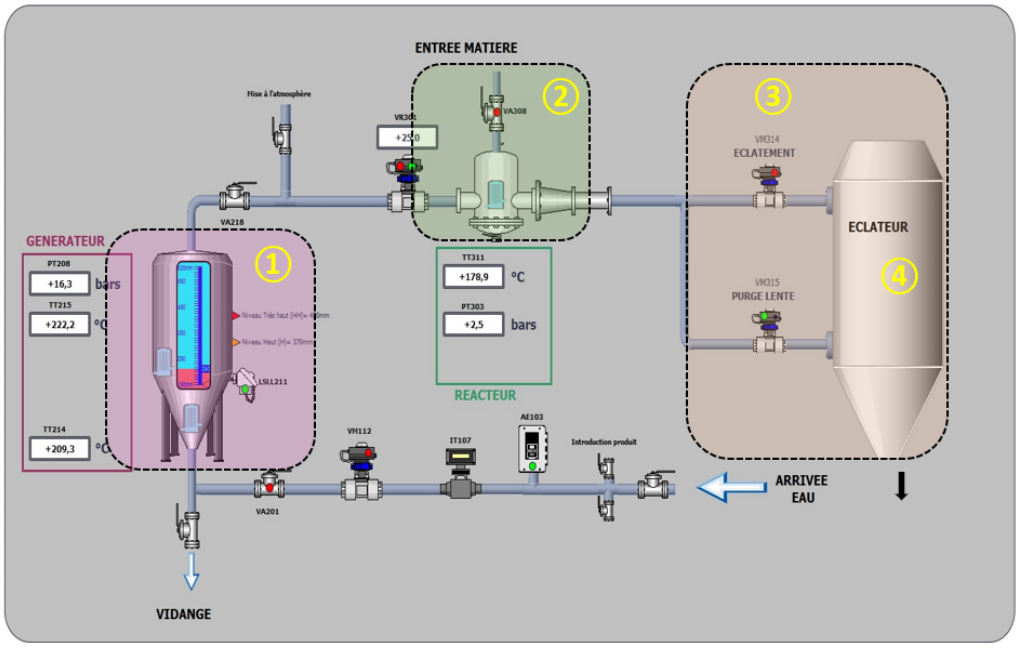


Figure 22. Schéma synoptique du pilote d'explosion à la vapeur situé au LERMAB

Le prétraitement par explosion à la vapeur se déroule en deux principales étapes indépendantes : une étape de vapocraquage et une étape de dépressurisation rapide. La première étape correspond au vapocraquage qui permet de faire pénétrer la vapeur d'eau à hautes pression et température par diffusion dans le substrat L'effet conjugué de l'eau condensée et l'élévation de la température va provoquer l'hydrolyse des groupements acétyles et méthylglucuroniques des hémicelluloses. Par suite, l'acide acétique et les ions H_3O^+ libérés diminuent le pH du milieu et catalysent la dépolymérisation des hémicelluloses et leur libération, comme dans le procédé d'autohydrolyse. En fonction des conditions, des oligosaccharides et des monosaccharides sont libérés et une partie de la cellulose est hydrolysée. Concernant la lignine, elle est peu affectée au cours du prétraitement. Certaines de ses liaisons telles que les liaisons β-O-4 aryl-éther de la lignine se clivent et subissent une rupture homolytique et/ou hétérolytique, suivie d'une recondensation en liaisons β-β et β-5 (Auxenfans et al., 2017; Obame et al., 2019).

La décompression explosive quant à elle, est provoquée par une dépressurisation brutale provoquée par l'ouverture soudaine d'une vanne à boisseau sphérique entraînant la revaporisation d'une partie de l'eau condensée dans le matériau lors du vapocraquage. Par suite, la décompression explosive va engendrer des forces de cisaillement, ce qui va créer non seulement des microfissures dans la structure cellulaire, mais aussi des fragmentations et défibrations de la biomasse (Ziegler-Devin et al., 2021).

Les différents paramètres qui affectent principalement l'efficacité de l'explosion à la vapeur sont : la température, le temps de séjour, la vitesse de détente explosive et l'éventuelle imprégnation de la biomasse. Les résultats expérimentaux ont mis en évidence qu'il existe une corrélation entre la température du procédé couplé au temps de rétention, et l'accessibilité du substrat qui se traduit par une amélioration du rendement d'hydrolyse (Overend et al., 1987). De ces expériences, la notion de sévérité de traitement qui combine les effets de la température et du temps de rétention a été définie selon l'équation :

$$S = log\ [\mathrm{t_s} \,.\, \exp\left(\frac{\mathrm{T} - 100}{14.75}\right)]$$

Où S : facteur de sévérité ; T: température du traitement (°C) ; ts : temps de séjour (min.) ; 14,75 : facteur empirique traduisant le coefficient de température (Jacquet et al., 2010).

En outre, l'explosion à la vapeur présente de nombreux avantages notamment l'impact environnemental très faible, l'utilisation très limité de produits chimiques, et l'amélioration de la réactivité des substrats.

En revanche, les principaux inconvénients de l'explosion à la vapeur résident d'une part dans le coût de l'équipement, les verrous techniques pour son utilisation en procédé continu. Par ailleurs, ce procédé peut entraîner une dégradation partielle des hémicelluloses lorsque les conditions du prétraitement sont sévères.

L'explosion à la vapeur est traditionnellement utilisée comme prétraitement de la biomasse lignocellulosique pour l'obtention de produits chimiques et de bio-reconversion chimique par des procédés de fermentation, de bioraffinerie etc. Cependant, plusieurs études ont évalué l'influence de l'explosion à la vapeur sur l'extraction des polysaccharides à partir de la biomasse lignocellulosique. Ainsi, il a été rapporté qu'un traitement modéré (facteur de sévérité ≈ 3,5) établit un meilleur compromis concernant d'un côté la récupération des sucres hémicellulosiques et de l'autre côté l'amélioration des propriétés d'hydrolyse de la fraction cellulosique (Carvalheiro et al., 2008; Galbe and Zacchi, 2002; Wu et al., 1999). Dans la même dynamique, de nombreuses études décrivent l'hydrolyse et la récupération des hémicelluloses sous formes de monomères, d'oligomères et / ou polymériques à partir du bois et des résidus agricoles (Krawczyk et al., 2008a; Palm and Zacchi, 2003; Schultz et al., 1984; Simangunsong et al., 2020; Sun and Tomkinson, 2000; Wojtasz-Mucha et al., 2017).

4 Fractionnement et séparation des hémicelluloses

Après extraction de la biomasse par divers traitements, les hémicelluloses se retrouvent dispersées dans un mélange de biomolécules (extractibles, lignine, cellulose, minéraux). Par conséquent, les hémicelluloses doivent être séparées et purifiées. Ainsi, on peut séparer les fractions d'hémicelluloses en fonction de leur structure (linéaire, ramifié ou réticulé), leur poids moléculaire ou de leur nature chimique (neutre ou chargé d'acide uronique). De ce fait, l'application de procédés appropriés pour la séparation des hémicelluloses s'avère une étape critique et nécessaire pour leur valorisation. Les techniques visées diffèrent selon l'application et le degré de pureté souhaité. Jusqu'à présent, les deux méthodes les plus utilisées pour la purification et la séparation des hémicelluloses étaient la précipitation par solvant et la séparation membranaire.

4.1 Précipitation par solvant

La précipitation des hémicelluloses en solution par les solvants se fait généralement à partir de différents types d'alcool : le méthanol, l'isopropanol et l'éthanol. Le plus couramment utilisé est l'éthanol. La précipitation alcoolique des hémicelluloses est généralement précédée par l'ajout d'un acide, pour les hydrolysats issus des extractions alcalines (jusqu'à un pH compris entre 5,0 et 5,5), afin d'éviter la dépolymérisation des hémicelluloses d'une part, et d'isoler une première fraction d'hémicelluloses d'autre part. Ensuite, l'ajout d'alcool précipite une seconde fraction d'hémicelluloses (Curling et al., 2007; Wen et al., 1988). Bien que mal décrit, le principe de précipitation consiste à ajouter au milieu aqueux, un solvant dans lequel les polysaccharides sont insolubles. Dans le cas des solutions riches en xylanes, la précipitation alcoolique pourrait être due à l'alignement et l'agrégation des parties des chaînes de xylanes non substituées (Izydorczyk and Biliaderis, 1992). Les galactoglucomannanes peuvent aussi être isolés et purifiés par précipitation graduelle à l'éthanol avec des ratios volumiques tels que 15, 60, ou 90 %, en fonction des masses molaires (Xue et al., 2012). Les principaux facteurs qui affectent l'efficacité de la précipitation à l'éthanol sont la concentration en polysaccharides dans le milieu, et la proportion du solvant ajouté (Sen et al., 2011). Plusieurs auteurs ont étudié la précipitation à l'éthanol de manière générale avec des proportions eau/ éthanol très diversifiées (Song et al., 2013). Ainsi, l'éthanol permet de précipiter des saccharides de hautes masses moléculaires (Deloule et al., 2017; Song et al., 2013; Willför et al., 2008a). Toutefois, il a été rapporté qu'il est possible de précipiter les arabinoxylo-oligosaccharides de bois feuillus avec de l'éthanol à 90 % (Swennen et al., 2005).

La précipitation alcoolique des hémicelluloses reste au cœur des recherches, en raison de son efficacité dans cette approche de fractionnement, et aussi de son facilité de recyclage par simple distillation. Cependant, elle présente l'inconvénient d'utiliser de grands volumes de solvant et de co-précipiter les minéraux. Ainsi, le recours à la filtration membranaire des hydrolysats contenant les hémicelluloses se présente comme l'alternative la plus prometteuse, pour isoler des fractions de façon plus précise, de retirer certaines impuretés, de concentrer un mélange. Il présente aussi l'avantage de procéder en continu.

4.2 Séparation membranaire

L'emploi des technologies membranaires est en pleine expansion, et pourrait s'appliquer dans plusieurs secteurs, notamment l'industrie papetière et l'industrie agroalimentaire. Ces technologies sont utilisées afin d'améliorer les procédés de fabrication ou de valoriser des coproduits. La filtration membranaire est une technique de séparation liquide / liquide, liquide / solide, liquide / gaz ou gaz / gaz basée sous l'effet d'une force motrice en faisant intervenir une membrane semi-perméable et sélective. L'avantage de la séparation membranaire réside dans son faible coût énergétique comparativement à d'autres procédés de séparation.

4.2.1 Généralités sur la séparation membranaire

Les procédés membranaires sont des méthodes qui consistent à séparer des composés en solution ou en phase gazeuse, selon leur masse moléculaire, à l'aide d'une membrane. La membrane semi-perméable et sélective possède une structure poreuse, et se caractérise par un seuil de coupure, qui est défini par la masse molaire du composé le plus petit retenu à 90 %. De ce fait, l'application d'un différentiel de pression, de part et d'autre de la membrane, induit le transfert d'un soluté par rapport à l'autre. On distingue alors deux milieux séparés par la membrane à savoir : le perméat (composé des molécules de masse moléculaire inférieures au seuil de coupure), qui traverse la membrane, et le rétentat qui ne traverse pas la membrane.

En fonction du sens de circulation du fluide à traiter lors d'une opération de filtration membranaire, on peut distinguer deux modes de filtration : la filtration tangentielle (cross flow) et la filtration frontale (dead end) **(**Figure 23**)** :

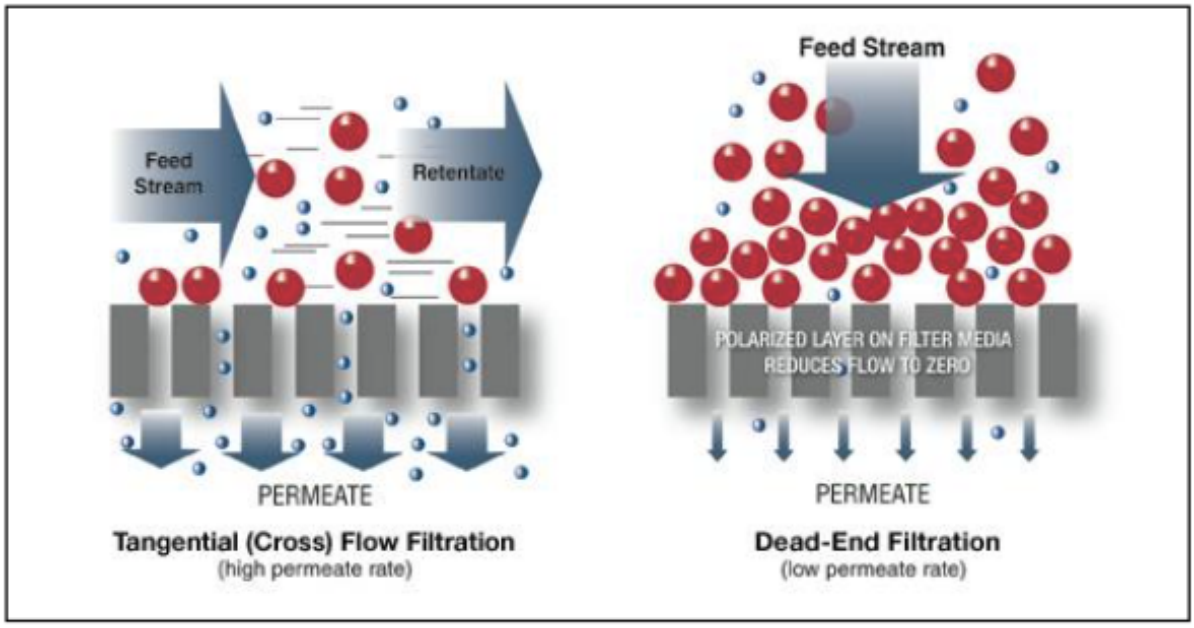


Figure 23. Schéma de principe de la filtration tangentielle et frontale (Membrane Filtration Process from GEA Process Engineering)

- La filtration frontale : c'est un procédé discontinu, souvent utilisé en laboratoire pour des petits volumes (jusqu'à 1 litre). Lors de la filtration frontale, le fluide s'écoule perpendiculairement à la membrane sous l'action d'un gradient de pression. À mesure que la filtration progresse, le soluté rejeté s'accumule et le débit du filtrat diminue de façon très importante avec le temps (Ramaswamy and Marcotte, 2005). Cependant, la filtration frontale présente quelques désavantages, dont le principal réside dans l'accumulation de particules à la surface de la membrane, formant une couche nommée gâteau de filtration. Par suite, le gâteau de filtration s'épaissit et génère d'importantes pertes de charges. Ce gâteau influe considérablement sur les performances du procédé, en induit une diminution du flux de perméation.
- La filtration tangentielle est un procédé membranaire où le flux d'alimentation progresse parallèlement à la membrane de filtration. Contrairement à la filtration frontale, il ne se forme pas de gâteau lors de la filtration. En effet, le sens d'écoulement permet de réduire l'accumulation de la matière à la surface de la membrane par balayage. Plus la vitesse de circulation est importante, moins la filtration présente de résistance au transfert de matière (Al-Rudainy et al., 2020). Si la filtration tangentielle permet une bonne productivité, elle nécessite en revanche une consommation énergétique et des coûts d'investissement plus importants qu'en filtration frontale car elle implique une pompe supplémentaire (Aimar and Bacchin, 2010). En filtration

tangentielle, plusieurs modes d'opération sont possibles (Figure 24). Dans le mode fermé, le rétentat et le perméat sont totalement renvoyés dans la cuve d'alimentation. Ce mode permet d'optimiser les paramètres de filtration. En mode semi-ouvert, le rétentat circule tandis que le perméat est retiré. Ce mode réduit progressivement le volume du rétentat pour concentrer les molécules retenues par la membrane. En mode semi-continu, appelé aussi diafiltration, le volume de la cuve d'alimentation est maintenu constant, en remplaçant le perméat retiré, par ajout d'une solution de composition connue (Bacchin, 2005).

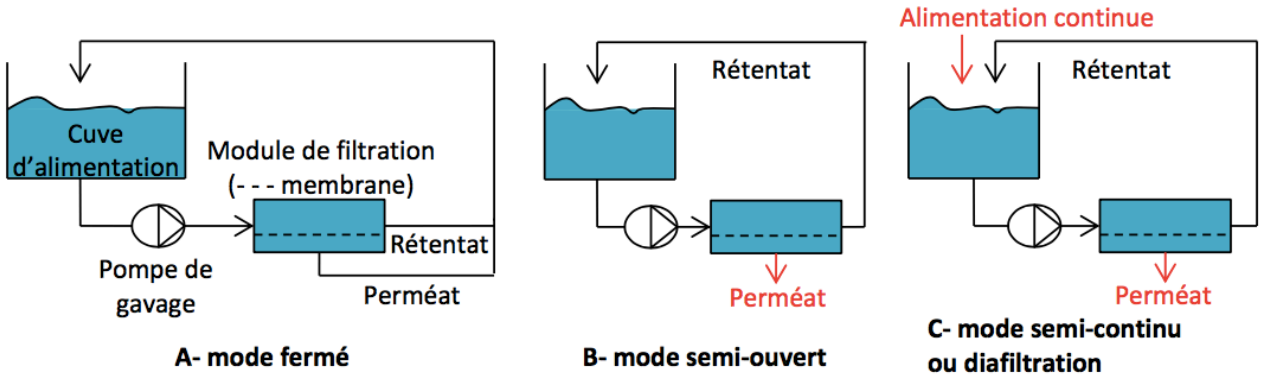


Figure 24. les différents modes de fonctionnement en filtration tangentielle (Steinmetz, 2020)

Selon le seuil de coupure de la membrane utilisée, les procédés de séparation membranaire peuvent être catégorisés en quatre domaines liés au seuil de coupure de la membrane retenue à savoir : la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (OI) (Bacchin, 2005). La Figure 25 illustre quelques domaines de filtration membranaire et leurs applications, ainsi que quelques exemples de particules pouvant être retenues.

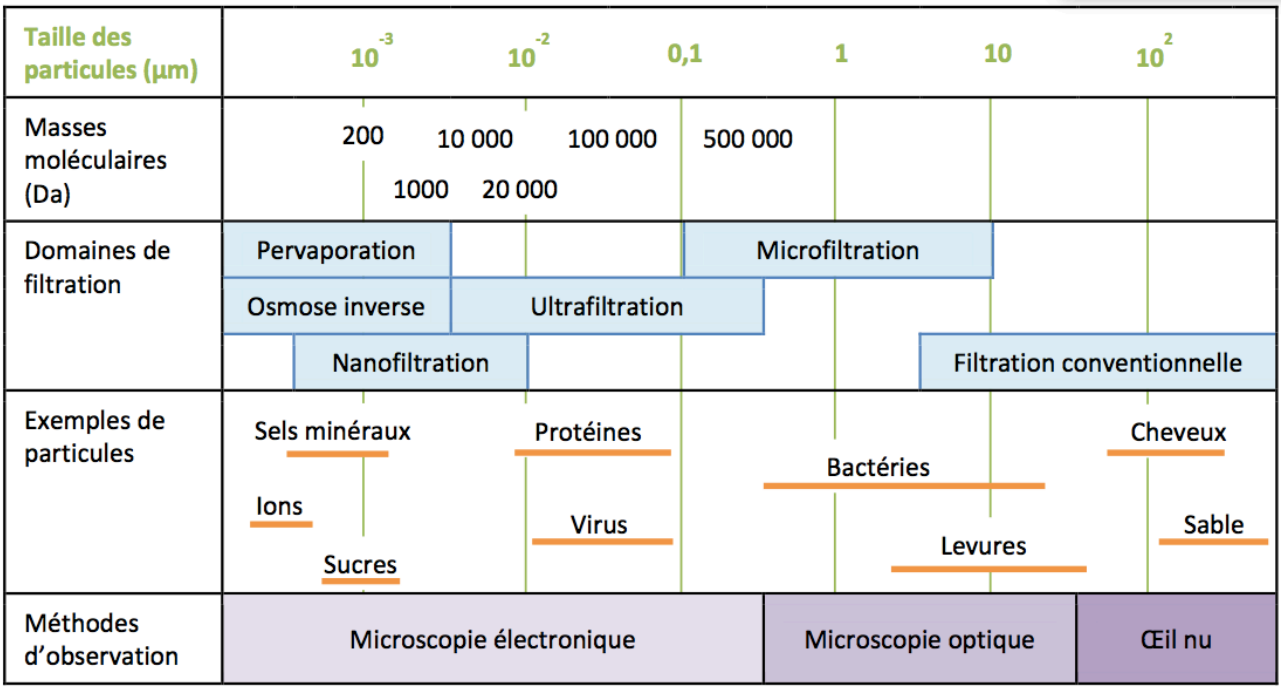


Figure 25. Domaine d'application des procédés de filtration membranaire en fonction de la taille des particules retenues (Steinmetz, 2020).

En outre, un procédé de séparation membranaire est performant, lorsqu'il présente une productivité élevée, en permettant de séparer les composés de façon efficiente. Pour cela, plusieurs paramètres sont établis pour optimiser la séparation membranaire. On distingue ainsi :

La pression transmembranaire (PTM), qui est appliquée à la solution traitée, pour forcer les molécules de taille inférieure au seuil de coupure de la membrane à traverser la membrane. La PTM correspond au différentiel de pression mécanique exercé de part et d'autre de la membrane, au moyen d'un gaz sous pression ou d'une pompe et d'une vanne.

Le taux de rétention (TR), qui permet de quantifier la proportion de composés retenus par la membrane, et donc d'évaluer la sélectivité du procédé à séparer les molécules.

Le flux de perméation (J) détermine le volume du fluide qui traverse membrane par unité de surface et de temps ($m^3.m^{-2}.s^{-1}$ ou $L.m^{-2}.h^{-1}$). C'est un paramètre déterminant pour l'optimisation du procédé, car il influence considérablement la vitesse de ce dernier.

La perméabilité à l'eau (Lp) qui est la capacité d'une membrane à se laisser traverser par l'eau osmosée ou permutée (Lp en $m.s^{-1}.Pa^{-1}$ ou $L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$).

En résumé, les équations qui permettent de définir les paramètres précités sont illustrées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3. Principaux paramètres de fonctionnement de la filtration membranaire (Steinmetz, 2020)

Parmètres	Significations	Équations
Pression transmembranaire (PTM)	**Force motrice de l'opération** définie par la moyenne des pressions d'alimentation (Pa) et de rétentat (Pr) à laquelle est soustraite la pression du perméat (Pp)	$\mathrm{PTM} = \frac{Pa + Pr}{2} - Pp\ (bar)$
Flux de perméation (J)	**Production du procédé** définie par le débit de perméation (Qp) divisé par la surface de la membrane (S)	$J = \frac{Qp\ (L.h^{-1})}{S(m^2)}$
Pérméabilité à l'eau (Lp)	**Cas de la filtration d'eau pure** Paramètre intrinsèque de la membrane décrivant sa résistance hydraulique (Rm)	$\mathrm{L}p = \frac{1}{\mathrm{Rm}\ (\mathrm{Pa}.s.m^{-1})} = \frac{J}{PTM}$ D'où $J = \mathrm{L}p\ x\ PTM$ (eau pure)
Taux de rétention (TR)	**Sélectivité du procédé** TR = 1 signifie que le composé est parfaitement retenu par la membrane, TR = 0 le composé n'est pas du tout retenu (concentration dans le perméat Cp = concentration dans le rétentat Cr)	$\mathrm{TR} = 1 - \frac{Cp}{Cr}$

4.2.2 Choix des membranes et effets des paramètres de filtration

Lors du développement d'un procédé membranaire, il est nécessaire de prendre en compte les caractéristiques et les propriétés de la membrane à utiliser. En effet, il existe plusieurs types de membrane de filtration qui se distinguent par leur configuration, leur natures chimique, leur mode de

fabrication et leur mécanisme de transfert de matière (Remigy and Desclaux, 2007). Ainsi, le choix de la membrane de filtration doit se baser sur la sélectivité vis-à-vis des composés à séparer, mais aussi sur l'adéquation entre les propriétés de la membrane, et les caractéristiques physico-chimiques de du fluide traité.

Selon leur nature chimique, les membranes de filtration se regroupent en deux principales familles. D'une part, les membranes organiques qui sont constituées de polymères, tels le polyéthersulfone (PES), la cellulose, le polyamide (PA), le polyimide (PI), … (Desclaux and Remigy, 2013). Ces membranes possèdent une grande sélectivité, et présentent une large gamme de seuil de coupure, pour tous type de modules. En revanche, ces membranes présentent généralement une faible résistance aux hautes températures (> 100 °C), aux conditions oxydantes, à la présence des solvants et aux pH extrêmes.

D'autre part, les membranes céramiques sont essentiellement fabriquées à base d'oxydes métalliques (oxyde d'aluminium, de zirconium ou de titane). Ces membranes ont l'avantage de supporter les acides, les bases, les oxydants, les solvants, ainsi que les températures supérieures à 300 °C. Toutefois, leur coût de production est très élevé et leur usage se limite à la MF et l'UF (Remigy and Desclaux, 2007 ; Desclaux and Remigy, 2013).

Le Tableau 4 illustre les principaux matériaux membranaires, ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients.

Tableau 4. Matériaux membranaires (Adapté de Remigy and Desclaux, (2007).

Matériaux	**Avantages**	**Inconvénients**
Acétate de cellulose	Perméabilité et sélectivité élevées Mise en œuvre assez aisée Faible adsorption des protéines Colmatage moindre	Sensible à la température (T<30-40 °C) Sensible au pH (entre 3 et 8) Sensible au chlore Sensible au compactage Sensible aux microorganismes
Polyamide	Bonne stabilité chimique, thermique te mécanique	Grande sensibilité au chlore Faible perméabilité Phénomènes d'adsorption importants
Polyéthersulfone	Bonne stabilité thermique (jusqu'à 80 °C) et au pH (de 2 à 12) Résistance au chlore	Sensible à l'adsorption des protéines et des matières organiques naturelles
Acryliques	Bonne stabilité thermique et chimique Stockage à sec possible	Faible résistance mécanique
Matériaux fluorés (PTFE, PVDF)	Bonne stabilité thermique (80 °C) et chimique (0 < pH <14) Tolérance vis-à-vis de la plupart des solvants	Microfiltration uniquement
Céramiques	Résistance aux températures élevées (jusqu'à 300 °C) Résistance aux conditions agressives et solvants (0 < pH <14) Possibilité de stérilisation à la vapeur d'eau et aux solvants	Seuil de coupure minimum ≥1000 Da Coût élevé N'existe qu'en géométrie tubulaire ou plane

Outre la nature chimique, la forme géométrique des membranes de filtration influe considérablement sur l'efficacité du procédé de séparation. De ce fait, il existe deux formes de géométrie de membrane au sein desquelles sont repartis quatre types de modules différents des filtrations tangentielles (Remigy and Desclaux, 2007) :

- Les modules plans, constitués d'une superposition de plusieurs couches de porosité croissante en partant de la couche sélective vers la couche support. Les modules plans possèdent une compacité faible (de l'ordre de 100 à 400 $m^2.m^3$).
- Les modules spiralés, constitués de couches planes et d'espaceurs enroulés en spirale. Ces modules possèdent une compacité moyenne (de l'ordre de 300 à 1000 $m^2.m^3$).
- Les modules tubulaires, de forme cylindrique avec plusieurs canaux, ayant des diamètres de l'ordre du millimètre au centimètre, dont la couche active et sélective est interne. La filtration s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur du tube. Les membranes tubulaires sont soit seules, soit assemblées dans un carter afin de former le module tubulaire. Ces modules présentent une compacité faible (entre 10 et 300 $m^2.m^3$).
- Les modules fibres creuses, formées de plusieurs milliers de membranes fibres creuses. Ces membranes ont une forme cylindrique possédant un canal de diamètre souvent inférieur au millimètre. Ces modules montrent une compacité élevée (de l'ordre de 1000 à 1500 $m^2.m^3$).

Quand les membranes de filtration sont mises en contact avec un milieu polaire tel qu'une solution aqueuse, elles se chargent en surface. Dans ce cas, la sélectivité des membranes dépend non seulement de la taille des composés à retenir, mais également des effets de charges électriques liées à la nature chimique des membranes. Ces charges de surface peuvent être liées au caractère basique ou acide des groupements de surface, ou bien aux propriétés amphotères des sites de surface. Ainsi, la charge de surface d'une membrane se trouve fortement influencée par la nature chimique des membranes, et par les différentes propriétés physico-chimiques de filtration comme le pH et la concentration de la solution traitée (Innocent et al., 2008). Au cours de l'opération de filtration et en fonction de la sélectivité de la membrane, les espèces retenues s'accumulent à la surface de la membrane entraînant une accumulation de matière et donc du colmatage.

Le colmatage résulte d'un dépôt de matière à la surface et / ou à l'intérieur des pores de la membrane, si bien qu'une résistance supplémentaire à l'écoulement apparaît, et le débit de filtration diminue. Le phénomène de colmatage peut être réversible (si le dépôt de matière peut être éliminé de la membrane par rinçage), ou irréversible (s'il n'est pas possible d'éliminer le dépôt de matière sans endommager la membrane) (Meng et al., 2009). Dans tous les cas, le colmatage se décrit par quatre mécanismes (Figure 26) :

- Formation de gâteau : c'est un phénomène réversible au cours duquel les particules ayant une taille supérieure aux pores de la membrane se déposent au niveau de la surface membranaire, et forment une couche colmatante.
- Blocage standard : encore appelé blocage des pores, il se caractérise par un bouchage des pores de la membrane par des particules dont la taille est inférieure au seuil de coupure de la membrane. Il se traduit par un colmatage interne de la membrane qui entraîne une décroissance du volume poreux. Le blocage standard peut être réversible ou irréversible.
- Blocage complet : Dans ce cas, les composés de taille supérieure au seuil de coupure de la membrane, bouchent les pores en surface, et forme une monocouche sous forme de gel.
- Blocage intermédiaire : encore appelé adsorption, où les pores de la membrane en surface et/ou au sein de la membrane sont bouchés par des molécules ayant une affinité avec le matériau constitutif de la membrane.

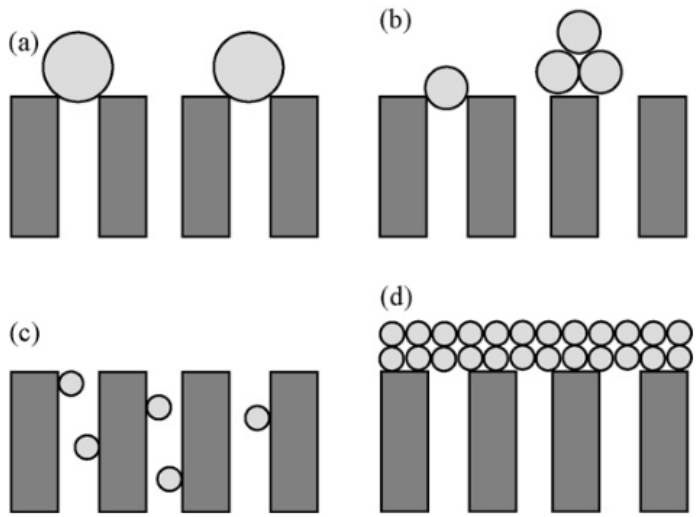


Figure 26. Illustration des mécanismes de colmatage : blocage complet (a), blocage intermédiaire (b), blocage standard (c) et gâteau de filtration (d) (Innocent et al., 2008)

En partant du postulat que tous les pores sont de même taille, Hermia et al., (1982) ont développé un modèle empirique permettant de déterminer les différents types de mécanisme de colmatage. Ce modèle s'applique à une filtration frontale à pression constante.

L'équation du modèle qui relie l'évolution du volume du filtrat en fonction du temps se traduit sous la forme généralisée suivante :

$$\frac{d^2t}{dv^2} = k\left(\frac{dt}{dv}\right)^n$$

Avec :

- k est la constante d'Hermia
- t est le temps de filtration (s)
- v est le volume de perméat (m^3)
- n est l'indice de colmatage, paramètre permettant de décrire le type de colmatage dominant

Le modèle de Hermia permet d'analyser jusqu'à un certain degré, la réduction de flux et d'identifier le mécanisme de colmatage dominant lors de la filtration. Ainsi, ce modèle a été modifié afin d'aboutir aux équations qui décrivent les quatre différents mécanismes de colmatage (Tableau 5), qui se différencient par la valeur de la puissance *n* qui définit l'ordre du modèle.

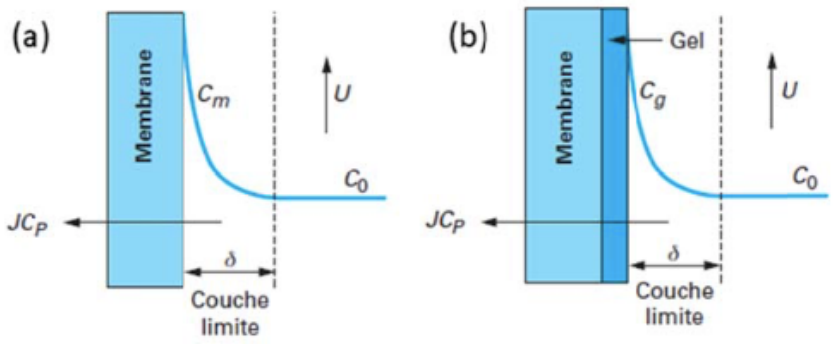
Tableau 5. Modèles de colmatage à pression constante (Rohmdane, 2006)

Mécanismes de colmatage	***n***	**Équations**
Blocage complet	**2**	$v = J_0(1 - \exp(-k_c t))$
Blocage standard	**1,5**	$v = \frac{1}{k_i} \ln(1 + kkJ_0 t)$
Blocage intermédiaire	**1**	$v = \frac{1}{J_0 t} + \frac{k_s}{2}$
Formation de gâteau	**0**	$v = \frac{1}{k_g J_0}\left(\sqrt{1 + 2k_g {J_0}^2 t - 1}\right)$

* *Ks* : constante du blocage standard (s.m) ; *Ki* : constante du blocage intermédiaire (m^{-1}) ; K_c :constante du blocage complet (m^{-1}) ; K_g : constante de formation du gel ($s.m^{-2}$) ; J0 : flux de perméation initial ($m.s^{-1}$).

Au cours de processus de filtration, un gradient de concentration apparaît de la surface de la membrane vers la solution. Ce phénomène de polarisation de concentration est presque instantané, réversible et s'annule lorsque la force motrice de la filtration (pression) s'annule. Les composés accumulés restent inchangés par rapport à leur état initial dans la solution traitée. En outre, la quantité de matière qui s'accumule à la surface de la membrane augmente au début de la filtration. Dans le cas d'un écoulement tangentiel, la charge de surface se trouve limitée du fait que les espèces retenues sont transportées vers la sortie du module. En conséquence, la polarisation de concentration limite le

transfert de matière et peut engendrer la formation d'un gel au niveau de la surface membranaire, si la solubilité des composés est dépassée (Aimar and Bacchin, 2010) (Figure 27).



U : vitesse de recirculation
JCp : flux de perméation
δ : épaisseur de la couche de polarisation
C_m : concentration à la surface de la membrane
C_g : concentration de formation d'un gel
C_0 : concentration en solution

Figure 27. Modélisation de la polarisation de concentration : sans formation de gel (a) ; avec formation de gel (b) (Aimar and Bacchin, 2010).

4.2.3 Nettoyage et régénération des membranes de filtration

Dans toutes les applications de filtration membranaire, le colmatage est le facteur majeur qui limite l'efficacité de l'opération de filtration. De ce fait, le contrôle et la minimisation de l'effet du colmatage nécessite un choix judicieux des paramètres opératoires. Toutefois, le développement du colmatage reste difficile à éviter totalement. Il devient nécessaire d'appliquer des séquences de nettoyage chimique pour ramener la membrane à état proche de son état initial. Ainsi, le bon nettoyage d'une membrane dépend du choix des produits chimiques de nettoyage et des conditions de nettoyage.

Les méthodes de nettoyage classique utilisent généralement les agents de type alcalin (NaOH et KOH principalement), acide (HNO_3 et H_3PO_4 principalement) ou enzymatique en fonction de l'agent colmatant. Quelques classes des produits constitutifs des détergents pour le nettoyage des membranes, et leurs modes d'action sont illustrés dans le Tableau 6 (Bacchin, 2005; Rabiller- Baudry, 2009).

Le choix d'une méthode de nettoyage est fortement influencé par le type de membrane, sa configuration et sa résistance chimique et physique. On peut aussi avoir recours au nettoyage

enzymatique pour les matériaux peu tolérants aux réactifs chimiques comme l'acétate de cellulose. Le nettoyage des membranes par les enzymes s'avère très efficace surtout dans le cas de colmatage organique, car il hydrolyse directement les liaisons spécifiques des espèces responsables du colmatage. En revanche, le nettoyage enzymatique est très coûteux par rapport au nettoyage chimique, et implique un choix d'enzymes bien adapté au matériau membranaire de manière à ne pas attaquer les liaisons de la matrice membranaire dans le cas des membrane organiques.

Tableau 6. Quelques classes de produits entrant dans la composition des détergents pour le nettoyage des membranes et leurs modes d'action (Zaouk, 2018)

Classes	**Rôle**
Alcalins	Elimination des matières organiques (i.e. sucres et protéines) Saponification
Acides	Dissolution des précipités minéraux
Enzymes	Dissolution des matières organiques
Complexants/séquestrant	Élimination des cations multivalents (solubilisation sous forme de complexes)
Tensioactifs	Elimination des matériaux hydrophobes, peu ou non hydrosolubles Augmentation de la mouillabilité de la surface filtrante et favoriser le contact entre l'agent de nettoyage et le dépôt
Désinfectants (avec un pH préférentiellement alcalin)	Destruction des microorganismes et des biofilms, nettoyage de matière organique (effets oxydants)
Dispersants	Antiredéposition

Comme dans le cas des filtrations, les paramètres opératoires ont une grande influence lors du nettoyage des membranes. Parmi les paramètres qui peuvent avoir un effet considérable sur l'efficacité du nettoyage d'une membrane, on peut citer la vitesse de circulation, qui favorise la fragilisation des couches colmatantes sous l'effet d'abrasion mécanique liée à une grande vitesse. On peut également noter la pression transmembranaire, qui, lorsqu'elle est faible, facilite l'élimination des particules faiblement attachées à la surface et évite la compaction et la redéposition des particules au sein de la membrane (Blanpain-Avet et al., 2009; D'Souza and Mawson, 2005). La température est également un paramètre important lors du nettoyage d'une membrane. L'augmentation de la température des solutions de nettoyage facilite la diffusion, favorise la solubilisation des particules et augmente la vitesse des réactions chimiques. Toutefois, de nombreux travaux ont monté qu'il existe une température optimale au-delà de laquelle les performances de nettoyages ne peuvent plus être améliorées (Blanpain-Avet et al., 2009; D'Souza and Mawson, 2005). En outre, la concentration de l'agent nettoyant, son pH et sa force ionique qui sont directement conditionnés au type de membrane,

ainsi que la durée du nettoyage, sont des paramètres clés qui influent considérablement les opérations de nettoyage membranaire.

4.2.4 Application des procédés membranaires pour le fractionnement des hémicelluloses.

Un hydrolysat de biomasse lignocellulosique est un mélange polydisperse généralement composé de monosaccharides et d'oligosaccharides de différentes tailles, natures chimiques et masses molaires. Il contient aussi des impuretés telles que les composés organiques de très faible poids moléculaire et les minéraux. De ce fait, la filtration membranaire s'est avérée très prometteuse pour la concentration et la purification des polysaccharides. La nanofiltration qui utilise des membranes avec un seuil de coupure inférieur à 500 Da, et l'ultrafiltration qui implique des membranes ayant un seuil de coupure supérieur, sont les procédés les plus utilisés pour l'isolement des hémicelluloses pures. Ce sont des procédés de séparation en phase liquide réalisés à température ambiante et en l'absence de réactifs chimiques (Lyu et al., 2016, 2015; Persson and Jönsson, 2010; Schlesinger et al., 2006).

La nature de la membrane joue un rôle crucial dans la purification et la séparation des hémicelluloses. Une étude a comparé les performances de cinq membranes polymériques de nanofiltration et d'ultrafiltration pour la séparation des hémicelluloses à partir d'une solution alcaline (Schlesinger et al., 2006). Les données expérimentales ont montré que les hémicelluloses sont presque quantitativement retenues à des masses molaires supérieures à 1000 Da par les membranes de type polyéthersulfone (PES). Une rétention des hémicelluloses à plus de 90 % a été possible avec deux membranes de nanofiltration (composite et à base de polysulfone) dont le seuil de coupure est compris entre 250 et 500 Da (Schlesinger et al., 2006).

La concentration, la polarisation et / ou la formation de gels de molécules de hautes masses moléculaires, qui sont directement liées au pH, à la température et la teneur en minéraux de l'hydrolysat, influent sur les performances de séparation et de purification des hémicelluloses. Pour cela, de nombreuses études ont montré que l'application d'une micro et / ou ultrafiltration en amont de la nanofiltration est nécessaire (Krawczyk et al., 2008a; Persson and Jönsson, 2010; Pinelo et al., 2009; Sukhbaatar et al., 2014).

5 Techniques de caractérisation des hémicelluloses

Pour envisager une valorisation des hémicelluloses, il est nécessaire de bien déterminer leur nature ; pour cela, différents types d'analyses chimiques et physiques sont généralement utilisés. D'une manière générale, l'analyse des hémicelluloses doit permettre de préciser un certain nombre d'informations :

- la composition osidique, qui doit être à la fois quantitative et qualitative,
- la position et l'anomérie des liaisons osidiques,
- la quantification et la localisation des groupements acétyles, ainsi que la distribution des substituants,
- le degré de polymérisation,
- la structure tridimensionnelle des polysaccharides

5.1 Composition chimique

5.1.1 Méthodes colorimétriques

Avant d'analyser la composition des extraits de polysaccharides, il est souvent intéressant d'estimer de manière globale la qualité de ses sucres constitutifs. Pour se faire, on peut utiliser des méthodes colorimétriques qui sont simples à élaborer et rapides. Ces méthodes permettent de doser globalement les sucres totaux et spécifiquement les acides uroniques.

Le principe des dosages colorimétriques se base sur la condensation par estérification d'un chromogène (Figure 28), avec des produits de déshydration des pentoses, hexoses et acides uroniques. En effet, dans les échantillons issus de la biomasse lignocellulosique, la lignine peut perturber le dosage des sucres. Pour réduire cette interférence, les sucres et les acides uroniques sont déshydratés en présence d'un chromogène qui se condense avec le dérivé furanique pour produire un chromophore dont l'absorption est déplacée dans le visible.

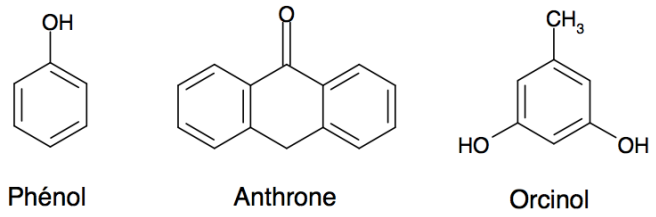


Figure 28. Réactifs les plus utilisés pour le dosage colorimétrique des hémicelluloses

L'efficacité du dosage colorimétrique est fonction de la nature du composé dosé et du chromogène utilisé. Ainsi, le phénol sera plus sensible à la quantification des pentoses, alors que l'anthrone conviendra mieux à la quantification des hexoses (Dubois et al., 1956). Concernant le dosage des acides uroniques, le réactif le plus sélectif est le m-hydroxydiphényle (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973).

Il est possible de quantifier simultanément les sucres et les acides uroniques, en corrigeant les interférences des sucres totaux dans le dosage des acides uroniques, et inversement, par la méthode de correction mise en évidence par Montreuil et al., (1963).

5.1.2 Méthodes chromatographiques

Pour déterminer la composition en sucre d'un polysaccharide, on procède le plus souvent par la séparation et la détection de ses monomères constitutifs obtenus par hydrolyse. L'hydrolyse des polysaccharides se fait par rupture des liaisons glycosidiques, de manière à obtenir les monomères préservés de toute dégradation secondaire. Les monomères sont par la suite analysés par chromatographie. Le principe de l'hydrolyse consiste à dépolymériser les polysaccharides isolés avec un acide fort. La dépolymérisation peut se faire avec des acides de forces et de concentrations diverses, sous des conditions expérimentales variées (température et temps de réaction). Notons que les enzymes peuvent également être utilisées pour l'hydrolyse des polysaccharides (Buchert et al., 1993).

La grande diversité des polysaccharides, et le large éventail de groupes fonctionnels (hydroxyle, amino, acétamino, phosphate etc.) compliquent le choix des phases stationnaires et mobiles, ce qui peut engendrer plusieurs difficultés lors de l'analyse chromatographique. Par ailleurs, l'analyse de sucres avec des détecteurs conventionnels nécessite très souvent une étape de dérivatisation due à l'absence de groupes chromophores ou fluorescents.

La chromatographie en phase gazeuse (GC) avec détection FID ou MS a largement été utilisée pour identifier les sucres. Avant l'analyse par GC, les glucides doivent être dérivés en acétate ou TMS (triméthylsilylation), à cause de leur hydrophilie, de leur polarité élevée et de de leur faible volatilité (Ayaz et al., 1998; Lein et al., 2002).

La chromatographie échangeuse d'anions haute performance (HPAEC) couplée à la détection ampérométrique pulsée (PAD) s'est avérée très efficace pour quantifier les mono et disaccharides

dans les échantillons naturels et les produits alimentaires (Bunte and Simon, 1999). En effet, il a été rapporté qu'une séparation précise des saccharides peut être obtenue en utilisant une phase stationnaire échangeuse d'anion et des solutions d'hydroxyde comme éluant. La PAD est une détection électrochimique qui repose sur l'oxydation des sucres sur une électrode en or par application d'un potentiel positif. Elle permet une sensibilité et une sélectivité élevée sans étape de dérivatisation. Cependant, la complexité et la diversité des composés contenus dans un échantillon naturel peut entraîner une coélution et un bruit excessif, ce qui peut entraver l'attribution et l'intégration des pics (Guignard et al., 2005). Guignard et al., ont également rapporté que la détection par spectrométrie de masse (MS) est hautement sélective et sensible. En revanche, la spectrométrie de masse présente une incompatibilité avec les éluants hautement alcalins utilisés en HPAEC. Pour conclure, Guignard et al., (2005) montrent que dans l'ensemble, les techniques de HPAEC-MS et HPAEC-PAD doivent être considérées comme des techniques complémentaires. Ces auteurs précisent que la méthode classique HPAEC-PAD peut être utilisée de manière routinière pour quantifier les saccharides, tandis que la méthode HPAEC-MS offre une plus grande sélectivité et constitue un outil de choix pour élucider les pics inconnus.

5.2 Analyses structurales

5.2.1 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR fait partie des techniques dites de « routine » généralement employées pour la caractérisation des hémicelluloses. C'est une méthode d'analyse physique, simple à mettre en œuvre, et qui n'utilise que de petite quantité de matière à analyser. Cette méthode repose sur les transitions entre les états vibrationnels et rationnels d'une molécule. Elle permet de déterminer la nature des fonctions présentes dans une molécule ou un ensemble de molécules en fonction de la longueur d'onde absorbée dans la gamme de l'infrarouge. Ainsi, Certains groupements ou liaisons, considérés comme marqueurs (fonction C=O des acides uroniques, liaisons C=C aromatiques), peuvent révéler la présence de catégories de molécules (hémicelluloses, pectines, lignine). La spectroscopie FTIR permet entre autres une analyse qualitative des monosaccharides qui constituent un polymère. À titre d'exemple, les bandes à 808 – 807 cm^{-1} et 760 – 774 cm^{-1} révèlent respectivement la présence des glucomannanes et des xylanes.

Tableau 7. Longueurs d'ondes des principales bandes du spectre IR du bois (Esteves et al., 2013)

Longueur d'onde (cm^{-1})	**Fonction**	**Type de vibration et d'élongation**
3400	O-H : alcools, phénols et acides	Vibration O-H
2970 - 2850	CH2, CH et CH3	Vibration C-H
1750 - 1720	C=O des esters, citons, aldéhydes et acides	Vibration C=O d'élongation, non conjuguée
1700 - 1750	C=O conjuguée et C=C	Vibration C=O conjuguée (élongation) et C=O (élongation)
1600	Cycle aromatique	Vibration du cycle benzénique
1515 - 1500	Cycle aromatique	Vibration du cycle benzénique
1460	CH	Déformation CH
1420	Cycle aromatique et CH	Squelette benzénique avec les déformations CH
1240 - 1330	Unités S et G de la lignine et OH	Élongation C-O et OH ; Vibration d'élongation antisymétrique des groupes acétyles
1140	Unité G de la lignine et C-O	Déformation C-H dans les unités G de la lignine et élongation C-O
1128	Unité S de la lignine et C-O	Déformation C-H dans les unités G de la lignine et élongation C-O
1025 - 1035	C-O-C	Déformation C-O-C
897	Élongation antisymétrique dans le cycle pyranose	Élongation dans le cycle pyranose

5.2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectrométrie RMN, est sans doute l'outil le plus abouti qui existe actuellement pour déterminer la structure d'un polysaccharide. C'est une méthode d'analyse physico-chimique non destructive, qui permet de doser et d'identifier chacun des monosaccharides constitutifs du polymère. Elle permet également de préciser l'enchaînement des monomères, les points d'embranchement, ainsi que les anoméries du polymère ou oligomère.

Le principe de la mesure de RMN est de mettre le moment μ en mouvement de précession autour d'un champ B0 puis de perturber ce mouvement avec un deuxième champ magnétique B1 appliqué pendant une petite durée. La trajectoire de μ est déviée, mais une fois B1 disparu, il retrouve son mouvement initial en présence de B0 seul. Ce retour à l'équilibre est accompagné d'une émission d'ondes électromagnétiques que l'on peut détecter : c'est le signal mesuré en RMN.

La RMN monodimensionnel du proton (RMN ^{1}H) donne la valeur des déplacements chimiques des protons et permet de les comparer avec ceux des bases de données. Elle informe aussi sur le nombre de résidu de monosaccharide grâce à l'intégration des protons anomériques pour des déplacements compris entre 4,4 et 5,4 ppm. Par ailleurs, les expériences COSY (COrrelation SpectroscopY) homonucléaires ^{1}H-^{1}H permettent de mesurer toutes les constantes de couplage entre les différents protons qui résonnent entre 3,2 et 4 ppm.

Les emplacements des liaisons sont ensuite élucidés par les déplacements chimiques des ^{13}C (RMN ^{13}C) résonnant entre 3 et 10 ppm, mais lorsqu'ils sont engagés dans des liaisons 1→x ils sont déblindés. En générale, les carbones anomériques des cycles sous forme pyranose portant un substituant axial résonnent vers 100 ppm, alors que les autres cycles pyranoses résonnent vers 105 ppm. Les formes furanoses sont caractéristiques des déplacements chimiques autour de 110 ppm (van Halbeek, 1994).

D'une manière générale, la structure d'une chaîne d'oligosaccharides ou de polysaccharides peut être déterminée avec précision par la méthode HMQC. Les expériences HMQC (Heteronuclear MultiQuantum Coherence) corrèlent chaque proton avec le carbone auquel il est rattaché. Cette méthode permet de déterminer la substitution (les points de branchement des monosaccharides), par l'identification des carbones et leurs déplacements chimiques, et l'observation d'un déblindage des carbones. En outre, les spectres HMQC donnent les couplages ^{1}H - ^{13}C et les constantes ^{3}J associées (^{3}J étant le couplage vicinal qui concerne deux atomes d'hydrogène portés par deux atomes de carbone liés entre eux). Il est alors possible de corréler les noyaux distants de 3 liaisons covalentes, notamment les constantes $^{3}J_{H1\text{-}Cx}$ où x est la position du carbone du monosaccharide voisin inclus dans la liaison glycosidique **(**Figure 29**)**. Ainsi, on peut préciser l'enchaînement des monosaccharides et donc, la séquence de l'oligosaccharide.

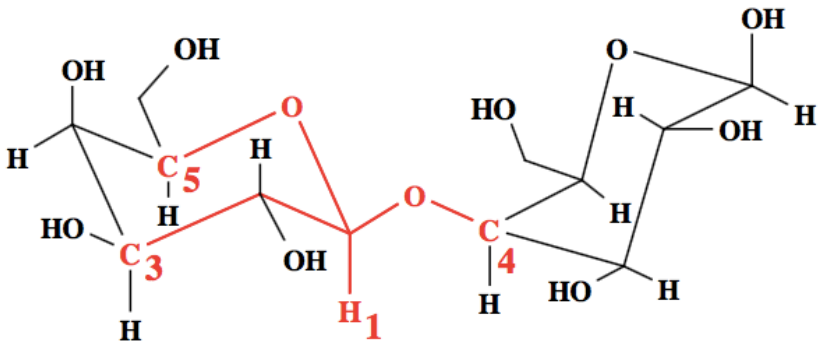


Figure 29. Schéma représentant les corrélations $^{3}J_{H,C}$ (en rouge) carbone / proton observées à partir du proton H-1 dans une expérience HMBC. La corrélation la plus intéressante est celle qui indique liaison glycosidique d'après Moine, (2005).

5.2.3 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

En raison de son influence directe sur les propriétés physiques d'un oligo / polymère telles que la solubilité, la viscosité etc., la masse moléculaire représente un paramètre clé d'une molécule. Il est donc nécessaire d'estimer la masse moléculaire moyennne et *a fortiori* la distribution de masse qui caractérise un polymère. Ainsi, l'une des techniques les plus efficaces et rependues pour ce type d'analyse est la chromatographie d'exclusion stérique. Cette technique est basée sur la séparation des macromolécules en fonction de leur masse moléculaire, plus précisément en fonction de leur volume hydrodynamique qui tient compte de la conformation des molécules. Plus les molécules en solution sont grosses, moins leur trajet dans la colonne est long et plus vite elles sont exclues. La calibration avec les dextranes ou des pullulanes de masses moléculaires connue (M_p) est préférée pour la séparation des hémicelluloses solubles. L'ajout d'un détecteur à diffusion de lumière à 3 angles, d'un détecteur réfractomètre et d'un viscomètre en sortie de colonne peut permettre de déterminer la masse molaire des oligo/polysaccharides injectés dans la colonne de chromatographie.

En outre, le couplage classique de la chromatographie d'exclusion stérique avec le détecteur MALLS (Multi-Angle Laser Light Scattering) s'est aussi avéré approprié pour la détermination de la masse molaire des polysaccharides solubles. Dans le système SEC-MALLS, les composés de poids moléculaire élevé sont d'abord fractionnés conformément à la leur volume hydrodynamique. Ensuite, l'intensité de la lumière dispersée et la concentration de la fraction éluée sont mesurées simultanément. Par conséquent, le poids moléculaire absolu de la fraction éluée est directement obtenu.

5.2.4 Spectroscopie de masse MALDI-TOF

La spectroscopie de masse de type Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) a été introduite depuis 1987 par Karas Hillenkamp (Karas and Hillenkamp, 1988). Cette technique permet de caractériser les oligo / polysaccharides de toutes origines. Elle donne notamment les informations précises sur la masse moléculaires des biopolymères polaires. Ces masses varient de plusieurs centaines à plusieurs centaines de milliers de Da. En effet, le choix d'une matrice est nécessaire à la séparation des hydrates de carbone qui constituent l'analyte, puisqu'elle joue un rôle important sur la production des ions, et sur la résolution du spectre. Les hydrates de carbone sont alors ionisés par le transfert d'un proton ou d'un ion (K^+, Na^+, NH_4^+, …). D'une manière générale, les hydrates de carbones et la matrice cocristalisent et un laser infrarouge vient par la suite ioniser le tout sous forme de gaz (Figure 30).

Les complexes chargés qui se sont formés sont ensuite envoyés et accélérés dans un tube muni généralement d'un analyseur à temps de type vol (Time Of Flight). Les échantillons se distinguent alors par leur vitesse, elle-même proportionnelle à leur masse (ratio m / z, avec z, la charge de l'ion). Ainsi, on obtient le spectre de masse des différents ions. Les saccharides ont tendance à s'ioniser par le sodium (Na^+), ce qui justifie le fait que la masse du sodium est ajoutée au calcul des masses molaires de chaque pic (Harvey, 1996). On peut alors avoir la composition osidique d'un oligo/polysaccharide ainsi que le nombre de ses groupements fonctionnels et ses substituants.

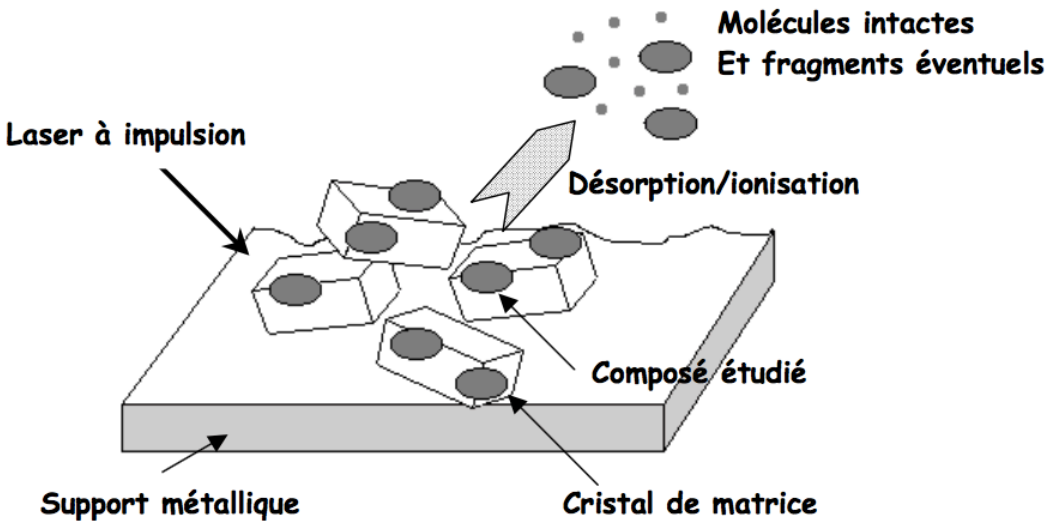


Figure 30. Principe de la technique MALDI d'après Moine, (2005)

6 Valorisation des hémicelluloses

La valorisation des hémicelluloses repose soit sur l'utilisation des monosaccharides qui les composent pour former des biocarburants ou des précurseurs utilisés dans l'industrie chimique, soit sur l'utilisation d'hémicelluloses oligo / polymériques. Ces dernières années, les hémicelluloses oligo / polymériques s'affirment comme des matières de base pour des nouvelles applications technologiques à grande échelle notamment dans les industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et énergétique.

6.1 Application en tant que biocarburants et molécules plateforme

Les hémicelluloses peuvent être valorisées sous forme de sucres simples par fermentation, déshydration ou hydrogénation catalytique pour produire une large gamme de molécules présentant une haute valeur ajoutée. Parmi les molécules plateformes obtenues, on trouve principalement le xylitol et le furfural, qui proviennent du xylose et le mannitol qui est issu du mannose.

Le furfural occupe une place capitale dans l'industrie chimique, car c'est le précurseur d'un grand panel de molécules telles que l'alcool furfurylique, les dérivés vinyliques, acryliques et méthacryliques. Le furfural est en effet largement utilisé après réduction pour produire de la résine furanique, qui est très intéressante pour sa bonne résistance aux hautes températures et au agents chimiques agressifs. (Gandini and Belgacem, 2002).

En outre, la fermentation des sucres obtenus par hydrolyse des hémicelluloses est souvent orientée vers la production d'acétone, de butanol ou encore de l'éthanol pouvant servir comme biocarburant (Asada et al., 2012; Carvalheiro et al., 2008).

6.2 Application en tant qu'agents actif et bioactif

Grâce à leur stabilité, leur biodégradabilité et leur absence de toxicité, les polymères naturels se conforment aux exigences de l'industrie pharmaceutique. Ainsi, les hémicelluloses ont fait l'objet d'un certain nombre d'études qui mettent en évidence leurs fonctions biologiques.

Récemment, les hémicelluloses ont été combinées au chitosane et à l'alcool polyvinylique, pour former les hydrogels dotés d'un pouvoir antibactérien (Hu et al., 2018). Il a été signalé que les galactoglucomannanes sont plus utilisées dans la synthèse des hydrogels par rapport aux xylanes, en

raison de leur richesse en groupement hydroxyles actifs, qui favorisent leurs modifications chimiques (Markstedt et al., 2017). Ainsi, les hydrogels à base de galactoglucomannanes ont été utilisés comme agent d'encapsulation afin de traiter les maladies de l'estomac. Dans la même optique, les galactoglucomannanes acétylées ont été fonctionnalisées pour préparer des microsphères d'hydrogels utilisées comme emballage dans l'industrie pharmaceutique. Dans cette étude, les microsphères ont été formées dans une émulsion d'huile dans l'eau eau lors de la réticulation covalente in-situ en hydrogel (Edlund and Albertsson, 2008).

De plus, les études sur l'utilisation des galactoglucomannanes, des glucomannanes et des xylanes pour l'élaboration des hydrogels comme matériaux de relargage de principe actifs ont été rapportées (Alvarez-Manceñido et al., 2008; Fan et al., 2008).

Certaines familles d'hémicelluloses ont démontré avec succès leur efficacité dans l'inhibition de la croissance de différentes tumeurs, en induisant l'activité du système immunitaire de l'hôte (Ebringerová et al., 1995; Kelly, 1999). À l'état natif, les hémicelluloses peuvent être utilisées pour accélérer le transit intestinal, et diminuer le taux de cholestérol dans le sang (Sindhurani and Rajamohan, 1998).

6.3 Application matériaux

Les polysaccharides dérivés du bois présentent un intérêt de plus en plus grandissant pour la production des matériaux thermoplastiques. Rappelons que les premiers thermoplastiques issus des polymères végétaux comme la nitrocellulose et l'acétate de cellulose, ont été obtenus par modification chimique de la cellulose.

Le pouvoir filmogène des hémicelluloses a été mis en évidence pour la première fois en 1949 par Smart & Whistler (Smart and Whistler, 1949). Outre la thermoplasticité et le caractère hydrophobe, la biodégradabilité, la solubilité, l'inflammabilité, etc., des fibres de polysaccharides sont modifiées par l'estérification, l'éthérification ou le greffage des groupements hydroxyles (Arvanitoyannis and Biliaderis, 1999; Baldwin et al., 2011). Dans cette optique, Moine a réalisé la synthèse de films plastiques par casting (*extrusion de film à plat)* des xylanes de bois après estérification en milieu homogène dans un mélange DMF / LiCl par le chlorure d'acide laurique (Moine, 2005). Par ailleurs, Hesse et al., ont élaborés des films autoportants par synthèse des esters à partir des xylanes de bois et d'acide 2-furane carboxylique, avec une réticulation du polymère par ajout de N,N-dicarbonyldiimidazaole dans le milieu réactionnel (Hesse et al., 2005).

Au cours de ces dernières années, la valorisation des hémicelluloses issues de la biomasse végétale, pour la production des films destinés à l'emballage dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique attire une attention accrue. Dans ce cas, l'utilisation de plastifiants tels que le sorbitol, le glycérol et le xylitol a été jugée nécessaire pour assurer la souplesse des films d'hémicelluloses. Selon ces applications, les films thermoplastiques à base d'hémicelluloses sont de bonne qualité, lorsqu'ils présentent une faible perméabilité à l'oxygène, ainsi qu'une bonne résistance mécanique et une faible transmittance lumineuse (Gröndahl et al., 2004; Mikkonen and Tenkanen, 2012).

7 Présentation de l'espèce utilisée dans cette étude : l'okoumé (*Aucoumea klaineana* Pierre)

L'okoumé est une essence arborée et à croissance rapide, qui appartient à la famille des Burséracées. Elle est principalement localisée au Gabon, au Congo, en Guinée Équatoriale et au sud du Cameroun (Figure 31). Sa durée de vie s'estime entre 150 et 200 ans, avec une croissance radiale moyenne d'environ 10 mm.an^{-1}, un tronc pouvant atteindre 2 m de diamètre au-dessus des contreforts et dépassant 50 m de hauteur (Brunck et al., 1990).

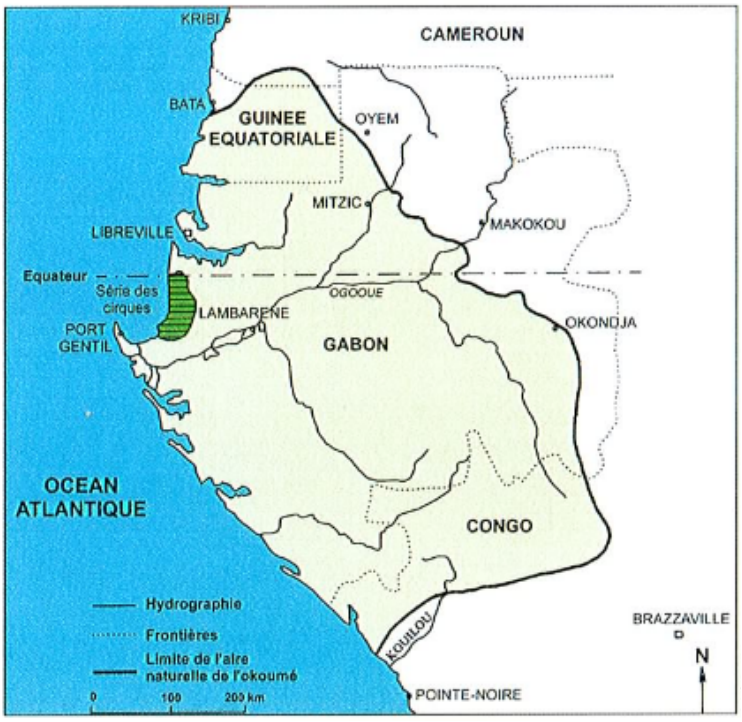


Figure 31. Aire naturelle de l'okoumé tracée par le (CTFT) (1975). D'après Brunck et al., (1990).

7.1 Écosystème de l'okoumé

Dans son aire naturelle, l'okoumé pousse à toutes les altitudes, et sur une variété des sols : les sols hydromorphes de fonds de vallées, et sur les sols ferrallitiques du Gabon. L'okoumé présente un comportement et un dynamisme particuliers qui semblent l'empêcher de pousser ailleurs qu'en Afrique centrale, bien que des petites parcelles expérimentales aient été plantées au Ghana, à Madagascar, en Indonésie, en Malaisie, au Surinam et en Guyane Française. Dans des peuplements dominés par l'okoumé, il existe une forte compétition pour la lumière qui débute à l'âge de 15 ans. Contrairement aux okoumés de gros diamètre, ceux de faible diamètre (20 à 40 cm) présentent une légère flexuosité (Brunck et al., 1990). Les limites de cette répartition ne sont jusqu'à présent pas clairement discutées. Les principales raisons seraient la pluviométrie et l'humidité.

7.2 Industrie du bois d'okoumé au Gabonais

Le Gabon présente une grande variété d'arbres, mais l'okoumé reste le premier des bois exploités, aussi bien en quantité qu'en durée (depuis 1896). Les autres espèces populaires sont l'ozigo (*Dacryodes büttneri*) ; le padouk (*Pterocarpus soyauxii*) ; le moabi (*Baillonella toxisperma*) ; le kevazingo (*Guilbourtia tessmannii*) ; le douka (*Tieghemella*) ; l'igaganga (*Dacryodes igaganga*) et le béli (Paraberlinia bifoliolata). Au Gabon, la part de production forestière s'élevait à 90 % pour un volume de production globale de 2, 8 millions de m^3 à 1 million de m^3 pour la période de 1980 à 2004 (Direction Générale des Eaux et Forêt, 2005). Cette production est passée de 2,7 millions en 2009 à 1,6 millions en 2015, soit une baisse de 45 % en lien avec la baisse du marché des bois tropicaux. En 2009, date d'entrée en vigueur de l'interdiction d'exporter les grumes, l'exportation de grumes représentait un volume de 1,6 millions de m^3 soit plus de 60 % de la production nationale (Figure 32).

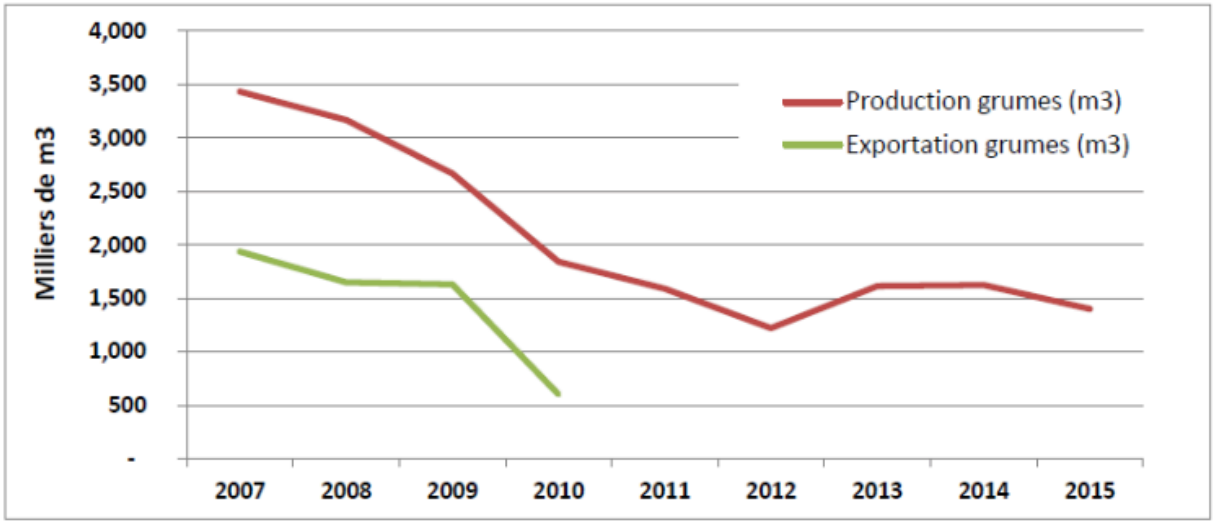


Figure 32. Évolution de la production et exportation de grumes au Gabon entre 2007 et 2014. (Ministère des Eaux et Forêts du Gabon, 2016). D'après Obame, (2020).

Depuis plusieurs années, l'activité industrielle du bois gabonais reste dominée par l'exploitation d'okoumé. Cette essence « phare » de l'industrie du bois gabonais représente environ 60 % de la production de grumes produites. On note que les caractéristiques de cette essence (rectitude, dimensions des grumes, faible densité, etc.) en font un bois très apte au déroulage. En effet, le bois d'okoumé est le plus souvent utilisé pour la production de placage et de contreplaqué. Son aspect attrayant fait qu'il est souvent utilisé de manière décorative comme placage de surface supérieure dans les panneaux et les meubles ou, sous forme solide dans les articles de grande valeur tels que boîtes pour cigares. Après l'interdiction d'exportation des grumes, la production de sciage est passée de 300 000 m^3 avant 2009 à 450 000 m^3 en 2014, alors que la production en placage se situe autour de 200 000 m^3 en 2014. Bien que la production en contreplaqué soit faible à l'échelle mondiale (40 000 m^3 exportés en 2014), le Gabon, reste le premier exportateur d'Afrique Centrale (TBE et DGI (2014).

7.3 Analyses et valorisations chimiques de l'okoumé

De nombreuses études ont été consacrées à l'analyse chimique de l'okoumé. L'essentiel de ses travaux repose sur la composition chimique et la valorisation de la résine. En effet, ses travaux ont montré que l'oléorésine de l'okoumé est constituée de 82 % de substances neutres, parmi lesquels cinq triterpènes. Le composé majoritaire est l'α-amyrine, un triterpène pentacyclique déjà rencontré dans les résines d'autres espèces de la famille des Burseraceae. Ce triterpène peut servir de fonction

protectrice contre les attaques microbiennes et insectes pathogènes (Guang-Yi et al., 1988; Rhourri-Frih, 2009; Tessier et al., 1982).

D'autres travaux réalisés sur le bois d'okoumé par Medzegue et al., (2013) par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Head Space GC-MS) ont mis en évidence neuf produits majoritaires déjà identifiés dans la résine d'okoumé. Ces composés représentent à eux seuls plus de 96% des composés volatils présents dans d'oléorésine d'okoumé ; ce sont : six mono terpènes (α-pinène ; β-pinène ; limonène : α-phéllandrène ; β-phéllandrène ; 3-carène), un alcool monoterpénique (α-terpinéol) et deux autres dérivés (p-cymène et eucalyptol).

Dongmo et al., (2010) se sont penchés sur les propriétés anti-radicalaire, anti-oxydante et anti-inflammatoire potentielles des huiles extraites de la résine d'okoumé. Les résultats obtenus ont mis en évidence une activité anti-radicalaire avec une valeur SC50 de 23,7 g / l, une activité anti-oxydante à la concentration de 9 g / l. Aucune activité anti-inflammatoire n'a été observée.

Par ailleurs, plusieurs travaux ont exploré la composition chimique de l'okoumé. Le Tableau 8 ci-dessous résume la répartition des polysaccharides, de la lignine et des extractibles rapportée par différents auteurs. Les résultats montrent que la teneur en extractible de l'okoumé varient fortement en fonction des solvants d'extraction. Les taux de lignine et de cellulose varient respectivement de 17,2 à 30 % et de 47,8 à 55,7 %, selon la méthode d'extraction utilisée. Quant aux proportions d'holocellulose et de cellulose dans l'okoumé, elles sont comprises entre 77 % et 80 % et 46 et 55 % respectivement.

Quelques travaux se sont focalisés sur l'analyse du potentiel chimique de l'okoumé, en vue d'une valorisation industrielle. Dans cette optique, (Safou-Tchiama et al., 2007a) a montré que les fibres de cellulose d'Okoumé modifiées à l'anhydride succinique présentent une faible réduction de leur index de cristallinité, ce qui confirme la stabilité supramoléculaire du bois d'okoumé estérifiées par cet ester cyclique une. Plus récemment, le test de Stiasny a montré que le bois d'okoumé présente une bonne réactivité avec le formaldéhyde, et révèle une possible valorisation des tanins d'okoumé pour la production des adhésifs verts (Anris Starlin Peguy et al., 2019).

Tableau 8. Teneur des principaux constituants chimiques de l'okoumé. D'après Obame, (2020)

Auteurs	Holocellulose (%)	Cellulose (%)	Lignine (%)		Extraits (%)		
	Duramen/Aubier	Duramen/Aubier	Duramen/Aubier	Cœur			
					Solvant organique		Eau
					Duramen/Aubier	Cœur	Duramen
Savard (1960)		47,9 – 45,4	31,4		1,4		0,9
Lal (1977)	77,2	47,8	21,3		12,6		4,2
Brunck et al. (1990)		46,0	30,0		1,5*		
Minkué M'Eny (2000)	75,4**	49,8**	28,3**		3,1*		3,0**
Safou-Tchiama (2005)	80,2 ± 0,3	55,7 ± 1,0	17,2 ± 1,0		2,1 ± 0,1*		
Medzegue (2007)	78,3 ± 2,0	47,8 ± 2	30,4 ± 0,7		2,0 ± 0,4		3,7 ± 0,8
Engozogho et al. (2019)						1,33 – 15,87	4,55 – 17,6
Ngwa (2020)			28,6 ± 0,1**	27,4 ± 0,1**		3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3

Les pourcentages sont exprimés ici en fonction de la masse totale de bois sec.

* indique l'ensemble des extractibles résultants de solvants organiques et de l'eau. Les trois premiers auteurs ont utilisé un mélange éthanol-benzène. Les valeurs de Minkué M'Eny ont été obtenues avec un mélange toluène/éthanol (2v/1v) ; celles de Safou Tchiama ont été obtenues avec un mélange toluène/acétone/méthanol (4v/1v /1v) suivi d'un lessivage à l'eau chaude ; celles de Ngwa quant à elles ont été obtenues avec de l'acétone pur.

**indique les résultats obtenus précisément sur l'aubier et le cœur de déroulage (bois juvénile), les autres auteurs ayant travaillé sur le duramen (bois mature) seul Minkué M'Eny a travaillé sur l'aubier.

Récemment, une étude réalisée dans le cadre des travaux de thèse de Obame, (2020) avait pour objectif d'initier un processus de valorisation des déchets des industries de transformation du bois du Gabon dans une optique de bioraffinerie. Cette étude visait la production de l'éthanol cellulosique et de la lignine comme coproduit, suite à un prétraitement, par explosion à la vapeur, à partir du bois d'okoumé. Afin de mieux comprendre l'impact du prétraitement sur le bois d'okoumé, la lignine et la cellulose du résidu solide après explosion à la vapeur ont été analysés. Dans un premier temps, il a été démontré qu'au cours du prétraitement le processus de délignification est lié principalement au clivage des liaisons β-O-4 mais qu'à forte sévérité des phénomènes de déshydratation/recondensation de la lignine se produisent. Deuxièmement, il a été observé que la cellulose des résidus solides après traitement présentait une augmentation de la cristallinité avec l'augmentation de la sévérité, et une diminution importante du DP de la cellulose pour les traitements réalisés après une imprégnation acide. L'hydrolyse enzymatique des résidus cellulosiques après explosion à la vapeur par *T. Reesei* a été étudiée. Les échantillons facilement hydrolysables ont été fermentés avec *Saccharomyces cerevisiae*. Ce procédé a permis d'estimer qu'il serait possible de produire l'équivalent de 11,9 kg d'éthanol à parir de 100 kg de biomasse d'okoumé (en masse sèche). Ce travail a ouvert des perspectives en matière de valorisation des coproduits de la transformation industrielle du bois d'okoumé dans une approche de bioraffinerie. Or la viabilité d'une bioraffinerie nécessite une valorisation de toutes les composantes de la biomasse, y compris les hémicelluloses ; d'où la pertinence de ce présent travail sur l'extraction et la purification des hémicelluloses.

Références bibliographiques

Adler, E., 1977. Lignin chemistry—past, present and future. Wood Sci. Technol. 11, 169–218. https://doi.org/10.1007/BF00365615

Aimar, P., Bacchin, A. maurel, 2010. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) [WWW Document]. Techniques de l'Ingénieur. URL https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/operations-unitaires-techniques-separatives-sur-membranes-42331210/filtration-membranaire-oi-nf-uf-mft-j2789/ (accessed 4.14.22).

Åkerholm, M., Salmén, L., 2001. Interactions between wood polymers studied by dynamic FT-IR spectroscopy. Polymer 42, 963–969. https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00434-1

Al-Rudainy, B., Galbe, M., Wallberg, O., 2020. From lab-scale to on-site pilot trials for the recovery of hemicellulose by ultrafiltration: Experimental and theoretical evaluations. Separation and Purification Technology 250, 117187. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117187

Alvarez-Manceñido, F., Landin, M., Lacik, I., Martínez-Pacheco, R., 2008. Konjac glucomannan and konjac glucomannan/xanthan gum mixtures as excipients for controlled drug delivery systems. Diffusion of small drugs. Int J Pharm 349, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.07.015

Anris Starlin Peguy, E., Bi Athomo Arsene, B., Marcia, V., Louis, D., Tchiama Rodrigue, S., Bertr, C., 2019. Extraction and Characterization of Aucoumea klaineana Pierre (Okoume) Extractives. Journal of Renewable Materials 7, 517–522. https://doi.org/10.32604/jrm.2019.04051

Arvanitoyannis, I., Biliaderis, C., 1999. Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00087-3

Asada, C., Sasaki, C., Uto, Y., Sakafuji, J., Nakamura, Y., 2012. Effect of steam explosion pretreatment with ultra-high temperature and pressure on effective utilization of softwood biomass. Biochemical Engineering Journal 60, 25–29. https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.013

Auxenfans, T., Buchoux, S., Larcher, D., Husson, G., Husson, E., Sarazin, C., 2014. Enzymatic saccharification and structural properties of industrial wood sawdust: Recycled ionic liquids pretreatments. Energy Conversion and Management 88, 1094–1103. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.027

Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G., 2017. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. Biotechnol Biofuels 10, 36. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z

Ayaz, F.A., Kadioğlu, A., Hayirlioğlu-Ayaz, S., 1998. Determination of Some Low Molecular Weight Carbohydrates in the Fruits of Wild Cherry Laurel (Laurocerasus officinalis Roem.) Using Gas Chromatography. Turkish Journal of Botany 22, 65–68.

Bacchin, P., 2005. Principes de base des Technologies à Membranes, in: 2ème Ecole d'Eté Franco-Maghrébine" Sciences et Technologies à Membranes ." Monastir, Tunisia.

Baldwin, E.A., Hagenmaier, R., Bai, J., 2011. Edible Coatings and Films to Improve Food Quality, Second Edition. CRC Press.

Ballesteros, I., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M., 2002. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (Brassica carinata) at different particule sizes. Process Biochemistry 38, 187–192. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00070-5

Barbat, A., Gloaguen, V., Moine, C., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Rogniaux, H., Ropartz, D., Krausz, P., 2008. Structural Characterization and Cytotoxic Properties of a 4- O -Methylglucuronoxylan from Castanea sativa. 2. Evidence of a Structure−Activity Relationship. J. Nat. Prod. 71, 1404–1409. https://doi.org/10.1021/np800207g

Bergström, B.I., 2000. The biology of Pandalus, in: Advances in Marine Biology. Academic Press, pp. 55–245. https://doi.org/10.1016/S0065-2881(00)38003-8

Bhat, K.M., Thulasidas, P.K., Maria Florence, E.J., Jayaraman, K., 2005. Wood durability of home-garden teak against brown-rot and white-rot fungi. Trees 19, 654. https://doi.org/10.1007/s00468-005-0429-0

Blanpain-Avet, P., Migdal, J.F., Bénézech, T., 2009. Chemical cleaning of a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate suspension—Characterization of hydraulic and chemical cleanliness. Journal of Membrane Science 337, 153–174. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.03.033

Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. Analytical Biochemistry 54, 484–489. https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1

Bochicchio, R., Reicher, F., 2003. Are hemicelluloses from Podocarpus lambertii typical of gymnosperms? Carbohydrate Polymers - CARBOHYD POLYM 53, 127–136. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00046-8

Bouvier, J.-M., Campanella, O.H., 2014. Extrusion Processing Technology: Food and Non-Food Biomaterials | Wiley [WWW Document]. Wiley.com. URL https://www.wiley.com/en-us/Extrusion+Processing+Technology%3A+Food+and+Non+Food+Biomaterials-p-9781444338119 (accessed 4.14.22).

Brett, C.T., Waldron, K.W., 2005. Biosynthesis of the hemicellulose, glucuronoxylan, in plant fibre, in: Dietary Fibre. Elsevier, pp. 86–90. https://doi.org/10.1533/9781845698195.2.86

Brunck, F., Grison, F., Maître, H.-F., 1990. L'okoumé Aucoumea klaineana Pierre : monographie. CIRAD-CTFT.

Buchert, J., Siika-aho, M., Bailey, M., Puls, J., Valkeajärvi, A., Pere, J., Viikari, L., 1993. Quantitative determination of wood-derived soluble oligosaccharides by HPLC. Biotechnol Tech 7, 785–790. https://doi.org/10.1007/BF00153745

Bunte, C., Simon, M., 1999. Bacterioplankton turnover of dissolved free monosaccharides in a mesotrophic lake. Limnol. Oceanogr. 44, 1862–1870. https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.8.1862

Carvalheiro, F., Duarte, L., Gírio, F., 2008. Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. Journal of scientific and industrial research 67, 849.

Chadni, M., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., Grimi, N., 2019. Microwave-assisted extraction of high-molecular-weight hemicelluloses from spruce wood. Comptes Rendus Chimie 22, 574–584. https://doi.org/10.1016/j.crci.2019.07.002

Chang, V.S., Holtzapple, M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. Applied Biochemistry and Biotechnology 84, 33.

Chemat, F., Abert-Vian, M., Fernandez, X., 2013. Microwave-Assisted Extraction of Essential Oils and Aromas, in: Chemat, F., Cravotto, G. (Eds.), Microwave-Assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, Food Engineering Series. Springer US, Boston, MA, pp. 53–68. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3_3

Clair, B., 2001. Etude des propriétés mécaniques et du retrait au séchage du bois à l'échelle de la paroi cellulaire: essai de compréhension du comportement macroscopique paradoxal du bois de tension à couche gélatineuse 186.

Condassamy, O., 2015. Valorisation d'une lignine alcaline industrielle: vers le développement de nouveaux synthons et oligomères bio-sourcés issus de la lignine 244.

Conner, L., 1986. Kinetic Modeling of Hardwood Prehydrolysis. Part III. Water and Dilute Acetic Acid Prehydrolysis of Southern Red Oak. Wood and fiber science 18, 16.

Curling, S.F., Fowler, P.A., Hill, C.A.S., 2007. Development of a method for the production of hemicellulosic gels from Sitka spruce. Carbohydrate Polymers 69, 673–677. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.02.003

Das, N.N., Das, S., Dutt, A.S., Roy, A., 1981. Lignin-xylan ester linkage in jute fiber (corchorus capsularis). https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85597-4

Deloule, V., Chirat, C., Boisset, C., Toussaint, B., Chroboczek, J., 2017. Production of hemicellulose oligomers from softwood chips using autohydrolysis followed by an enzymatic post-hydrolysis. Holzforschung 71, 575–581. https://doi.org/10.1515/hf-2016-0181

Dhabhai, R., Chaurasia, S.P., Dalai, A.K., 2013. Effect of Pretreatment Conditions on Structural Characteristics of Wheat Straw. Chemical Engineering Communications 200, 1251–1259. https://doi.org/10.1080/00986445.2012.743895

Dirol, D., Diglise, X., 2000. Durabilité des bois - Daniele Dirol , Xavier Diglise - Librairie Eyrolles.

Dongmo, P.M.J., Tchoumbougnang, F., Ndongson, B., Agwanande, W., Sandjon, B., Zollo, P.H.A., Menut, C., 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of Canarium schweinfurthii and Aucoumea klaineana (Burseraceae) growing in Cameroon 6.

D'Souza, N.M., Mawson, A.J., 2005. Membrane cleaning in the dairy industry: a review. Crit Rev Food Sci Nutr 45, 125–134. https://doi.org/10.1080/10408690490911783

Dubois, F., 1997. Modélisation du comportement mécanique des milieux viscoélastiques fissurés : application au matériau bois. undefined.

Ebringerová, A., Heinze, T., 2000. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. Macromolecular Rapid Communications 21, 542–556. https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000601)21:9<542::AID-MARC542>3.0.CO;2-7

Ebringerová, A., Hromádková, Z., Hríbalová, V., 1995. Structure and mitogenic activities of corn cob heteroxylans. Int J Biol Macromol 17, 327–331. https://doi.org/10.1016/0141-8130(96)81840-x

Edlund, U., Albertsson, A.-C., 2008. A Microspheric System: Hemicellulose-based Hydrogels. Journal of Bioactive and Compatible Polymers 23, 171–186. https://doi.org/10.1177/0883911507088400

Erdmann, J., 1866. Ueber die Concretionen in den Birnen. Justus Liebigs Annalen der Chemie 138, 1–19. https://doi.org/10.1002/jlac.18661380102

Esteves, B., Velez Marques, A., Domingos, I., Pereira, H., 2013. Chemical changes of heat treated pine and eucalypt wood monitored by FTIR. Maderas, Cienc. tecnol. 0–0. https://doi.org/10.4067/S0718-221X2013005000020

Fan, J., Wang, K., Liu, M., He, Z., 2008. In vitro evaluations of konjac glucomannan and xanthan gum mixture as the sustained release material of matrix tablet. Carbohydrate Polymers 73, 241–247. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.027

Fengel, D., Wegener, G., 2003. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.

Gabrielii, I., Gatenholm, P., 1998. Preparation and properties of hydrogels based on hemicellulose. Journal of Applied Polymer Science 69, 1661–1667. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980822)69:8<1661::AID-APP19>3.0.CO;2-X

Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Appl Microbiol Biotechnol 59, 618–628. https://doi.org/10.1007/s00253-002-1058-9

Gandini, A., Belgacem, N., 2002. Recent Contributions to the Preparation of Polymers Derived from Renewable Resources. Journal of Polymers and the Environment 10, 105–114. https://doi.org/10.1023/A:1021172130748

Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Łukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technology 101, 4775–4800. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088

Giummarella, N., Pu, Y., Ragauskas, A.J., Lawoko, M., 2019. A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. Green Chem. 21, 1573–1595. https://doi.org/10.1039/C8GC03606C

Gröndahl, M., Eriksson, L., Gatenholm, P., 2004. Material Properties of Plasticized Hardwood Xylans for Potential Application as Oxygen Barrier Films. Biomacromolecules 5, 1528–1535. https://doi.org/10.1021/bm049925n

Guang-Yi, L., Bates, C.D., Gray, A.I., Waterman, P.G., 1988. The Volatile Oil of the Oleo Resin of Aucoumea klaineana Collected in Gabon1. Planta Med 54, 368–369. https://doi.org/10.1055/s-2006-962467

Guignard, C., Jouve, L., Bogéat-Triboulot, M.B., Dreyer, E., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., 2005. Analysis of carbohydrates in plants by high-performance anion-exchange chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1085, 137–142. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.068

Gurjanov, O.P., Ibragimova, N.N., Gnezdilov, O.I., Gorshkova, T.A., 2008. Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: Isolation and identification. Carbohydrate Polymers 72, 719–729. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.10.017

Hägglund, E., Lindberg, B., Mcpherson, J., Sillén, L.G., Thorell, B., 1956. Dimethylsulphoxide, a Solvent for Hemicelluloses. https://doi.org/10.3891/ACTA.CHEM.SCAND.10-1160

Hansson, J.-Å., Hartler, N., 1970. Alkaline Degradation of Pine Glucomannan 24, 54–59. https://doi.org/10.1515/hfsg.1970.24.2.54

Harvey, D.J., 1996. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry of oligosaccharides and glycoconjugates. J Chromatogr A 720, 429–446. https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00307-x

Hesse, S., Liebert, T., Heinze, T., 2005. Studies on the Film Formation of Polysaccharide Based Furan-2-Carboxylic Acid Esters. Macromolecular Symposia 232, 57–67. https://doi.org/10.1002/masy.200551407

Hoang, Q., Lam, Bigot, Y.L., Delmas, M., Avignon, G., 2001. A new procedure for the destructuring of vegetable matter at atmospheric pressure by a catalyst/solvent system of formic acid/acetic acid.Applied to the pulping of triticale straw.

Hu, G., Heitmann, J.A., Rojas, O.J., 2008. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues 25.

Hu, L., Du, M., Zhang, J., 2018. Hemicellulose-Based Hydrogels Present Status and Application Prospects: A Brief Review. OJF 08, 15–28. https://doi.org/10.4236/ojf.2018.81002

Iiyama, K., Lam, TBT., Stone, B.A., 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. Plant Physiol 104, 315–320.

Innocent, C., Pontie, M., Larchet, C., 2008. ”Membranes et Electrochimie”, Cahier du CFM n° 4. CFM, Coordonnateurs : M. PONTIE, C. LARCHET / Comité de rédaction : C. INNOCENT.

Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1992. Effect of molecular size on physical properties of wheat arabinoxylan. J. Agric. Food Chem. 40, 561–568. https://doi.org/10.1021/jf00016a006

Johansson, M.H., Samuelson, O., 1977. Reducing end group in birch xylan and their alkaline degradation. Wood science and technology.

Karas, Michael., Hillenkamp, Franz., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal. Chem. 60, 2299–2301. https://doi.org/10.1021/ac00171a028

Kelly, G.S., 1999. Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. Altern Med Rev 4, 96–103.

Kolpak, F.J., Blackwell, J., 1976. Determination of the Structure of Cellulose II. Macromolecules 9, 273–278. https://doi.org/10.1021/ma60050a019

Krawczyk, H., Persson, T., Andersson, A., Jönsson, A.-S., 2008. Isolation of hemicelluloses from barley husks. Food and Bioproducts Processing 86, 31–36. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2007.10.018

Laine, C., 2005. Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. undefined.

Lapierre, C., Jouin, D., Monties, B., 1989. On the molecular origin of the alkali solubility of Gramineae lignins. Phytochemistry 28, 1401–1403. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97755-0

Lein, S., Van Boven, M., Holser, R., Decuypere, E., Flo, G., Lievens, S., Cokelaere, M., 2002. Simultaneous determination of carbohydrates and simmondsins in jojoba seed meal (Simmondsia chinensis) by gas chromatography. Journal of Chromatography A 977, 257–264. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01410-3

Leppänen, K., Spetz, P., Pranovich, A., Hartonen, K., Kitunen, V., Ilvesniemi, H., 2011. Pressurized hot water extraction of Norway spruce hemicelluloses using a flow-through system. Wood Science and Technology 45, 223–236. https://doi.org/10.1007/s00226-010-0320-z

Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., Keegstra, K., 2006. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. Current Opinion in Plant Biology 9, 621–630. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.09.009

Li, Z., Qin, M., Xu, C., Chen, X., 2013. Hot Water Extraction of Hemicelluloses from Aspen Wood Chips of Different Sizes. BioResources 8, 5690–5700. https://doi.org/10.15376/biores.8.4.5690-5700

Lundqvist, J., Teleman, A., Junel, L., Zacchi, G., Dahlman, O., Tjerneld, F., Stålbrand, H., 2002. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (Picea abies). Carbohydrate Polymers 48, 29–39. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(01)00210-7

Lyu, H., Chen, K., Yang, X., Younas, R., Zhu, X., Luo, G., Zhang, S., Chen, J., 2015. Two-stage nanofiltration process for high-value chemical production from hydrolysates of lignocellulosic biomass through hydrothermal liquefaction. Separation and Purification Technology 147, 276–283. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.04.032

Lyu, H., Fang, Y., Ren, S., Chen, K., Luo, G., Zhang, S., Chen, J., 2016. Monophenols separation from monosaccharides and acids by two-stage nanofiltration and reverse osmosis in hydrothermal liquefaction hydrolysates. Journal of Membrane Science 504, 141–152. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.12.048

Manders, W.F., 1986. Solid-state 13C NMR determination of the syringylguaiacyl ratio in hardwood (No. NBS IR 86-3380). National Bureau of Standards, Gaithersburg, MD. https://doi.org/10.6028/NBS.IR.86-3380

Mares, D.J., Stone, B.A., 1973. Studies on wheat endosperm. II. Properties of the wall components and studies on their organization in the wall. Australian journal of biological sciences.

Markstedt, K., Xu, W., Liu, J., Xu, C., Gatenholm, P., 2017. Synthesis of tunable hydrogels based on O-acetyl-galactoglucomannans from spruce. Carbohydrate Polymers 157, 1349–1357. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.009

Mason, W.H., 1926. Process and apparatus for disintegration of wood and the like. US1578609A.

McCormick, C.L., Callais, P.A., Hutchinson, B.H., 1985. Solution studies of cellulose in lithium chloride and N,N-dimethylacetamide. Macromolecules 18, 2394–2401. https://doi.org/10.1021/ma00154a010

Medzegue, M.J., 2007. Etude comparative des bois d'okoumé (Aucoumea Klaineana P.) issus des plantations et de la forêt naturelle : anatomie, durabilité naturelle (These de doctorat). Bordeaux 1.

Medzegue, M.J., Stokes, A., Gardrat, C., Grelier, S., 2013. Analysis of volatile compounds in Aucoumea klaineana oleoresin by static headspace/gas chromatography/mass spectrometry. undefined.

Meng, F., Chae, S.-R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.-S., Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. Water Res 43, 1489–1512. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.044

Mikkonen, K.S., Tenkanen, M., 2012. Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. Trends in Food Science & Technology 28, 90–102. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.012

Moine, C., 2005. Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois : Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes 284.

Moine, C., Krausz, P., Chaleix, V., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Gloaguen, V., 2007. Structural Characterization and Cytotoxic Properties of a 4- O -Methylglucuronoxylan from Castanea sativa. J. Nat. Prod. 70, 60–66. https://doi.org/10.1021/np060354p

Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., Scheppler, N., 1963. [methods of study of the structure of glycoproteins]. J Pharm Belg 18, 529–546.

Navi, P., Heger, F., 2005. Comportement thermo-hydromécanique du bois: Applications technologiques et dans les structures, 1er édition. ed. PPUR, Lausanne.

N'Diaye, S., 1996. Fractionnement de la matière végétale : mise au point d'un procédé thermo-mécano-chimique et modélisation du fonctionnement du réacteur bi-vis. undefined.

Newman, R.H., Hemmingson, J.A., 1998. Interactions between locust bean gum and cellulose characterized by13C n.m.r. spectroscopy. Carbohydrate Polymers 36, 167–172. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00021-6

Nishimura, H., Kamiya, A., Nagata, T., Katahira, M., Watanabe, T., 2018. Direct evidence for α ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. Sci Rep 8, 6538. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24328-9

Obame, S.N., 2020. Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur des coproduits de l'industrie du bois d'okoumé : vers une production d'éthanol cellulosique (phdthesis). Université de Lorraine.

Obame, S.N., Ziegler-Devin, I., Safou-Tchima, R., Brosse, N., 2019. Homolytic and Heterolytic Cleavage of β-Ether Linkages in Hardwood Lignin by Steam Explosion. J. Agric. Food Chem. 67, 5989–5996. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01744

Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J.A., 1987. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences 321, 523–536.

Palm, M., Zacchi, G., 2003. Extraction of Hemicellulosic Oligosaccharides from Spruce Using Microwave Oven or Steam Treatment. Biomacromolecules 4, 617–623. https://doi.org/10.1021/bm020112d

Panthapulakkal, F.S., 2014. Microwave Assisted Extraction of Xylan (Thesis).

Pérez, S., Mazeau, K., 2004. Conformations, Structures, and Morphologies of Celluloses, in: Dumitriu, S. (Ed.), Polysaccharides. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420030822.ch2

Persson, T., Jönsson, A.-S., 2010. Isolation of hemicelluloses by ultrafiltration of thermomechanical pulp mill process water—Influence of operating conditions. Chemical Engineering Research and Design 88, 1548–1554. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2010.04.002

Pinelo, M., Jonsson, G., Meyer, A., 2009. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. Separation and Purification Technology 70, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.08.010

Rabiller- Baudry, M., 2009. Nettoyage et décolmatage des membranes de filtration [WWW Document]. Techniques de l'Ingénieur. URL https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/operations-unitaires-techniques-separatives-sur-

membranes-42331210/nettoyage-et-decolmatage-des-membranes-de-filtration-j2797/ (accessed 4.14.22).
Rahardjo, A., Azmi, R., Muharja, M., Marta, H., Widjaja, A., 2021. Pretreatment of Tropical Lignocellulosic Biomass for Industrial Biofuel Production : A Review. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 1053, 012097. https://doi.org/10.1088/1757-899X/1053/1/012097
Ramaswamy, H.S., Marcotte, M., 2005. Food Processing: Principles and Applications. CRC Press, Boca Raton. https://doi.org/10.1201/9780203485248
Remigy, J.-C., Desclaux, S., 2007. Filtration membranaire (OI, NF, UF) [WWW Document]. Techniques de l'Ingénieur. URL https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/environnement-securite-th5/procedes-de-traitement-des-eaux-potables-industrielles-et-urbaines-42318210/filtration-membranaire-oi-nf-uf-w4090/ (accessed 4.14.22).
Rhourri-Frih, B., 2009. Analyse, classification et caractérisation de résines d'origine végétale par chromatographie et spectrométrie de masse (These de doctorat). Orléans.
Safou-Tchiama, R., 2005. Caractérisation physico-chimique stabilité supramoléculaire et réactivité chimique de quelques essences tropicales (These de doctorat). Bordeaux 1.
Safou-Tchiama, R., de Jéso, B., Akagah, A.G., Sèbe, G., Pétraud, M., 2007. A preliminary survey of the interfacial bonding of some tropical hardwoods towards succinic anhydride and 2-octen-1-yl succinic anhydride molecules: Impact of lignin and carbohydrate polymers structure on the chemical reactivity. Industrial Crops and Products 26, 173–184. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.03.001
Schlesinger, R., Götzinger, G., Sixta, H., Friedl, A., Harasek, M., 2006. Evaluation of alkali resistant nanofiltration membranes for the separation of hemicellulose from concentrated alkaline process liquors. Desalination 192, 303–314. https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.05.031
Schultz, T.P., Templeton, M.C., Biermann, C.J., McGinnis, G.D., 1984. Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks, and sugar cane bagasse. J. Agric. Food Chem. 32, 1166–1172. https://doi.org/10.1021/jf00125a058
Sen, D., Gosling, A., Stevens, G.W., Bhattacharya, P.K., Barber, A.R., Kentish, S.E., Bhattacharjee, C., Gras, S.L., 2011. Galactosyl oligosaccharide purification by ethanol precipitation. Food Chemistry 128, 773–777. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.076
Shi, J., Pu, Y., Yang, B., Ragauskas, A., Wyman, C.E., 2011. Comparison of microwaves to fluidized sand baths for heating tubular reactors for hydrothermal and dilute acid batch pretreatment of corn stover. Bioresource Technology 102, 5952–5961. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.027
Simangunsong, E., Ziegler-Devin, I., Chrusciel, L., Girods, P., Wistara, N.J., Brosse, N., 2020. Steam Explosion of Beech Wood: Effect of the Particle Size on the Xylans Recovery. Waste Biomass Valor 11, 625–633. https://doi.org/10.1007/s12649-018-0522-4
Sindhurani, J.A., Rajamohan, T., 1998. Hypolipidemic effect of hemicellulose component of coconut fiber. Indian J Exp Biol 36, 786–789.
Sjöström, E., 1993. WOOD POLYSACCHARIDES, in: Wood Chemistry. Elsevier, pp. 51–70. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092589-9.50007-3
Sjöström, E., Westermark, U., 1999. Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution, in: Sjöström, Eero, Alén, R. (Eds.), Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking, Springer Series in Wood Science. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03898-7_1
Smart, C.L., Whistler, R.L., 1949. Films from Hemicellulose Acetates. Science 110, 713–714. https://doi.org/10.1126/science.110.2870.713.b

Song, T., Pranovich, A., Holmbom, B., 2013. Separation of polymeric galactoglucomannans from hot-water extract of spruce wood. Bioresource Technology 130, 198–203. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.149

Song, T., Pranovich, A., Sumerskiy, I., Holmbom, B., 2008. Extraction of galactoglucomannan from spruce wood with pressurised hot water 62, 659–666. https://doi.org/10.1515/HF.2008.131

Sparr Eskilsson, C., Björklund, E., 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. Journal of Chromatography A, Preconcentration and Sample Enrichment Techniques 902, 227–250. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00921-3

Steinmetz, V., 2020. Procédés membranaires et biotechnologiques pour la valorisation de ressources végétales résiduaires : cas de la lignine thermomécanique (phdthesis). Université de Strasbourg.

Sukhbaatar, B., Hassan, E.B., Kim, M., Steele, P., Ingram, L., 2014. Optimization of hot-compressed water pretreatment of bagasse and characterization of extracted hemicelluloses. Carbohydrate Polymers 101, 196–202. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.027

Sun, R., Tomkinson, J., 2000. Fractionation and Characterization of Water-soluble Hemicelluloses and Lignin from Steam-exploded Birchwood. International Journal of Polymeric Materials 45, 1–19. https://doi.org/10.1080/00914030008034866

Swennen, K., Courtin, C., Vanderbruggen, B., Vandecasteele, C., Delcour, J., 2005. Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. Carbohydrate Polymers 62, 283–292. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.001

Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stålbrand, H., Dahlman, O., 2000. Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing 1H and 13C NMR spectroscopy. Carbohydrate Research 329, 807–815. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00249-4

Teleman, A., Nordström, M., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O., 2003. Isolation and characterization of O-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. Carbohydrate Research 338, 525–534. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00491-3

Tessier, A., Delaveau, P., Piffault, N., 1982. Oléo-Résine d'Aucoumea klaineana. Planta Med 44, 215–217. https://doi.org/10.1055/s-2007-971450

Thulasidas, P.K., Bhat, K.M., 2007. Chemical extractive compounds determining the brown-rot decay resistance of teak wood. Holz Roh Werkst 65, 121–124. https://doi.org/10.1007/s00107-006-0127-7

Timell, T.E., 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci.Technol. 1, 45–70. https://doi.org/10.1007/BF00592255

Tsubaki, S., Azuma, J.-I., Yoshimura, T., Maitani, M.M., Suzuki, E., Fujii, S., Wada, Y., 2016. Chapter 5 - Microwave-Induced Biomass Fractionation, in: Mussatto, S.I. (Ed.), Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery. Elsevier, Amsterdam, pp. 103–126. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00005-0

van Halbeek, H., 1994. [9] 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of carbohydrate chains of glycoproteins, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 132–168. https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)30011-9

Wang, Y., Azhar, S., Lindström, M.E., Henriksson, G., 2015. Stabilization of Polysaccharides During Alkaline Pre-Treatment of Wood Combined with Enzyme-Supported Extractions in a Biorefinery. Journal of Wood Chemistry and Technology 35, 91–101. https://doi.org/10.1080/02773813.2013.875041

Wen, J.-L., Xiao, L.-P., Sun, Y.-C., Sun, S.-N., Xu, F., Sun, R.-C., Zhang, X.-L., 2011. Comparative study of alkali-soluble hemicelluloses isolated from bamboo (Bambusa rigida). Carbohydrate Research 346, 111–120. https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.10.006

Wen, L. f., Chang, K. c., Brown, G., Gallaher, D. d., 1988. Isolation and Characterization of Hemicellulose and Cellulose from Sugar Beet Pulp. Journal of Food Science 53, 826–829. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb08963.x

Willför, S., Sundberg, K., Tenkanen, M., Holmbom, B., 2008. Spruce-derived mannans – A potential raw material for hydrocolloids and novel advanced natural materials. Carbohydrate Polymers 72, 197–210. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.006

Wojtasz-Mucha, J., Hasani, M., Theliander, H., 2017. Hydrothermal pretreatment of wood by mild steam explosion and hot water extraction. Bioresour Technol 241, 120–126. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.061

Wu, M.M., Chang, K., Gregg, D.J., Boussaid, A., Beatson, R.P., Saddler, J.N., 1999. Optimization of steam explosion to enhance hemicellulose recovery and enzymatic hydrolysis of cellulose in softwoods. Applied Biochemistry and Biotechnology 77, 47–54. https://doi.org/10.1385/abab:77:1-3:47

Xue, B.-L., Wen, J.-L., Xu, F., Sun, R.-C., 2012. Structural characterization of hemicelluloses fractionated by graded ethanol precipitation from Pinus yunnanensis. Carbohydrate Research 352, 159–165. https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.02.004

Zaouk, L., 2018. Récupération d'exopolymères issus de surnageants de culture de Porphyridium cruentum par techniques membranaires : étude de la filtrabilité des solutions sur une membrane organique et caractérisation du colmatage (These de doctorat). Nantes.

Zemek, J., Košíková, B., Augustín, J., Joniak, D., 1979. Antibiotic properties of lignin components. Folia Microbiol 24, 483–486. https://doi.org/10.1007/BF02927180

Ziegler-Devin, I., Chrusciel, L., Brosse, N., 2021. Steam Explosion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Mini-Review of Theorical and Experimental Approaches. Front. Chem. 9, 705358. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.705358.

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1 Matière première

Les échantillons utilisés dans cette étude ont été récoltés sur des billons d'okoumé issus de de la concession forestière sous aménagement durable (CFAD) de la Société Équatoriale d'Exploitation Forestière (SEEF) à Nzamaligué (Nord-Ouest du Gabon). L'aubier d'okoumé provient des déchets de dosses, alors que le duramen interne provient des rejets des cœurs de déroulage.

Les échantillons ont été gardés à l'abri de l'humidité et des attaques fongiques durant toute l'étude. Avant toute expérience, les échantillons ont d'abord été débités en planche d'environ 40 cm de long, puis délignés et débités pour obtenir les plaquettes d'environ 2 cm. Ensuite, les échantillons ont été transformés en sciure à l'aide d'un broyeur à fléaux (RETSCH SK 100) muni d'un tamis de 3 mm. La sciure broyée a été tamisée avec un tamiseur de type ENDECOTTS LTD® de manière à obtenir deux classes de granulométrie définies dans cette étude : 2 mm et 0,16 mm. La sciure retenue a ensuite été stockée dans des sacs opaques en polyéthylène à température ambiante.

2 Démarche globale

L'objectif de ce travail est d'extraire les hémicelluloses des coproduits de la transformation industrielle du bois d'okoumé du Gabon. Pour se faire, trois principales étapes sont nécessaires :

La première étape correspond au prétraitement de la biomasse. Au cours de cette étape, la sciure de bois est soumise à des prétraitements mécaniques, chimiques ou thermiques afin de déconstruire la paroi cellulaire du bois, et par la suite faciliter l'extraction des hémicelluloses.

La deuxième étape correspond à une séparation solide / liquide et / ou liquide / liquide. Elle consiste à séparer les fractions solides et liquides obtenues directement après prétraitement des sciures dans un premier temps, et à purifier les hémicelluloses solubles à l'aide d'une précipitation par un solvant organique ou l'aide d'un procédé membranaire dans un deuxième temps.

La troisième étape consiste en une série d'analyses physico-chimiques des hémicelluloses obtenues, afin d'évaluer leur potentiel.

Mais auparavant, il est tout d'abord nécessaire de déterminer la composition chimique du lot d'okoumé utilisé dans cette étude

3 Composition chimique de l'okoumé et de ses hémicelluloses

3.1 Mesure du taux de matière sèche

La teneur en matière sèche des échantillons a été déterminée à l'aide d'un dessiccateur infra-rouge Kern MRS 120-3. Environs 1 g de sciure de bois a été placé dans une coupelle en aluminium. Le tout a été placé dans le dessiccateur et séché à 105 °C jusqu'à stabilisation de la masse (entre 10 - 15 min). La teneur en matière sèche est directement lue sur l'appareil. Cette opération a été effectuée avant chaque analyse afin de déterminer la masse sèche des échantillons.

3.2 Les extractibles

Les extractibles correspondent essentiellement aux composés de faibles masses moléculaires, hydrophiles ou lipophiles, qui peuvent être extraits par des solvants. Ce sont des composés non structuraux du bois. Le taux d'extractibles du cœur et de l'aubier d'okoumé a été déterminé selon le protocole décrit ci-dessous.

Un ballon de 500 ml a été séché à vide dans une étuve de marque BINDER, à 105 °C pendant 24 h. Il a ensuite été refroidi dans un dessiccateur muni de pentaoxyde de phosphore (P_2O_5). La masse anhydre du ballon a été ensuite mesurée (M_0). Une masse de 5 g de sciure préalablement séchée à 105 °C pendant 16 h a été extraite au moyen d'un soxlhet en utilisant un mélange Toluène/Acétone/Méthanol (4v / 1v / 1v). Les solvants ont été utilisés sans purification. A la fin de l'extraction, les solvants contenant les extractibles ont été concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à évaporation complète de ces solvants. La masse du ballon séché et contenant les extraits (M_{b+e}) est mesurée. On calcule le taux d'extractibles selon l'équation ci-dessous :

$$M_{ext}(\%)=\frac{M_{b+e} - M_0}{M_s} \times 100$$

Avec, M_o la masse du ballon vide, M_{b+e} est la masse du ballon avec les extractibles et Ms la masse de sciure sèche avant l'extraction.

Le filtrat complété à 100 mL est d'abord homogénéisé vigoureusement puis dilué et filtré à 0,45 µm avant d'être analysé par HPAEC-PAD.

3.3 Lignine de klason

Après extraction au soxlhet, la sciure est récupérée et séchée à 105 °C pour déterminer le taux de lignine de Klason du bois d'okoumé.

L'extraction de la lignine de Klason a été réalisée à l'aide de la méthode normalisée TAPPI 222 (TAPPI, 2006) qui utilise de l'acide sulfurique (H_2SO_4) à 72 %. Environ exactement 175 mg de biomasse sèche, extraite, broyée et tamisée ont été pesés dans un tube à centrifuger en polypropylène. Puis 1,5 mL d'H_2SO_4 à 72 % sont ajoutés. Ce mélange est maintenu à 30 °C dans un bain marie maintenu sous agitation mécanique pendant 1h, une agitation manuelle et régulière à l'aide d'une tige en verre est assurée. Puis, 42 mL d'eau permutée sont ajoutés pour atteindre une concentration massique en H_2SO_4 de 4 %. Le mélange est placé dans un autoclave à 121 °C (environ 1,04 bars de pression relative) pendant 1 h. Après refroidissement, le mélange est filtré sous vide modéré à l'aide de creusets de Goosh contenant des filtres en verre. Le creuset contenant la lignine est placé à l'étuve à 105 °C pendant 24 h et, il est pesé après refroidissement à température ambiante dans un dessiccateur contenant du P_2O_5. Le pourcentage de lignine de Klason est déterminé par l'équation ci - dessous :

$$\text{Lignine } (\%) = \frac{M_{LK}}{M_i} \times 100$$

Avec, M_{LK} : Masse sèche de lignine Klason. M_i : Masse sèche de sciure extraite.

La totalité de la fraction liquide riche en monosaccharides est récupérée et complétée à 100 mL avec de l'eau ultrapure, et stockée à -5 °C avant analyse chromatographie ionique (HPEAC-PAD : Dionex ICS-30000).

3.4 Composition en monosaccharides

Le dosage des monosaccharides et des acides uroniques est réalisé par chromatographie ionique (HPAEC-PAD), sur un équipement Dionex ICS-3000 constitué d'une pompe gradient SP, d'un passeur AS, d'un détecteur électrochimique ED fonctionnant avec une électrode d'or, une

électrode de référence Ag / AgCl. L'ensemble est piloté par le logiciel Chromeleon version 6.8 (Dionex Corp, USA).

L'éluant est composé de soude (250 mM), d'eau ultrapure et d'acétate de sodium (1 M) en proportion variable (gradient de concentration). La séparation est effectuée sur une colonne CarboPac PA20 (Dionex) à une température de 35 °C et avec un débit d'éluant de 0,4 $mL.min^{-1}$. La séparation est effectuée en 45 minutes. L'étalonnage est réalisé avec sept points d'étalonnage (Tableau 9). Cette méthode permet la quantification des sucres suivants : galactose, glucose, mannose, rhamnose, xylose, arabinose, fucose et des acides glucuronique et galacturonique.

Tableau 9. Liste des produits purs utilisés pour l'étalonnage en HPAE-PAD

Étalon interne	**Fournisseur**	**Qualité**
D(+)-Fucose	Agro organique	99 %
L-Rhamnose	Sigma	99 %
L-(+)-Arabinose	Sigma	99 %
D-(+)-Galactose	Sigma-Aldrich	99 %
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich	99 %
D-(+)-Xylose	Sigma	99 %
D-(+)-mannose	Fluka	99 %
Ac. D-Glucuronique	Sigma	98 %
Ac.D-(+)-Galacturonique	Fluka	97 %

3.5 Composition en cellulose et hémicelluloses

L'extraction des hémicelluloses en milieu aqueux est limitée par les liaisons très fortes entre les hémicelluloses et la lignine. L'utilisation de l'eau seule ne suffit pas pour rompre les différentes liaisons intermoléculaires. Ainsi, l'élimination de la lignine par des agents oxydants permet d'augmenter l'accessibilité et l'extraction des hémicelluloses par des solutions alcalines ou par des solvants organiques. Le résidu obtenu, constitué de cellulose et des hémicelluloses est nommé holocellulose. Le mode opératoire suivi pour l'extraction chimique de l'holocellulose, puis des hémicelluloses est résumé dans la Figure 33 ci-dessous.

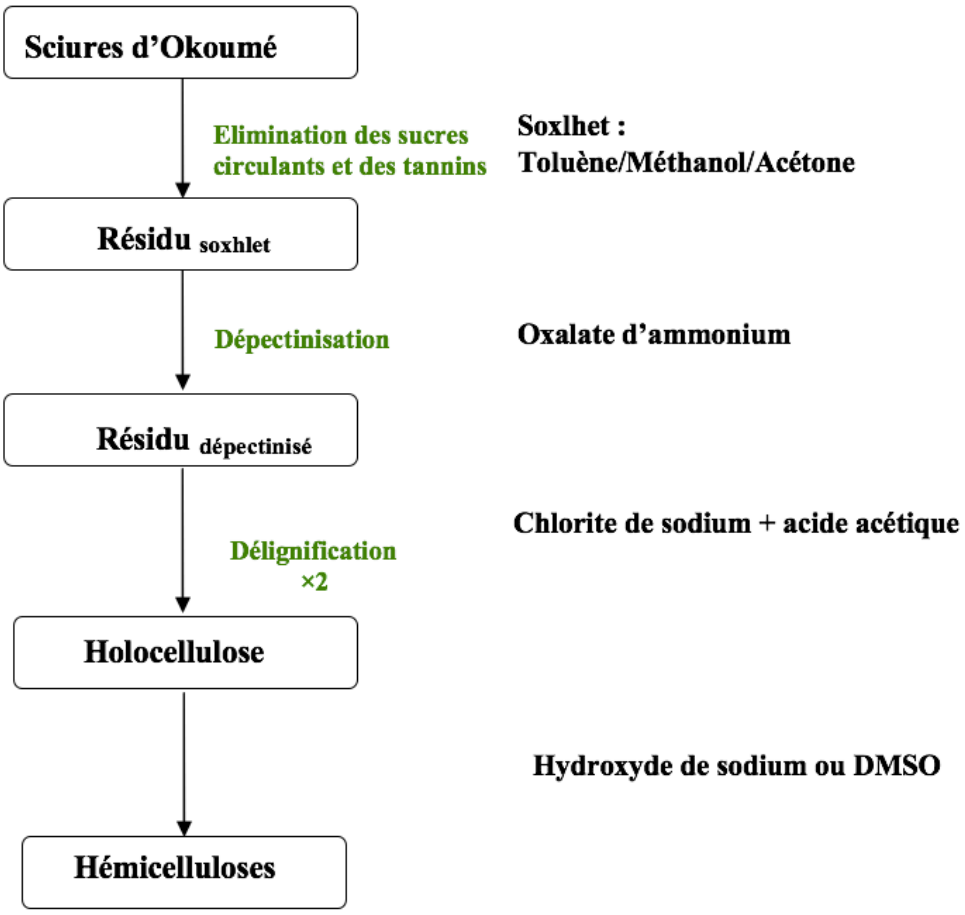


Figure 33. Procédure expérimentale d'extraction chimique des hémicelluloses

3.5.1 Obtention de l'holocellulose

Le protocole expérimental utilisé pour l'extraction chimique des hémicelluloses du bois d'okoumé a été adapté par Moine (2005). Ce protocole débute par l'élimination des extractibles par un mélange toluène / méthanol / acétone (voir méthode 3.2). Les pectines sont ensuite éliminées par 500 mL d'une solution d'oxalate d'ammonium à 1 % (Pendant 2 h à reflux). Le mélange a ensuite été filtré et séché à l'étuve à 40 °C.

Avant l'extraction chimique des hémicelluloses, les échantillons ont été délignifiés par adaptation de la méthode TAPPI T 203 OM-88. Pour cela, 2 g de sciures libres d'extraits et de pectines ont été dispersées dans 125 mL d'eau permutée contenue dans un ballon. Puis 1 mL d'acide acétique glacial à 99 % et 1 g de chlorite de sodium ($NaClO_2$) ont été ajoutés. Le mélange réactionnel est maintenu à 70 °C, sous agitation pendant 2 h. Un volume de 1 mL d'acide acétique glacial et 1 g de $NaClO_2$ sont ensuite ajoutés dans le milieu réactionnel toutes les 2 h, jusqu'à ce que le résidu

devienne blanc. Le résidu délignifié est bien rincé avec de l'eau ultrapure et filtré sur Büchner ; le solide fibreux (holocellulose) récupéré est séché pendant une nuit dans une étuve à 40 °C.

3.5.2 Extraction alcaline des hémicelluloses

Rappelons que l'utilisation des alcalis permet d'une part de gonfler les fibres cellulosiques pour améliorer l'accessibilité des réactifs, et d'autre part de saponifier les liaisons ester entre la lignine et les hémicelluloses (Maresh and stone., 2005). Dans une partie de cette étude, l'extraction des hémicelluloses consiste en un traitement alcalin, au cours duquel l'holocellulose précédemment récupérée est mise en contact dans un ballon avec 50 mL d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 2 %. L'ensemble porté à reflux pendant 2 h à 70 °C sou agitation continue. Après 2 h, la phase liquide, riche en hémicelluloses, est récupérée à l'aide d'un Büchner, et le résidu solide est ensuite placé à nouveau à reflux pendant 2 h à 70 °C, sous agitation continue dans 50 mL d'une solution de NaOH à 2 %. Ensuite, les deux phases liquides sont réunies pour la précipitation des hémicelluloses.

3.5.3 Extraction des hémicelluloses par solvant organique

Les solvants organiques sont très souvent utilisés pour l'extraction des hémicelluloses. Par rapport aux solutions alcalines, les solvants organiques fournissent les fractions très proches de l'hémicellulose *in situ* pouvant servir de modèle. Pour cette étude, les hémicelluloses ont été extraites à partir de l'holocellulose avec du DMSO (1:25, g / mL) sous agitation continue pendant une nuit à 80 °C. Puis le filtrat a été récupéré pour la précipitation des hémicelluloses. Précipitation des hémicelluloses

Après différents prétraitements chimiques (NaOH et DMSO) de la biomasse, les phases liquides contenant les hémicelluloses solubles sont récupérées sur du papier filtre qualitatif (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) avec une taille des pores 5 et 13 µm. Les hémicelluloses ont été précipitées par ajout de 3 volumes d'éthanol (avec un ajustement préalable du pH entre 5,5 et 6,0 pour les solutions alcalines par 20 % (w / w) d'acide acétique). Ensuite, les hémicelluloses ont été récupérées par centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min à température ambiante, les hémicelluloses ont été séchées à 40 °C, et stockées dans les bocaux plastiques.

4 Extraction des hémicelluloses par prétraitement par explosion à la vapeur d'eau

L'extraction des hémicelluloses par prétraitement d'explosion à la vapeur est résumée dans la Figure 34.

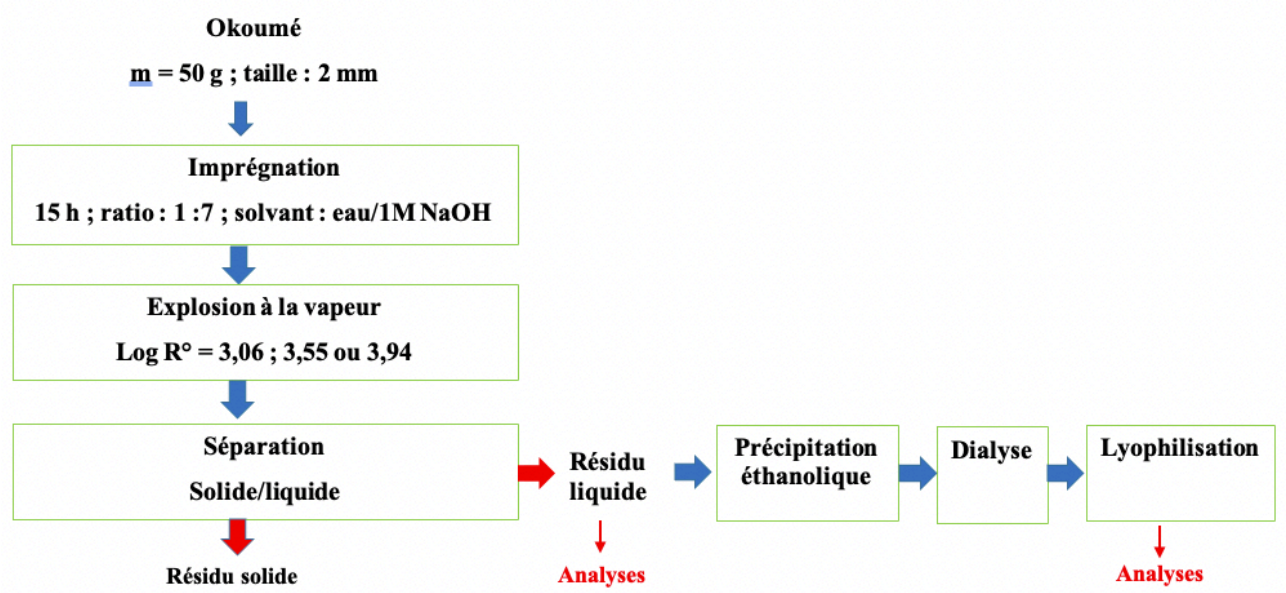


Figure 34. Procédure expérimentale d'extraction des hémicelluloses par explosion à la vapeur

Avant toutes expériences d'explosion à la vapeur, la sciure de bois (environs 2 mm) a d'abord été imprégnée dans l'eau ultrapure (ratio solide/liquide = 1 / 7), ou dans une solution d'hydroxyde de sodium à 1 M (ratio solide/liquide = 1 / 7) pendant 15 h à température ambiante et sans agitation (Chadni et al., 2019b). Après imprégnation, la sciure de bois destinée au prétraitement à la vapeur est filtrée sous vide à l'aide de filtres en microfibre de cellulose (Qualitative Filter papers Grade 111). Les conditions de prétraitement appliquées dans cette étude sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Conditions du prétraitement d'explosion à la vapeur

Température (°C)	Temps (min)	Sévérité
170	10	3,06
190	8	3,55
210	5	3,94

Le prétraitement par explosion à la vapeur a été réalisé sur un équipement conçu à l'échelle du laboratoire (Figure 35). Ce pilote comprend un générateur de vapeur (2) de 25 litres, conçu pour

atteindre une pression de fonctionnement maximale de 55 bars, un réacteur pressurisé de 2,50 L (4), suivi d'un réservoir cyclonique (6) dans lequel la biomasse prétraitée est récupérée. Une vanne à boisseau sphérique pilotée pneumatiquement (« vanne d'éclatement » (5)) placée entre le réacteur (4) et le réservoir d'explosion est utilisée pour diminuer brusquement la pression et induire la déstructuration du matériau lignocellulosique. Un ordinateur relié au pilote expérimental, permet d'assurer une partie des commandes, dont la détente explosive.

Les sciures de bois d'okoumé (50 g) préalablement imprégnées ont été introduite dans le réacteur. Les sciures sont chauffées par injection de vapeur saturée à différentes températures (170 - 210 °C), pendant différents temps de séjour (5 – 10 min). Après un temps défini, la vanne d'éclatement est ouverte brusquement, et la pression dans le réacteur passe soudainement d'une pression élevée à une pression atmosphérique. Les suspensions sont alors éjectées du réacteur pour se retrouver dans l'éclateur. Au cours de cette étape, l'eau se vaporise, ce qui induit les forces de cisaillement et crée des microfissures dans la paroi cellulaire d'une part, et une fragmentation et / ou défibration de la biomasse d'autre part. Les suspensions ont ensuite été filtrées sous vide modéré à l'aide d'un Büchner. Cette étape nous a permis de récupérer un résidu solide (riche en cellulose et lignine), et une phase liquide riche en hémicelluloses.

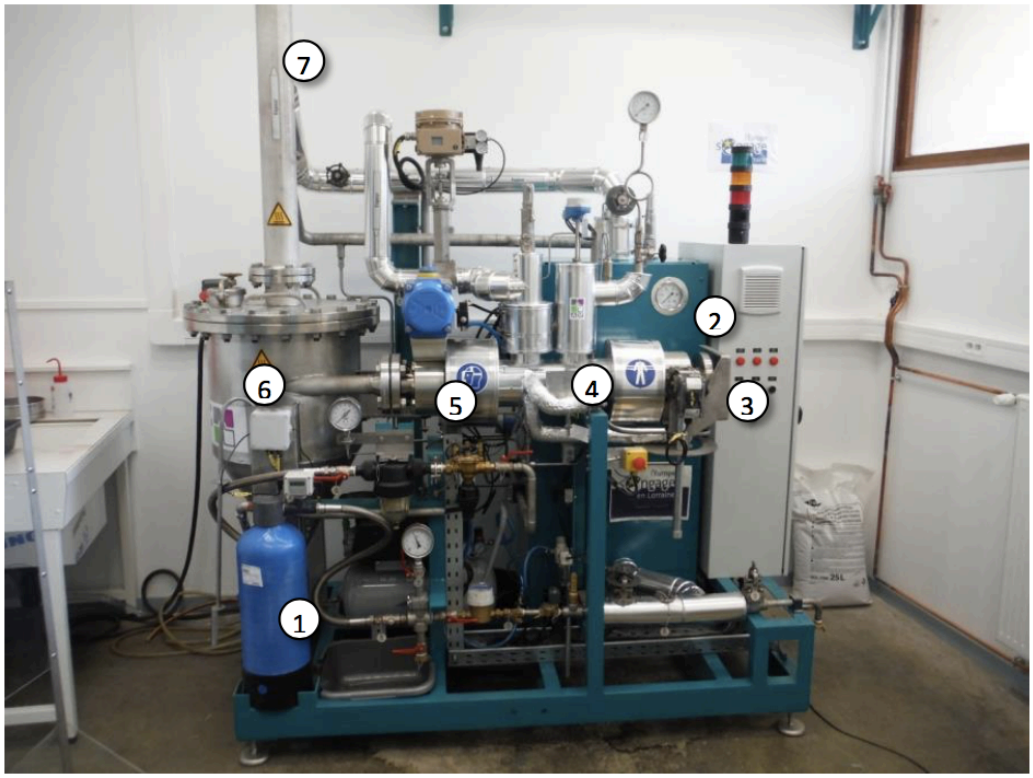


Figure 35. Pilote d'explosion à la vapeur (LERMAB). 1 : filtration de l'eau entrante ; 2 : générateur de vapeur ; 3 : ouverture du réacteur ; 4 : réacteur ; 5 : vanne d'ouverture pneumatique ; 6 : éclateur ; 7 : évent (évacuation de la vapeur)

5 Précipitation par solvant et purification des hémicelluloses issues du prétraitement par explosion à la vapeur

5.1 Précipitation des hémicelluloses

Après le prétraitement de la biomasse par explosion à la vapeur, les solutions contenant les hémicelluloses solubles sont récupérées sur du papier filtre qualitatif (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) avec une taille des pores 5 et 13 µm.

Après filtration, 10 mL de chaque filtrat est prélevé et conservé à -20 °C pour des analyses ultérieures. Le reste des solutions a été concentré à l'évaporateur rotatif, de manière à obtenir un volume final d'environs 100 mL. Ensuite, les solutions issues du prétraitement chimique au NaOH, et celles issues de la biomasse imprégnée dans NaOH 1M puis explosée à la vapeur, ont été acidifiées à pH compris entre 5,5 et 6 par une solution d'acide acétique à 20 %. Les hémicelluloses sont ensuite précipitées par ajout d'éthanol (3 volumes d'éthanol pour chaque solution). Le mélange est laissé

reposer durant une nuit, puis il est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min. Le surnageant est délicatement éliminé, le culot riche en hémicelluloses est ensuite dialysé et lyophilisé.

5.2 Purification des hémicelluloses par dialyse

La dialyse est un procédé de séparation membranaire des molécules ou des ions en solution. Cette technique tire sa particularité dans le fait que les composés de faibles poids moléculaires et les ions passent d'une solution plus concentrée vers une solution moins concentrée à travers une membrane semi-perméable, et cela jusqu'à ce que l'équilibre de concentration soit établi. Les molécules de plus grand poids moléculaire sont donc retenues par la membrane semi-perméable, tandis que les plus petits composés passent sélectivement la membrane. La dialyse a pour principal avantage de se dérouler à température ambiante, respectant ainsi les substances thermolabiles, et sans accumulation de la matière dans la membrane.

Dans cette étude, la dialyse s'est effectuée avec une membrane à dialyse (Spectra / Por 3) d'un seuil de coupure de 2,5 kDa. Le tube à dialyse de 25 cm de long sur 3 cm de diamètre a été rempli avec les échantillons à dialyser (culot plus eau ultrapure). Ensuite, le tube a été immergé pendant 3 jours dans un grand becher (5 litres) rempli d'eau ultrapure que l'on renouvelle au moins une fois par jour. Après 3 jours, le dialysat qui se présente sous forme d'un floculat plus ou moins dense a été recueilli. Le dialysat a par la suite été placé dans un ballon et mis en rotation dans de l'azote liquide pour être congelé avant lyophilisation.

5.3 Lyophilisation des hémicelluloses

La lyophilisation est une technique de déshydratation à basse température, qui permet d'éliminer progressivement de l'eau contenue dans un produit préalablement congelé, par sublimation de l'eau. En effet, lorsque la pression est très basse (< 0,006 bars), l'eau passe directement de l'état solide à l'état gazeux, sans passer par l'état liquide. Pour cela la pression partielle de la vapeur d'eau dans l'enceinte du lyophilisateur est inférieure à la pression de vapeur autour des hémicelluloses (Figure 36. Diagramme de phase de l'eau en fonction de la température et de la pression. Le point triple défini le point d'équilibre entre les trois phases).

Dans cette étude, les échantillons ont été lyophilisés lyophilisation à l'aide d'un lyophilisateur LEYBOLD HERAEUS.

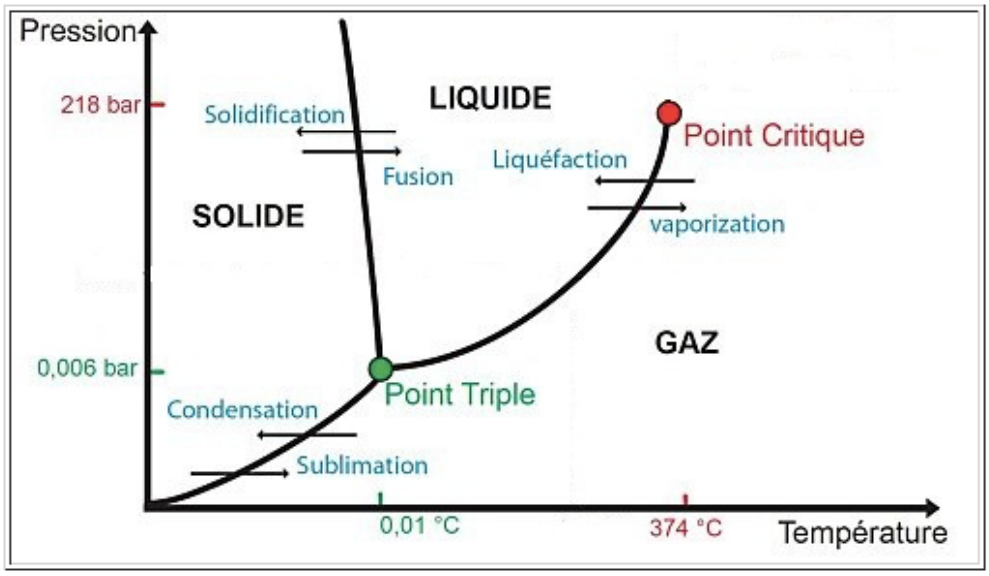


Figure 36. Diagramme de phase de l'eau en fonction de la température et de la pression. Le point triple défini le point d'équilibre entre les trois phases

6 Fractionnement des hémicelluloses par procédé membranaire

Les expériences de séparation membranaire ont été effectuées au LRGP.

Les essais de filtration membranaire ont été réalisés à l'aide un pilote de laboratoire Cogent® µScale (Millipore, Molsheim, France) (Figure 37). Le pilote est constitué d'une cuve de 1 L munie d'un agitateur magnétique contenant la solution d'alimentation et d'une pompe (péristaltique) qui permet la circulation du fluide à travers les membranes. Le rétentat est recyclé dans la cuve d'alimentation et le perméat est récupéré (comme décrit dans le chapitre 1). La mesure du débit de perméat se fait par prélèvement d'un volume, en un temps donné. Une vanne de contre-pression permet d'augmenter la pression du rétentat. Les expériences sont conduites à température ambiante (22 °C +/- 2 °C).

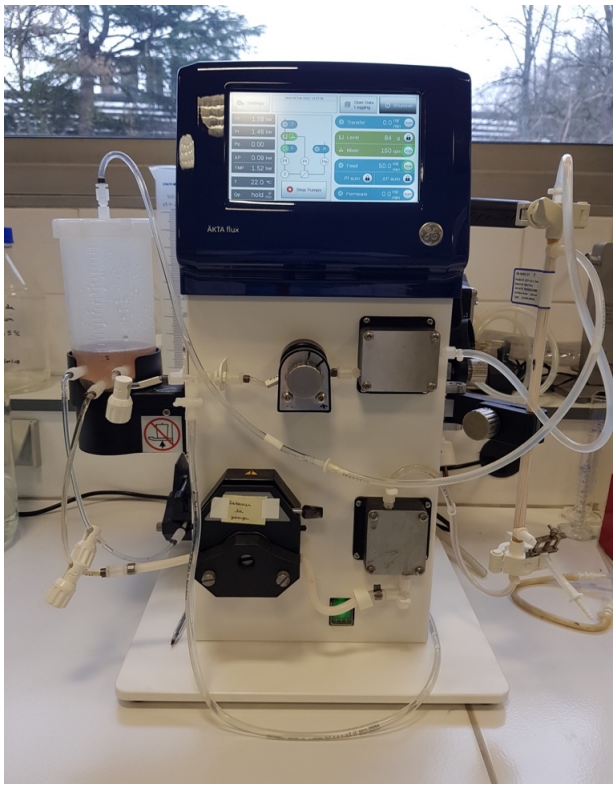


Figure 37. Installation du pilote de séparation membranaire

6.1 Ultrafiltration des hydrolysats d'explosion à la vapeur

Les expériences d'ultrafiltration (UF) ont été pratiquées sur des membranes creuses d'ultrafiltration en cellulose régénérée de 3, 10, 100 et 500 kDa NMWCO (Nominal Molecular Weight CutOff) (Molssheim, Millipore, France) d'une surface de 340 cm^2. Un volume de 100 mL de l'hydrolysat issu du prétraitement par SE a été prélevé et ultrafiltré à température ambiante à 2,0 bars de pression transmembranaire (TMP). Avant d'effectuer un prélèvement du perméat et du rétentat pour des analyses ultérieures, le perméat et le rétentat ont d'abord été mis en recirculation totale pendant 10 min.

6.2 Diafiltration des hydrolysats d'explosion à la vapeur

La membrane de 10 kDa a été choisie pour réaliser une diafiltration (DF) de 100 mL de l'hydrolysat obtenu par prétraitement par SE. La pression transmembranaire est maintenue à 1,5 bars. La diafiltration a consisté à maintenir le volume d'alimentation constant par ajout d'eau désionisée. Le volume d'eau ajouté à chaque cycle de DF était égal au volume du rétentat. La diafiltration de type séquentielle-dilution a été menée jusqu'à 6 volumes de diafiltration (DV). Après ajout de chaque

diavolume, des prélèvements sont effectués dans le bac d'alimentation et dans le bac de perméat, pour des analyses ultérieures.

7 Caractérisation des différentes fractions d'hémicelluloses

7.1 Composition des hémicelluloses en monosaccharides

Pour déterminer la composition osidique des hémicelluloses, une étape de dépolymérisation des chaines de sucres a été nécessaire. Cette étape a pour but de rompre les liaisons glycosidiques, afin de permettre l'hydrolyse complète des liaisons de manière à obtenir les monomères préservés de toute dégradation secondaire. Dans cette étude, l'hydrolyse en sucre simples et en acides uroniques s'est effectuée en dissolvant environ 15 mg de poudre d'hémicelluloses dans 10 mL d'eau ultrapure. Ensuite, le pH a été mesuré, et la quantité nécessaire (349 µL) de H_2SO_4 à 72 % a été ajouté pour atteindre une concentration en acide de 4 %. Dans le cas du prétraitement par explosion à la vapeur, l'analyse en monosaccharides de la phase liquide obtenue a été réalisée en ajoutant un volume (87 µL) de H_2SO_4 à 72 % à 2,5 mL de la fraction liquide afin d'atteindre une concentration finale en acide de 4 %.

L'ensemble des échantillons a été incubé à 121 °C dans une autoclave pendant 1 h. Les solutions obtenues ont été refroidies, puis diluées. Puis, 20 µL de la solution filtrée à 0,45 µm a été analysé par chromatographie d'échange d'anions haute performance, couplé à un détecteur par ampérométrie pulsée (HPEAC-PAD : Dionex ICS-30000) (voir 3.4).

7.2 Dosage de la teneur en acides acétique férulique et coumarique dans les hémicelluloses

Le dosage des acides férulique et coumarique a été réalisé par adaptation du protocole de (X Yuan et al., 2006). Les solutions d'oligosaccharides ont été obtenues en pesant environ exactement 10 mg d'hémicelluloses sèches dans une fiole jaugée de 5 mL. Cette dernière a été complétée au trait de jauge avec de l'eau ultrapure à l'aide d'un compte-gouttes. Les oligosaccharides feruloylé (1000 µL) ont été saponifiés avec du NaOH (1250 µL à 0,4 M) pendant 2 h à l'obscurité, et à température ambiante, dans une fiole jaugée de 5 mL. La réaction a été stoppée par addition de H_3PO_4 à 0,4 M jusqu'au trait de jauge. Cette solution est analysée après filtration pour doser les acides férulique, coumarique et acétique par HPLC (Shimadzu Prominence). La séparation s'est effectuée sur une colonne C18-Luna 2 (Phenomenex) à une température de 30°C avec un éluant constitué d'un mélange eau/acétonitrile/acide acétique dans les proportions 80/18/2 (v /v / v). Le débit d'éluant est

de 0,8 mL.min^{-1}. La détection est réalisée par spectrophotométrie UV à 290 et 310 nm. Un étalonnage externe avec 5 points de calibration est réalisé.

7.3 Détermination de la taille des hémicelluloses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Rappelons que la technique la plus rependue pour évaluer la distribution de masse des hémicelluloses est la SEC. Elle a pour but de séparer les molécules en fonction de leur poids moléculaire, ou plus exactement de leur volume hydrodynamique qui prend en compte la conformation des molécules dans un solvant donné. Dans ces travaux, le poids moléculaire moyen en masse (Mw) et en nombre (Mn) des hémicelluloses, ont été déterminés par chromatographie d'exclusion stérique. Une masse de 5 mg d'hémicelluloses ont été dissous dans 2,25 mL de $NaNO_3$ à 0,25 M. La solution est ensuite filtrée et les distributions de masse molaire des extraits d'hémicelluloses sont déterminées par chromatographie d'exclusion couplée à un détecteur d'indice de réfraction (Shimadzu Prominence). Deux colonnes couplées en séries sont utilisées (Phenomenex GFC-P2000, 3000) pour séparer les hémicelluloses. La température d'élution est de 35 °C et l'éluant est constitué de $NaNO_3$ à 0,25 M avec un débit de 0,7 mL.min^{-1}. Des étalons de pullulanes de masses molaires connues sont utilisés pour l'étalonnage.

7.4 Spectrométrie dans le proche infrarouge (NIRS)

Une acquisition de spectres dans le proche infrarouge (NIRS) a été réalisée sur le plan radial des blocs de bois a été réalisée sur les particules de bois d'okoumé. Le calcul de la dérivée seconde a été effectué sur une longueur d'onde comprise entre 6500 et 4500 cm^{-1}. Ensuite, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour discriminer les échantillons en fonction de leurs compositions chimiques.

7.5 Caractérisation des hémicelluloses par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Comme nous l'avons vu précédemment, la FTIR est une technique qui permet d'étudier la présence et la nature des différents groupements chimiques présents dans un matériau, par la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. Elle renseigne donc sur le suivi des modifications chimiques d'un composé, en fonction de son mode d'extraction.

Les analyses FTIR ont été effectuées sur un spectrophotomètre infrarouge (Thermo Scientific iD3 Znse ATR-Nicolet iS 5 FTIR) (Figure 38). Lors de l'analyse, de la poudre d'hémicelluloses est déposée sur la cellule du spectrophotomètre. Un applicateur de pression avec un bouton rotatif permet de presser l'extrait et d'améliorer le contact avec le cristal de diamant composant le milieu dense. Le rayonnement infrarouge du spectromètre qui possède un angle d'incidence fixe de 45 degrés, réfléchi à travers du cristal et pénètre dans l'échantillon via une onde évanescente. Les spectres ont été obtenus dans le domaine infrarouge de 400 à 4000 cm^{-1}. Ensuite l'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel OMNIC.

Figure 38. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

7.6 Caractérisation des hémicelluloses par résonance magnétique nucléaire (RMN)

La structure des hémicelluloses peut être déterminée par spectroscopie RMN. Cette méthode sert à identifier la nature de la chaine des oligo/polymères, de préciser le taux d'embranchement, la configuration anomérique et le degré d'acétylation (Teleman et al., 2002) ;(Evtuguin et al., 2003a). En RMN, les noyaux magnétiques d'isotopes spécifiques sont alignés par un aimant externe très puissant, et perturbés par une onde radio. Cette énergie externe appliquée à la molécule est absorbée, et le noyau est dit « résonance ». Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettent une radiation et reviennent à leur état initial de faible niveau d'énergie. Les noyaux qui ont un nombre de spin de ½ donnent généralement les meilleurs spectres (https://eag.com/fr/techniques/spectroscopy/nuclear-magnetic-resonance-nmr/).

Pour cette étude, les analyses de résonnance magnétique nucléaire (RMN) ont été effectuées sur un appareil Bruker de 400 MHz avec un programme Bruker standard. Les hémicelluloses issues du prétraitement par explosion à la vapeur et celles extraites par traitement alcalin à la soude du bois blanchi ont été dissoutes dans de l'oxyde de deutérium (D_2O) à 99.7 %, alors que les hémicelluloses extraites par le DMSO du bois blanchi ont été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde-d6 (DMSO-d6) à 99,9 %. Les spectres obtenus ont été ensuite traités avec le logiciel Top spin.

7.7 Dosage des produits de dégradation des monosaccharides

Au cours du prétraitement, les hémicelluloses solubilisées sont susceptibles d'être déshydratées pour former du furfural à partir des pentoses et le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) à partir des hexoses. Dans des conditions plus sévères, ces produits de dégradation peuvent conduire à la formation des acides. L'hydroxyméthylfurfural (HMF), le furfural et l'acide acétique (AcOH) ont été dosés directement dans le liquide issu du prétraitement par explosion à la vapeur (sans qu'il ne subisse un autre traitement), par HPLC (Ultimate 3000). La séparation est effectuée sur une colonne HiPlex-H (Agilent) à une température de 55°C. L'éluant est constitué d'une solution d'H_2SO_4 à 5 mM avec un débit de 0,8 $mL.min^{-1}$. Les produits sont quantifiés par un détecteur UV à 210 nm pour l'acide et à 280 nm pour les furanes. Un étalonnage externe avec 5 points de calibration est réalisé.

7.8 Microscopie

Des sections fines ont été effectuées dans le sens transversal avec un microtome coulissant (SM200 R, Leica, Allemagne), pour des observations par transmission en champ clair. Les sections ont été colorées avec une solution d'astra à 1 % et contre colorées avec une solution de safranine à 0,1 % d'après le protocole décrit par Srebotnik et Messner (1994). Les acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un microscope Olympus CX31 muni d'une caméra CCD Olympus Color view III.

Les observations de fluorescences ont été réalisées sur un microscope Leica DM 2700M muni d'une caméra CCF DFC7000T et d'une platine à balayage XYZ. Les cubes filtres L5 (EX=480/40, LP505 dichroïque, BP527/30), N2.1 (EX=515-560, LP580 dichroïque, LP590) ont été utilisés pour la visualisation de la fluorescence de la cellulose + lignine (canal vert) et de la lignine (canal rouge).

8 Valorisation des hémicelluloses

8.1 Obtention de films plastiques

Les films ont été obtenus par adaptation du protocole de Bahcegul et al. (2012). 0,5 g de d'hémicelluloses obtenues par explosion à la vapeur ont été dissous dans 50 ml d'eau désionisée contenue dans un ballon de 250 mL. Puis 0,2 g de glycérol a été ajouté (soit 40 % de la masse d'hémicelluloses). Le glycérol jour le rôle de plastifiant pour éviter la fragilité du matériau (Hartman, 2005). Le tout a été placé dans un bain marri maintenu sous agitation magnétique et chauffé à 90 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement le ballon a été placé dans un ultrason pendant 2 minutes. Après la dissolution, la solution a été filtrée à travers un filtre en verre pour éliminer la petite quantité de matériau non dispensable (Mikkonen et al., 2011). Ensuite la solution a été versée dans des boîtes de Pétri d'un diamètre de 10 cm, et séchée à 40 °C pendant 24 h.

8.2 Essai de traction

Les tests de traction ont été réalisés sur des films issus des hémicelluloses extraites par NaOH - SE.

Avant l'essai de traction, des échantillons de forme rectangulaire ont été obtenus à partir des films avec une presse à découper manuelle. Deux échantillons ont été obtenus de chacun des films. Les spécimens ont été testés pour leurs propriétés mécaniques avec une machine d'essai universelle équipée d'une cellule de pesée de 100 N, de 2 mâchoires et d'un logiciel NEXYGEN. Les résultats des essais de résistance ultime à la traction ont été obtenus.

Références bibliographiques

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2019. Steam explosion process for the selective extraction of hemicelluloses polymers from spruce sawdust. Ind. Crops Prod. 141, 111757. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111757

Evtuguin, DmitryV., Tomás, JorgeL., Silva, ArturM.S., Neto, C., 2003. Characterization of an acetylated heteroxylan from Eucalyptus globulus Labill. Carbohydr. Res. 338, 597–604. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00529-3

Maresh, D.J., STONEt, B.A., n.d. Studies on wheat endosperm 18.

Moine, C., n.d. Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois : Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes 284.

Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O., 2002. Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. Carbohydr. Res. 337, 373–377. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00327-5

Yuan, X., Wang, J., Yao, H., 2006. Production of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fibre by xylanases from. Food Chem. 95, 484–492. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.043.

Chapitre 3 :

Extraction of acetylated glucuronoxylans and glucomannans from Okoume (Aucoumea klaineana Pierre) sapwood and heartwood by steam explosion

Chapitre 3 : Extraction of acetylated glucuronoxylans and glucomannans from Okoume (*Aucoumea klaineana* Pierre) sapwood and heartwood by steam explosion

Contexte et objectif général

L'article « Extraction of acetylated glucuronoxylans and glucomannans from Okoume (Aucoumea klaineana Pierre) sapwood and heartwood by steam explosion » a été publié dans le journal « Industrial Crops and product » en 2021 (Mougnala Moukagni et al., 2021). Rappelons qu'aujourd'hui la biomasse végétale se présente comme une alternative crédible face aux matières premières fossiles. Ainsi, l'intégration et la valorisation de cette biomasse dans un circuit de bioraffineries nécessite la mise en œuvre de divers procédés de prétraitement. La fiabilité des procédés utilisés repose sur leur capacité à séparer les différents composés de la biomasse sans dégrader les sucres. Ainsi, l'extraction ou la récupération d'hémicelluloses sous forme polymérique à partir d'hydrolysat de bois et/ou de biomasse ont été étudiées par de nombreux auteurs (Chadni et al., 2019b, 2019a; Hartman et al., 2006a). Ces polysaccharides peuvent être valorisés comme matière de base pour des applications biotechnologiques dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et les biomatériaux (Chadni et al., 2020; Farhat et al., 2017; Gröndahl et al., 2004; Mikkonen and Tenkanen, 2012).

En outre, les matériaux d'origine renouvelable devant venir en remplacement des plastiques actuels doivent répondent à des exigences techniques imposant des études approfondies. Les caractéristiques et les propriétés des hémicelluloses seront d'une grande importance pour les propriétés des films et des gels formés qui en découlent. En effet, il est bien établi qu'il existe une corrélation étroite entre la structure chimique des polysaccharides et les propriétés physicochimiques des matériaux. Dans ce contexte, il a été montré que le taux d'acétylation des polysaccharides est un critère très important impactant les propriétés de solubilité et les propriétés barrières des films à base d'hémicelluloses (Kishani et al., 2018; Michalak et al., 2018).

Cette étude se concentre sur l'explosion à la vapeur, qui se positionne comme un procédé respectueux de l'environnement, le plus utilisé pour le fractionnement de la biomasse

lignocellulosique (Alvira et al., 2010; Wang et al., 2009). Le procédé d'explosion à la vapeur est traditionnellement utilisé pour impacter les tissus de la paroi cellulaire, afin d'aboutir à une meilleure accessibilité de la cellulose pour la fermentation et/ou la bioconversion chimique de la biomasse, la lignine étant habituellement utilisée comme source d'énergie (Pan et al., 2010). Quant aux hémicelluloses, la plupart des études rapportent leur dépolymérisation hydrolytique sévère au cours du processus, avec une génération des monomères et oligomères et leurs produits de dégradation (hydroxyméthylfurfural et furfural) (Wojtasz-Mucha et al., 2017). Toutefois, certaines études décrivent une récupération des hémicelluloses sous une forme polymérique avec une conservation des groupes acétyles, à partir de la biomasse lignocellulosique par un prétraitement d'explosion à la vapeur (Chadni et al., 2019b). En effet, la présence des groupes acétyles sur les hémicelluloses de masse molaires élevée est reconnue comme un atout structurel pour des applications spécifiques (Timell, 1967b).

L'élargissement du procédé d'explosion à la vapeur à l'échelle industrielle pour la production du bioéthanol cellulosique, interpelle sur la valorisation optimale de tous les composants de la biomasse lignocellulosique y compris les hémicelluloses. Or la valorisation des hémicelluloses nécessite une bonne compréhension et une maîtrise de l'impact des conditions de traitement sur l'extraction, le fractionnement et sur les propriétés structurelles de ces hémicelluloses.

Par ailleurs, l'utilisation optimale de toutes les composantes de la biomasse lignocellulosique est d'un grand intérêt pour maximiser sa valeur. En effet, la composition des parois cellulaires des plantes dépend du type de cellules et leurs localisations d'une part, et de la croissance des plantes d'autres part (Willför et al., 2005, 2003). L'aubier et le bois de cœur peuvent clairement se distinguer dans une coupe transversale d'un tronc d'arbre grâce à leurs différentes couleurs (voire Figure 2), et ce en raison de leurs niveaux d'humidité différents (Willför et al., 2003). Compte tenu de l'importance pour les bioraffineries d'adapter les conditions de prétraitement en fonction des différentes fractions de bois, plusieurs auteurs ont rapporté les propriétés chimiques de l'aubier, du bois de cœur de différentes espèces d'arbres (Bertaud and Holmbom, 2004; Rowell and Rowell, 2005; Willför et al., 2005, 2003; Xiao et al., 2020). En ce qui concerne particulièrement les hémicelluloses, les différences de contenu et de structure entre l'écorce, l'aubier et le bois de cœur d'eucalyptus ont été rapportées par Xiao et al., (2020). Cependant, concernant notamment les essences tropicales comme l'okoumé, l'analyse détaillée des compositions et des structures des hémicelluloses dans les différents tissus doit être améliorée afin de faciliter le traitement et l'utilisation de de la biomasse.

Cette étude porte donc sur l'aubier et le bois de cœur, issus de la transformation des grumes d'okoumé en placage et en contreplaqué. Rappelons que l'okoumé est une essence tropicale à croissance rapide, appartenant à la famille des burséracées. Elle présente une croissance radiale moyenne d'environ 10 $mm.an^{-1}$, un tronc pouvant atteindre 2 mètres de diamètre au-dessus du contrefort et dépassant 50 m de hauteur (Brunck et al., 1990).

L'aubier et le bois de cœur utilisés dans cette étude ont des taux d'extractibles respectifs de 2.36 % ± 0.31 (w / w) et de 2.00 % ± 0.41 (w / w). Leurs teneurs en lignine de Klason sont de 29.68 % ± 1.58 (w / w) et de 28.02 % ± 0.37 (w / w) pour l'aubier et le bois de cœur respectivement. Concernant les polysaccharides pariétaux, l'aubier et le bois de cœur présentent des teneurs en glucose relativement différentes, avec des taux plus élevés dans le bois de cœur (54.19 % ± 1.66 : w / w) par rapport à l'aubier (50.73 % ± 0.15 : w / w). Quant aux hémicelluloses, elles sont majoritairement composées de xylose et de mannose, avec des proportions respectives de 11.34 % ± 0.04 (w / w) et de 2.23 % ± 0.03 (w / w) dans l'aubier, ces proportions sont de 10.16 % ± 2.41 (w / w) et de 2.09 % ± 0.15 (w / w) dans le bois de cœur.

L'objectif de cette partie est d'étudier l'impact de différentes conditions d'extraction par explosion à la vapeur, sur la structure et la distribution des hémicelluloses des différents tissus du bois d'okoumé. Il s'agit d'approfondir la connaissance des propriétés chimiques du bois d'okoumé et leur relation avec l'hétérogénéité morphologique afin d'optimiser l'utilisation du bois d'okoumé pour l'élaboration des bioproduits. Pour répondre à cet objectif, les méthodes traditionnelles d'isolement des hémicelluloses, telles que l'extraction alcaline et l'extraction au diméthylsulfoxyde, ont apporté d'importantes contributions dans la compréhension de la structure des hémicelluloses.

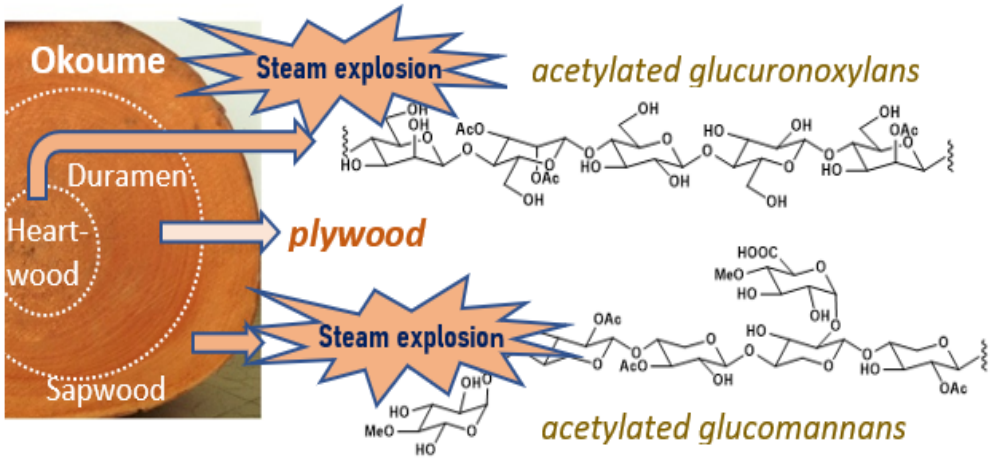
Article

Extraction of acetylated glucuronoxylans and glucomannans from Okoume (*Aucoumea klaineana* Pierre) sapwood and heartwood by steam explosion

Errol Mougnala MoukagniØ, Isabelle Ziegler-DevinØ, Rodrigue Safou-Tchima¶, Nicolas BrosseØ*

ØUniversité de Lorraine, INRAE, LERMAB, F-54000 Nancy, France

¶Laboratoire de Recherche et de Valorisation du Matériau Bois (LaReVa Bois). Ecole Normale Supérieure d'Enseignement Technique (ENSET). BP 3989, Libreville, Gabon.



Abstract

Aucoumea klaineana Pierre (okoume) is a tropical hardwood of industrial importance, used for veneers and plywood production. Various conditions of Steam Explosion (SE) treatment (temperature, duration, pH) have been applied on okoume co-products, sapwood (SW) and heatwood (HW) for the extraction of polymeric hemicelluloses. Conventional extractions with alkali or dimethyl sulfoxide (DMSO) were also performed from delignified SW and HW for comparison. The hemicelluloses extracts have been characterized by HSQC-NMR, FTIR, size exclusion chromatography. The acetyl contents have been determined by chromatography after saponification and from HSQC spectra. Using basic impregnation prior to SE (NaOH-SE), high molecular mass glucuronoxylans (GX, Mw = 65-100 kDa) were recovered in 3-6 % yields. A neutral impregnation (H_2O-SE) produced O2 and / or O3 acetylated GX and glucomannans (GM), preserving the acetyl moieties in a greater extent compared to the mild DMSO extraction (% Ac ≈ 6.6-8.4 % and 1.0 - 4.1 % w / w respectively). This study provides insights on the composition of SW and HW okoume with a view to further innovative processing and valorization including the preparation of films with advanced properties for food packaging.

Key words: Aucoumea klaineana Pierre; steam explosion; acetylated glucomanans; acetylated glucuronoxylans; sapwood; heartwood

1 Introduction

The economic viability of the biorefineries depends of the optimal valorization of plant resources including the utilization of non-cellulosic constituents. Hemicelluloses are among the main components of wood and constitute a vast, heterogeneous and complex family of polysaccharides, containing diverse sugars and uronic acids (Ishii et al., 2001 ; (Chadni et al., 2020, 2019b). Hardwood hemicellulosic fraction is mainly composed of glucuronoxylans (≈ 15-30 % of wood) which have a backbone of β-(1→4)-linked xylose residues substituted with β-(1→4)-linked 4-O-Me-β-D-glucopyranosyl uronic acid on O-2 of xylosyl residue. Hardwood can also contain a minor amount of glucomannans (≈ 4 % of wood) which have a backbone of β-(1→4)-linked glucopyranosyle / mannopyranosyl units in a linear or slightly branched chain. These polysaccharides are usually diversely acetylated on the sugar backbone (Willför et al., 2005).

Unlike cellulose, which has been used industrially for a very long time, applications involving polymeric hemicelluloses are rare and the potential of hemicelluloses is still very little exploited. However, due to their chemical structure and high molar masses, hemicelluloses can be used to produce promising materials for various applications. One of the most studied applications for polymeric hemicelluloses is the design of films with advanced properties (e.g. biodegradability, edibility, barrier effect) for food packaging (Chadni et al., 2020; Zhao et al., 2020).

Various processes have been proposed for the recovery of hemicellulosic polymers from lignocellulosic matrix including alkali extraction of xylans and/or glucuronoxylans from agricultural co-products and liquid hot water extraction (Zhao et al., 2020). It also has been reported that galactoglucomannans can be recovered from the water stream of thermomechanical pulping of softwood using membrane technologies (Kishani et al., 2018) ; (Willför et al., 2003). The recovery of acetylated hemicelluloses could be of great interest for biological and material applications since acetylation degree affects the accessibility of polysaccharides to microbes, their solubility in water (Michalak et al., 2018; Voepel et al., 2009) and the physico-chemical properties of hemicelluloses-based materials (e.g. barrier properties of films, (Kishani et al., 2018).

However, the recovery of acetylated and high molecular mass hemicelluloses from wood with a minimum of degradation is still challenging. In fact, the currently applied methods usually rely on partly modified and deacetylated polysaccharides. For characterization purpose slightly modified and

acetylated hemicelluloses can be recovered from holocellulose by dimethyl sulfoxide (DMSO) extraction (Evtuguin et al., 2003b; Marques et al., 2010).

Steam explosion (SE) is one of the most promising processes for biomass fractionation and pretreatment. SE is a thermo-mechanico-chemical treatment involving a steaming step followed by an explosive decompression provoking a partial breakdown of the lignocellulosic complex (Espirito Santo et al., 2020; Inseemeesak and Areeprasert, 2020; Pereira Marques et al., 2021). This process is commonly used for increasing the accessibility of cellulose to enzymatic hydrolysis and has been developed, even at commercial stage, for cellulosic bioethanol production. More marginally, SE has also been described for high molecular mass hemicelluloses extraction from lignocellulosic biomass. Compared to a hot water extraction, it has been demonstrated by (Wojtasz-Mucha et al., 2017) that SE provoked a more effective hemicelluloses extraction due to the advective mass transport during the pressure release step (explosion) (Wojtasz-Mucha et al., 2017). (Krawczyk et al., 2008a) reported the isolation of arabinoxylans from barley husks by SE after water impregnation and ultra-filtration. In our group, we studied the extraction of arabinoxylans and galactoglucomannans from spruce by SE (Chadni et al., 2020, 2019b). Extraction selectivity as a function of the pH of the SE treatment was demonstrated: for a basic impregnation arabinoglucuronoglynans were recovered in relatively high yields whereas for water impregnation highly acetylated galactoglucomannans were isolated. It was concluded that SE could constitute an effective technique for the recovery of slightly modified and acetylated hemicelluloses from wood of application interest (e.g. food packaging).

Aucoumea klaineana Pierre (okoume) is a fast-growing hardwood species of great industrial importance in Central-Africa. Okoume is primarily used for veneers and plywood production. In Gabon, the okoume wood industry produces approximatively $1.5x10^6$ m^3 of transformed wood and 750 000 m^3 of waste per year currently not properly used. In wood stem, heartwood (HW) is the inner part characterized by its high mechanical properties and sapwood (SP) the outer part with a higher porosity and moisture content. Due to these properties, okoume SW and HW have been considered as low value coproducts, excluded from industrial transformation such as trenching, veneers and plywood production (Obame et al., 2019). There are relatively few publications concerning the comparison between sapwood (SW) / heartwood (HW) composition. Unlike HW, SW is comprised of living cells and allows the water transport and nutrients storage, characterized by a higher porosity and permeability. Willford at al. reported in 2005 the amount and composition of sugars in SW and HW of 11 industrially important hardwood species from temperate areas (Willför et al., 2005). More recently, extractives content of bark, SW and HW of okoume were described (Anris Starlin Peguy et

al., 2019) but to the best of our knowledge, the sugars composition of SW / HW of tropical species has never been investigated. However, in a context of an optimal valorization of bioressources, a better knowledge of the chemical composition of the different parts of industrial wood, including co-products, is needed.

In previous papers, we have described organosolv and SE pretreatment of okoume SW under various conditions for lignin extraction and characterization and for ethanol production (Obame et al., 2019; Rodrigue et al., 2016). The goal and the novelty of the present work are twofold: (1) to analyze the hemicelluloses composition of HW and SW of a tropical hardwood species and (2) to study the recovery of polymeric hemicelluloses from hardwood during SE pretreatment for further utilizations. A detailed characterization of acetylated hemicelluloses was carried out by NMR and chromatographic methods in order to better understand the parameters impacting the structure of the extracted polysaccharides, to anticipate their future applications and facilitating further processing.

2 Material and methods

2.1 Raw material

The samples used in this study were collected from an Okoume (Aucoumea klaineana Pierre) log in the Nzamaligué natural forest of Gabon by the "Société Equatoriale d'Exploitation Forestière SEEF". The Okoume SW comes from slab waste, while the internal HW from the peeling core co-products.

2.2 Conventional hemicelluloses extraction with NaOH and DMSO

Sawdust from Okoume HW and SW (< 0.16 mm) was Soxhlet extracted using toluene / ethanol / methanol (4:1:1 v / v / v) (Safou-Tchiama et al., 2007b). The extracted sawdust was dried at 105°C and stored in a plastic bag at room temperature before use. Extract-free sawdust was depectinized with a 1% (w / w) of ammonium oxalate solution (2 h at 80 °C) and then dried at 40°C. Delignification was carried out in a water bath under reflux at 70°C by dispersing 1.5 g of depectinized sawdust in 125 mL of deionized water. Subsequently, 1 g of sodium chlorite and 1 mL of glacial acetic acid were added every 2 h until complete bleaching of the biomass. The delignified residue was carefully washed with deionized water and filtered under vacuum. The white fibrous solid residue (holocellulose) was collected and dried at 40 °C. Alkaline extraction was carried out under magnetic stirring at 70 °C with 1 g of dry holocellulose in 50 mL of 2 % (w / w) of NaOH.

After 2 hrs, the liquid phase was recovered. The residue was extracted again with 50 mL of 2 % NaOH for 2 hrs. Both liquid phases were acidified with 20 % (w / w) of acetic acid to a pH between 5.4 and 6. The hemicelluloses precipitated by the addition of 3 volumes of ethanol were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 10 min at room temperature. The recovered hemicelluloses were dried at 40 °C and stored in plastic jars before analysis. The hemicelluloses yields were calculated as mass percentage of dry wood. The DMSO extraction of hemicelluloses was performed on holocellulose (1:25 solid / liquid) under magnetic stirring for 15 hrs at 70 °C. Three volumes of ethanol were added. The hemicelluloses were recovered by centrifugation at 4000 rpm for 10 min and drying at 40 °C. Yields of hemicelluloses were calculated as mass percentage of dry wood.

2.3 Extraction of hemicelluloses by steam explosion

Extraction of hemicelluloses by SE has been carried out by adapting the protocol described by (Chadni et al., 2019b) Sawdust from Okoume HW and SW of about 2 mm size was first dried at 105 °C overnight. Then 50 g of biomass were impregnated for 15 hrs in 1 M aqueous NaOH (solid / liquid ratio 1:7, NaOH-SE) or in water (solid/liquid ratio 1:7, H2O-SE) before SE (Figure 39).

The impregnated sawdust was then filtered and placed directly into a 2 L SE reactor. The sawdust was treated by injection of saturated steam at various temperatures and residence times (see **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), then a pneumatic valve was opened to abruptly drop the pressure and transport the biomass to the explosion chamber. The steam explosions were set at temperatures between 170 °C and 210 °C and a residence time of 5 min to 10 min. The severity factor for each experiment was calculated by correlating temperature and retention time using the following equation (Overend and (Overend et al., 1987):

$$S = log\ [\mathrm{t_s} \,.\, \exp\left(\frac{\mathrm{T} - 100}{14.75}\right)]$$

ts is the residence time (min) and T is the temperature (°C).

After SE pre-treatment, the hemicelluloses-rich liquid fraction was separated from the treated wood by filtration. For NaOH-SE, the pH was adjusted between 5.5 and 6 with H_2SO_4 72% (w/v). The liquid fraction was concentrated using a rotary evaporator until a volume of ≈ 100 mL. The hemicelluloses were precipitated with 4 volumes of ethanol, then separated by centrifugation at

40,000 rpm for 10 min. The supernatant was gently removed and the solid (composed of polymeric hemicelluloses) was retained for the dialysis step. The dialysis was performed for 3 days by filling a dialysis tube (cut-off of 2.5 kDa) with the hemicelluloses solubilized in ultrapure water. Finally, the dialysate consisting of hemicelluloses was freeze-dried.

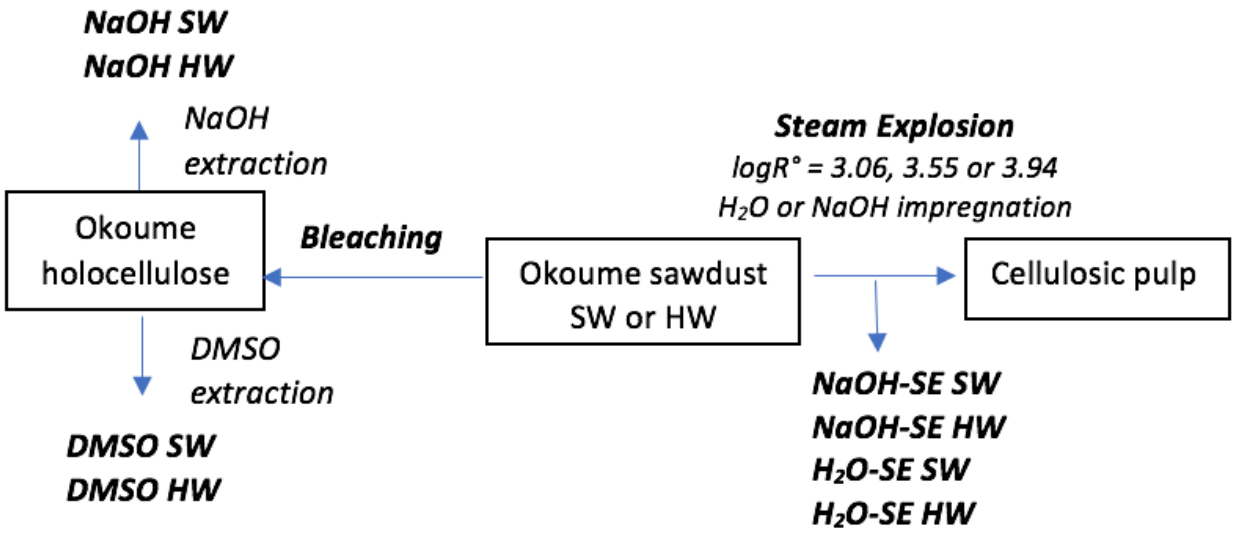


Figure 39. Experimental procedures for hemicelluloses extraction from okoume sawdust

2.4 Measurement of monosaccharides and uronic acids by HPEAC-PAD

The processing and analysis of the chemical composition of the extracts was performed using the National Renewable Energy Laboratory (NREL/TP-510-42618) standard. Monosaccharide and uronic acid concentrations were quantified by high performance anion exchange chromatography coupled with a pulsed amperometric detector (HPEAC-PAD: Dionex ICS-3000). The separation was carried out on a CarboPac PA20 (Dionex) column at a temperature of 35 °C and with an isocratic eluent flow rate of 0.4 mL.min^{-1}, with the following composition: 99.2 % ultrapure water / 0.8 % of 250 mM NaOH (0−20 min) ; 75 % ultrapure water / 20 % of 250 mM NaOH / 5 % 1 M of CH_3COONa - 20 mM NaOH (20−37 min) and 40 % of ultrapure water / 20 % 250 mM of NaOH / 40 % of 1 M CH_3COONa - 20 mM of NaOH (37−45 min) The separation was performed within 45 minutes. Calibration was performed with seven calibration points. This method allowed the simultaneous identification of the following sugars: galactose (Gal), glucose (Glc), mannose (Man), rhamnose (Rha), xylose (Xyl), arabinose (Ara), and glucuronic acid GlcA and galacturonic acid (GalA).

2.5 Determination of acetic acid by high performance liquid chromatography (HPLC)

The acetic acid content of hemicelluloses was determined by adapting the protocol of (Xiaoping Yuan et al., 2006). 1000 µL of the oligosaccharide solution (10 mg in 5 mL of water)) were saponified with NaOH (1250 µL at 0.4 M) for 2 hours in the dark, at room temperature, in a 5 mL volumetric flask. The reaction was stopped by addition of H_3PO_4 at 0.4 M. This solution was analyzed by high performance liquid chromatography coupled with a UV detector (Shimadzu Prominence) using a Rezex™ RHM-Monosaccharide H^+ (8 %) column with sulfuric acid (H_2SO_4 - 5.10-3 M) as the mobile phase with an isocratic flow rate of 0.8 $mL.min^{-1}$ and a temperature of 60 °C; the wavelength for detecting acetic acid was 210 nm. An external calibration with 6 calibration points was performed.

2.6 Steric Exclusion Chromatography

Prior to the analysis, 5 mg of hemicelluloses were dissolved in 2.25 mL of 0.25 M NaNO3. Molecular weight distributions of hemicelluloses extracts were determined by size exclusion chromatography coupled with a refractive index detector (Shimadzu Prominence). Two columns coupled in series were used (Phenomenex GFC-P2000, 3000) to separate hemicelluloses. The elution temperature was 35 °C and the eluent consisted of 0.25 M NaNO3 with a flow rate of 0.7 $mL.min^{-1}$. Pullulan standards of known molar masses were used for calibration.

2.7 Fourier transform infrared spectroscopy

The hemicelluloses obtained were subjected to Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) analysis. The infrared spectra were performed using a Thermo Scientific Nicolet 7600 IR-FT spectrometer over a frequency range between 4000 cm^{-1} and 650 cm^{-1}.

2.8 HSQC 2D NMR and calculation of the Degree of Acetylation (DS)

The 2-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) analyses of heteronuclear singular quantum coherence (HSQC) were performed on a 400 MHz Bruker instrument with a standard Bruker program. The hemicelluloses from the steam explosion and those extracted by NaOH from the bleached wood were dissolved in 99.7 % deuterium oxide (D2O), while the hemicelluloses extracted by DMSO from the bleached wood were dissolved in 99.9 % dimethyl sulfoxide d6 (DMSO-d6). The

number of collected complex points was 1024 for the ^{1}H-dimension with a relaxation of 1.5- and 256-time increments were recorded in ^{13}C-dimension. HSQC spectra were taken at room temperature.

The calculation of DS(Ac) Xyl*p* and DS(Ac) Man*p* are given below in Eq. 2 and 3.

Eq 1.

$$\mathrm{DS(Ac)}\ Xylp = \frac{\frac{[\mathrm{Ac}]^{\mathrm{a}}}{[\mathrm{Man+Xyl}]^{\mathrm{b}}}}{1+\frac{[\mathrm{Man\ Ac}]^{\mathrm{c}}}{[\mathrm{Xyl\ AC}]^{\mathrm{c}}}}$$

Eq 2.

$$DS(Ac)\ Manp = \frac{[Ac]^{a}}{[Man + Xyl]^{b}} - DS(Ac)\ Xly$$

a) Acetyl content determined by HPLC; b) Sugars content determined by HPEAC-PAD; c) Integration ratio by HSQC-NMR

3 Results and discussion

3.1 Composition

The compositions of okoume sapwood (SW) and heartwood (HW) used in this study and given in the Table 11 are in accordance with previous studies reported by Safou-Tchiama et al. (2007) (Safou-Tchiama et al., 2007a). In the present study, a comparable amount of Klason lignin and glucose and a substantially lower proportion of xylose and mannose was found.

Table 11. Chemical composition (% of dry wood) of raw wood

	SW[a]	HW[b]
Extracts[a]	2.36 ± 0.31	2.00 ± 0.41
Klason lignin	29.68 ± 1.58	28.02 ± 0.37
Fuc	0.02 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Rha	0,27 ± 0.04	0.24 ± 0.05
Ara	0.52 ± 0.04	0.11 ± 0.01
Gal	0.68 ± 0.01	0.56 ± 0.02
Glc	50.73 ± 0.15	54.19 ±1.66
Xyl	11.34 ± 0.04	10.16 ± 2.41
Man	2.23 ± 0.03	2.09 ± 0.15
GalA	0.49 ± 0.28	0.64 ± 0.04
GlcA	0.13 ± 0.04	0.08 ± 0.07

Means of three independent analyses. [a]Sapwood ; [b]Heartwood ; [c]Toluene-ethanol-methanol extracts (see Material & methods section)

The polymeric hemicelluloses were recovered after SE of okoume SW and HW from the liquid stream of the process by ethanolic precipitation and dialysis. Two different impregnation conditions of wood sawdust prior to SE were examined (neutral and alkali impregnation) and three different experimental conditions (170 °C-10 min, 190 °C-8 min, 210 °C-5 min) in order to examine the influence of the treatment severity on the extract yields and compositions. In this study the severity parameters (S°) which combine temperature and duration of the SE treatment have been used (see Material and Methods section and Table 12). The condition sets used in this study were selected considering previously described works (Chadni et al., 2019b). For comparison purposes, hemicelluloses were also recovered from okoume SW and HW holocellulose (after bleaching) with two commonly used methods with DMSO and with sodium hydroxide. It was reported that alkali solutions allow the extraction of hemicelluloses from bleached pulps with high yields especially for xylans. Alkaline treatment can cleave ester groups of lignocellulosic complexes in the cell wall and causes the swelling of cellulose facilitating the dissolution of hemicelluloses. On the other hand, DMSO extraction is used for the recovery of slightly modified hemicelluloses, close to their native structures but with lower yields (Evtuguin et al., 2003b). Naturally acetylated hemicelluloses have been isolated using this procedure.

3.2 Hemicelluloses yields

Figure 40. gives the hemicelluloses yields recovered from SW and HW after precipitation and dialysis for all the experimental conditions used in this study. As expected, from bleached pulps, higher yields were observed for alkali extractions compared to DMSO method. It is well known that unlike DMSO, alkali treatment can cleave ether and ester linkages between polysaccharides and lignin and effectively releases hemicellulose. The hemicellulose yields recovered by SE from non-bleached SW and HW are closed to those previously reported for spruce and are between 2 % and 6 % w / w (Chadni et al., 2019b). For the reasons mentioned above, a basic impregnation of wood prior to SE has led to higher yields. However, in these latter conditions and in accordance with previous works, an increase of the SE severity led to a decrease of hemicelluloses yields due to degradation reactions such as peeling and alkaline hydrolysis(Chadni et al., 2020, 2019b).

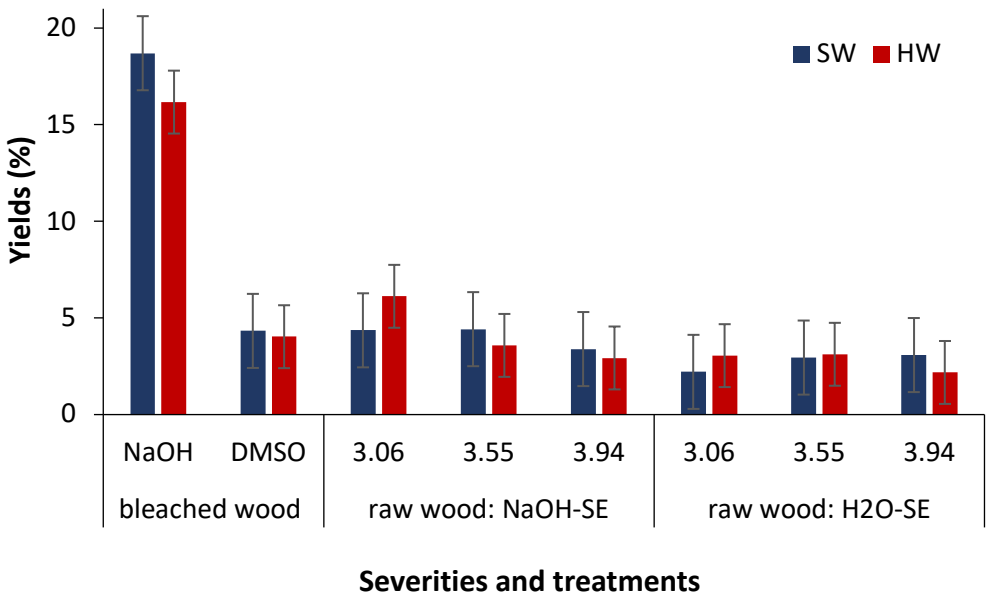


Figure 40. Polymeric hemicelluloses yields (% of dry mass of the initial wood)

3.3 Sugar compositions and molecular masses

The composition of the hemicelluloses isolated has been established in terms of monomeric sugars by ionic chromatography after a controlled acidic hydrolysis (see experimental section). The quantification of 4-O-MeGlcU being not possible by our chromatographic method, its content was estimated by HSQC NMR (see section 3.3).

The average compositions in sugars corresponding to the 8 extraction conditions applied to SW and HW are given in Table 12. The weight average molecular masses Mw of the polysaccharides, assessed by water-based sized exclusion chromatography, are given in Table 12 Number average (Mn) molecular weights and polydispersities are given in Supplementary Data section S1. Whatever the experimental parameters and starting materiel (SW or HW), for all the extractions involving alkaline conditions (classical alkali extraction or SE after basic impregnation), hemicellulosic extracts were of high molecular weights (Mw ≈ 60 – 100 kDa) and mainly composed of xylose with a relatively high proportion of 4-O-MeGlcU suggesting the recovery of polymeric glucuronoxylans (ratio 4-O-MeGlcU / Xyl ≈ 0.35). Xylose was the predominant sugar accounting for 65 % to 70 % of total amount of hemicellulosic sugars. It has been reported that in hardwood about 60 % of non-cellulosic sugars was xylose(Willför et al., 2005).

Table 12. Composition of sugars, acetic acid (% of dry mass of hemicelluloses molar mass of hemicelluloses) and average (Mw in kDa) of hemicelluloses

Treatment		Impr[a]	S°[b]	Xyl[c]	GlUOMe[d]	Man[c]	Glc[c]	Ara[c]	Gal[c]	Rha[c]	GalA[c]	GlcA[c]	Ac[e]	Mw[f]
NaOH[e]	SW			43.1 ± 1.0		n.a	1.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.0	2.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0	-	64
	HW			34.1 ± 2.6	11.1	n.a	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.6 ± 0.2	0.3 ± 0.0	-	56
DMSO[g]	SW			16.0 ± 0.8	1.3	17.0 ± 0.6	27.4 ± 1.6	0.7 ± 0.0	1.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.0	4.1	29
	HW			44.3 ± 0.3	2.2	11.5 ± 0.4	11.0 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.0	24
Steam explosion[h]	SW	H_2O	3.1	47.7 ± 1.7	2.4	11.3 ± 0.8	9.3 ± 0.3	0.5 ± 0.0	5.4 ± 0.2	4.6 ± 0.1	5.4 ± 0.2	9.3 ± 0.2	8.4	9
		H_2O	3.6	44.5 ± 1.5		5.6 ± 0.2	25.7 ± 1.0	0.4 ± 0.0	4.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.2 ± 0.0	8.1	26
		H_2O	3.9	29.4 ± 0.1		4.9 ± 0.0	34.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0	3.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.1 ± 0.0	8.0	21
	HW	H_2O	3.1	54.9 ± 11.7	1.1	2.6 ± 2.6	1.2 ± 0.8	2.2 ± 2.0	10.1 ± 5.5	1.9 ± 1.7	6.8 ± 0.2	0.8 ± 0.0	6.2	10
		H_2O	3.6	44.7 ± 2.1		2.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	3.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.2 ± 0.0	7.7	11
		H_2O	3.9	64.4 ± 1.9		4.2 ± 0.2	3.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	5.6 ± 0.2	1.5 ±0.0	2.0 ± 0.1	0.3 ± 0.0	6.6	6
	SW	NaOH	3.1	30.7 ± 1.1	10.1	n.a	0.8 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1	-	97
		NaOH	3.6	24.1 ± 1.3		0.2 ± 0.1	11.8 ± 0.7	1.7 ± 0.1	3.0 ± 0.2	1.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-	104
		NaOH	3.9	30.4 ± 0.1		0.2 ± 0.0	5.6 ± 0.0	1.6 ± 0.0	1.7 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	-	86
	HW	NaOH	3.1	44.1 ± 1.0	15.9	n.a	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0	-	64
		NaOH	3.6	29.0 ± 5.4		0,1 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	-	69
		NaOH	3.9	40.1 ± 6.3		0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	70

[a]Impregnation conditions prior to SE ; [b]Severity factor of SE ; [c]Xylose, mannose, glucose, arabinose, galactose, Rhamnose, galacturonic and glucuronic acid %, determined after hydrolysis by HPEAC-PAD ; [d]estimation by HSQC-NMR; [e]acetic acid quantified by HPLC after saponification ; [f]determined by SEC ; [g]extraction from holocellulose ; [h]extraction from wood by SE

Interestingly, it appears from Table 11 that glucuronoxylans of higher molecular masses were recovered with NaOH-SE extraction compared to classical alkali extraction performed from bleached pulp. This observation is in accordance with previous works, the structure of the recovered hemicelluloses from SE being strongly influenced by the rapid pressure release step which open the wood structure and limit the chemical degradations (Wojtasz-Mucha et al., 2017).

The compositions of the extracts isolated with DMSO displayed a very different pattern. A lower proportion of 4-O-MeGlcU was observed (ratio 4-O-MeGlcU / Xyl ≈ 0.05-0.08). Relatively high contents in mannose and glucose suggested the co-extraction of glucomannans (GM). A difference in composition was clearly observed between SW and HW, with a higher glucomannan content in SW. For H_2O-SE extraction, similar trends have been observed with higher GM co-extraction. The relatively high GM content in SW was confirmed from H_2O-SE extracts. GM have been reported to be the second most abundant hemicellulose in hardwood (Sjöström, 1993b). In addition, Willford at al. reported a relatively high GM content in hardwood SW with varying proportions depending on the species. Mannose accounted for about 10 % of the sugars in Populus deltoides SW against only 1 to 2 % in Acacia crassicarpa SP (Willför et al., 2005).

As expected the molecular masses of hemicelluloses extracted with DMSO and water-SE were significantly lower. DMSO method solubilizes relatively low molecular mass polysaccharide fragments. (Teleman et al., 2003a)extracted GM from birch and aspen wood with DP ≈ 16.21 Chadni et al. extracted galactoglucomannans from spruce by H_2O-SE in the same range of severity, producing polysaccharides with comparable molecular masses (≈ 20 kDa) (Chadni et al., 2020, 2019b). The relatively low molecular masses obtained using these conditions are justified by the well-known acid-catalyzed hydrolysis of glycosidic linkages in hemicellulose chains.

Table 13. Chemical shifts (ppm) of ^{1}H NMR spectra (S=3.1)

	Impregnation	Structural Units	Attributions						
			1	2	3	4	5eq	5ax	6
SW	NaOH	Xyl (isol.)	4.31	3.28	3.55			3.40	
		Xyl (Xyl-Ac)	4.42	3.23				3.35	
		α-Ara-3Xyl				4.27			
		MeGlcA		3.51	3.73	3.16	4.31		
	H_2O	Xyl (isol.)	4.31	3.8	3.57	3.79		3.40	
		Xyl (Xyl-Ac)	4.41	3.23	3.55	3.76		3.39	
		Xyl-3Ac	4.58	3.47	4.98	4.93			
		Xyl-2Ac		4.57	3.62	3.86			
		Xyl-2.3Ac			5.12	4.07			
		Xyl-2Ac-2MeGlcA			5.02				
		α-Ara-3Xyl	5.36			4.26			
		Xyl-2.3Ara	5.22						
		Man (Man-Ac)		4.03	3.65				
		Man-2Ac	4.88	5.44					
		Man-3Ac		4.17					
		MeGlcA	5.29	3.57	3.72			4.31	
HW	NaOH	Xyl (isol.)	4.41	3.28				3.37	
		Xy(Xyl-Ac)	4.42	3.23	3.53			3.36	
		α Ara-3Xyl				4.26			
		Xyl-2.3Ara	5.23						
		MeGlcA		3.57	3.73	3.16		4.31	
	H_2O	Xyl (isol.)	4.41	3.28	3.55	3.79		3.40	
		Xyl(Xyl-Ac)	4.42	3.23	3.54	3.76		3	
		Xyl-3Ac	4.56	3.49	5.0	4.93			
		Xyl-2Ac		4.57	3.62	3.88			
		Xyl-2.3Ac			5.12	4.04			
		Xyl-2Ac-2MeGlcA			5.01				
		α Ara-3Xyl				4.27			
		Xyl-2.3Ara	5.23						
		Man (Man-Ac)		4.03	3.65				
		Man-2Ac	4.90						
		Man-3Ac		4.17					
		MeGlcA		3.57	3.72	3.16	4.31		

Xyl (isol.): non-acetylated Xyl*p* unit in the skeleton isolated from another acetylated unit; Xyl (Xyl-Ac): non-acetylated Xyl*p* unit linked with an acetylated neighbor; Xyl-3Ac: 3-O-acetylated Xyl*p* unit; Xyl-2Ac: 2-O-acetylated Xylp unit; Xyl-2,3Ac: 2,3-di-O-acetylated Xyl*p* unit; Xyl-3Ac-2GlcA: Xyl*p* unit carrying a 2-O- and 3-O-acetylated MeGlcA; a-Ara-3Xyl: Ara terminal O-3 bonded to a monosubstituted Xyl*p* unit; MeGlcA: O-2 bonded MeGlcA terminal residue; a-Ara-3Xyl: Ara terminal O-3 bonded to a monosubstituted Xyl*p* unit; MeGlcA: O-2 bonded MeGlcA terminal residue.to monosubstituted Xyl*p* and also 3-O-acetylated.

3.4 FTIR characterization

FT-IR spectra of SE hemicelluloses from HW (H_2O - SE and NaOH - SE) are presented in Figure 41. FT-IR spectra of the other hemicellulose fractions isolated in this study are given Supplementary Data section S2. In H_2O-SE and DMSO extracts, the band at 1730 cm^{-1} is due to carbonyl groups stretching indicating that the hemicellulosic fractions isolated in neutral conditions are acetylated. This observation was confirmed by the presence of high-intensity band at 1244 cm^{-1} assigned to C-O deformation bonds of ester functions (Rowley et al., 2013). The bands at 1508 cm^{-1} (δC-C) and 1460 cm^{-1} (δC-H of CH_3-O groups of S and G units) suggest the presence of a high amount of residual lignin in hemicelluloses extracted in basic medium (Lv et al., 2015; Sun et al., 2012). It also can be observed that the band at 895 cm^{-1}, assigned to C1-H bonds of β -(1-4)- Xyl*p* chain (Sun et al., 2016), is stronger in H_2O-SE. This is in accordance with the higher xylose contents detected by chromatography in the H_2O-SE extracts (section 3.3).

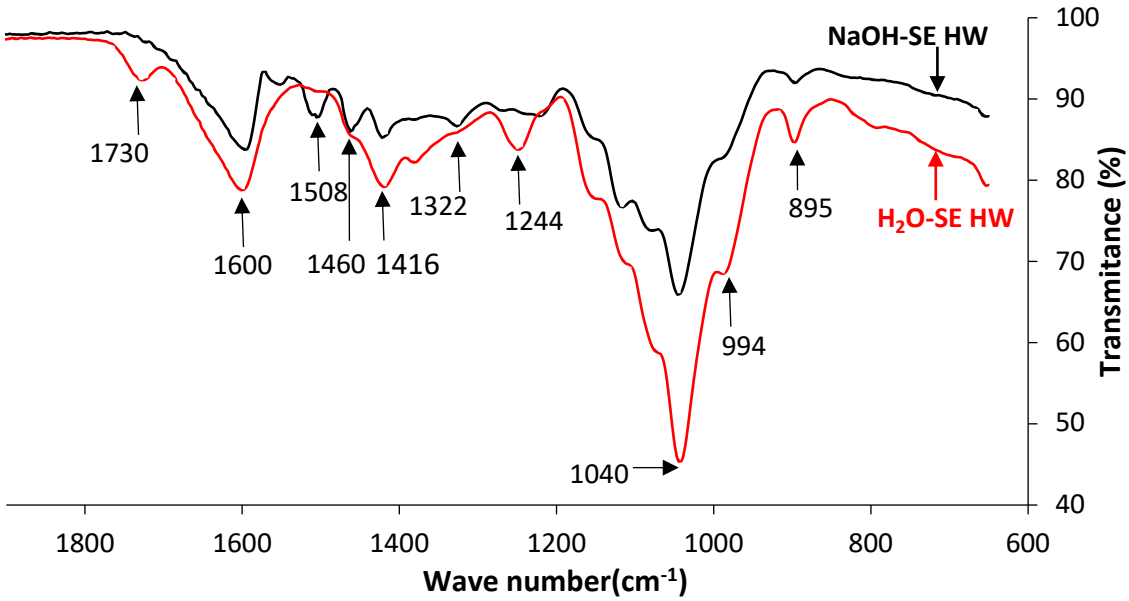


Figure 41. FT-IR Spectra of SE-extracted hemicelluloses (H_2O - SE HW and NaOH - SE HW, S = 3.1)

3.5 NMR characterization and acetylation degree

The sugar compositions of the hemicellulosic fractions were confirmed by a 2D NMR study ^1H-^{13}C HSQC. The spectra were in good accordance with published data of GX and GM. For HW, the main signals were assigned to sugar residues contained in GX (4-O-MeGlcUp and Xyl*p*) (Evtuguin et al., 2003b; Teleman et al., 2003b; Zhao et al., 2017). In SW spectra additional cross-

linked signals of lower intensities and assigned to Man*p* and Glc*p* were detected attesting the presence of GM (Campestrini et al., 2013a; Martínez-Abad et al., 2018). HSQC NMR spectra of hemicellulosic fractions are given in Figure 42 and in Supplementary Materials section S3. The ^{1}H / ^{13}C cross peaks assignments are given in Table 13.

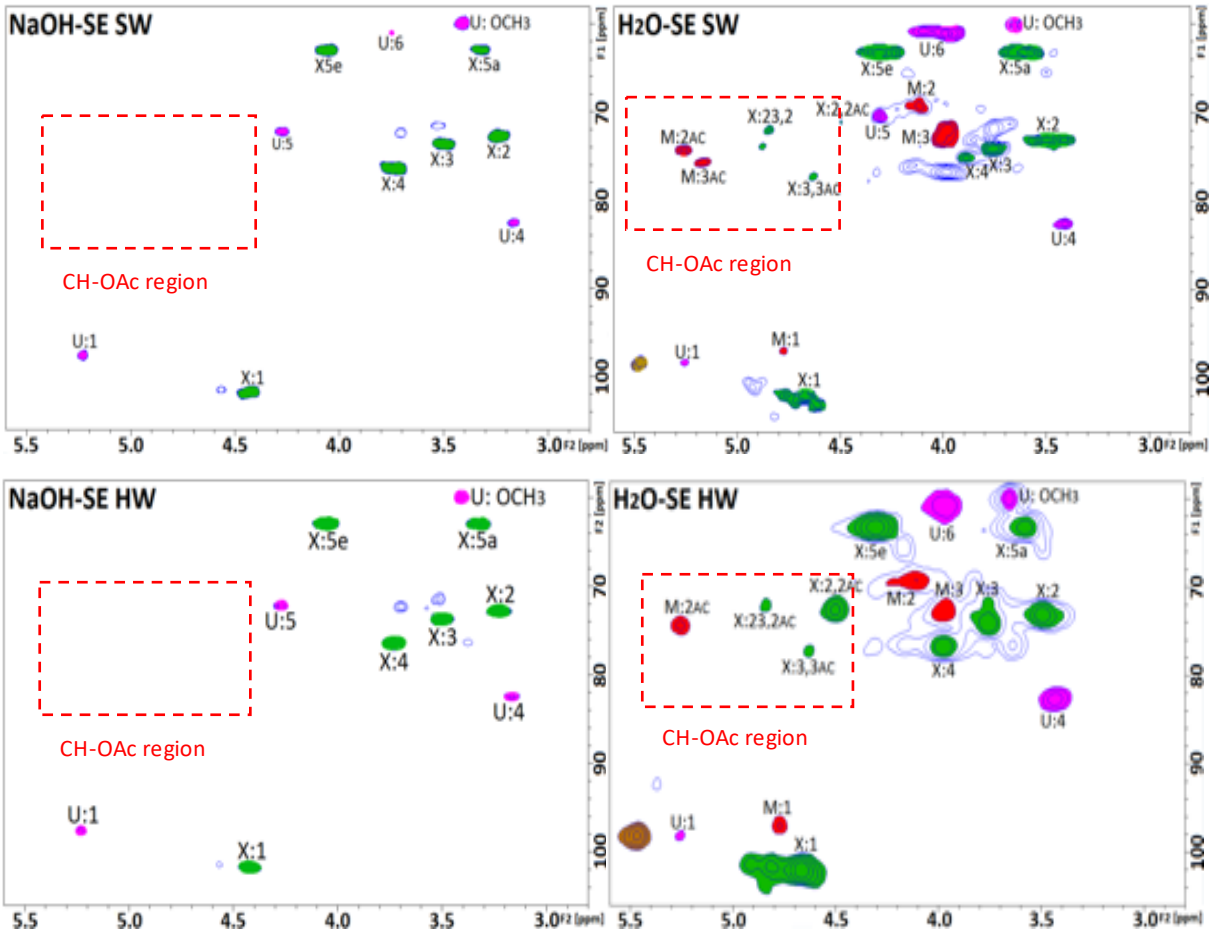


Figure 42. 2D HSQC NMR Spectral analysis of SE extracted hemicelluloses (S=3,1). X: (1→4) β-D-Xylopyranosyl ; U: 4-O-methyl- β -D-glucuronic acid ; M: (1→4) β -D-Mannosyl; G: (1→4) β -D- Glucosyl ; Ac: acetyl.

In accordance with the FT-IR data, NMR data showed that hemicelluloses recovered with DMSO and H_2O-SE are all acetylated. This was confirmed by ^{1}H NMR intense signals at ^{1}H at ≈ 2.0 - 2.2 ppm assigned to CH_3CO group (Supplementary Materials section S4). It has been shown that the presence of acetylated sugar residues in the polysaccharides backbone results in a large number of possible monosaccharide combinations and NMR cross-peaks signals, complicating the spectra considerably (Michalak et al., 2018). In alkali conditions, deacetylated polysaccharides were recovered because of a further deacetylation by saponification reactions (Figure 42).

For DMSO and H_2O-SE hemicelluloses fractions, the acetylation degree was determined by HPLC after saponification (Table 12). The ^{13}C / ^{1}H HSQC NMR correlations also helped to determine distribution patterns of O-acetyl groups in GM and GX backbone. (Evtuguin et al., 2003b) determined the ^{13}C / ^{1}H correlations of acylated heteroxylans backbone by homonuclear (TOCSY) and heteronuclear (HSQC) NMR experiments. (Campestrini et al., 2013a) characterized acetylated GM by NMR and other techniques. More recently, lignin carbohydrate complexes (LCC) extracted from birch hardwood have been analyzed by 2D NMR (HSQC and TOCSY). Martínez-Abad et al. (2018) described the assignment of the main ^{13}C / ^{1}H HSQC signals of partially acylated GX and GM in the LCC complex by HSQC NMR. In this study, the ^{1}H and ^{13}C chemical shifts for the [O- Ac(1→2/3)- β- D- Xyl*p*] and [O-Ac(1→2/3)-β-D-Man*p*] are in good agreement with the values reported earlier. Based on previous studies and using the data from NMR, HPLC and HPEAC-PAD, a semi-quantification of O-2, O-3 and O-2,3 acetyl units in xylan and mannan backbones was performed (Giummarella and Lawoko, 2017a).

The results regarding the acetylation pattern are gathered in Tableau 4. In DMSO, very different acetylation patterns were observed for SW and HW. Interestingly, SW hemicelluloses are more highly acetylated than HW (4.1 % and 1.0 % respectively). A comparable trend was observed for the water-SE extracts with significantly higher acetyl contents (6.2 % and 8.4 % for HW and SW respectively). It has been previously reported that hemicelluloses isolated from hardwood SW exhibited higher degree of branching and lower xylose content (Xiao et al., 2020) but, to our knowledge, a comparison of the acetyl content of SW and HW hemicelluloses has never been investigated. The higher acetylation degree of SW hemicelluloses reported in the present study could be one of the factors contributing to the higher porosity and water permeability of SW (Ramachandriya et al., 2014). In okoume SP, comparable results were obtained for DMSO and H_2O- SE in terms of acetylation pattern. Both GX and GM are O2 and O3 acetylated, the degree of acetylation being slightly higher for GM compared to GX (DS_{Ac} Man*p* ≈ 0.25 and DS_{Ac} Xyl*p* = 0.20 respectively). For HW, a significantly higher acetylation degree was also found for H_2O-SE compared to DMSO, GX being acetylated at position O2 and / or O3 (DS_{Ac} Xyl*p* = 0.26). These results are close to those previously obtained from spruce and the recovery of galactoglucomannans (GGM) by H_2O-SE with DS ≈ 0.27 – 0.35, very similar to the values reported for native Ac-GGM (Chadni et al., 2020, 2019b). Thus, these results confirm that SE allowed to extract highly acetylated and slightly modified polymeric hemicelluloses. The acetylation degree of hemicelluloses strongly affecting the physico-chemical properties of the resulting materials (e.g. barrier properties of films, (Kishani et al.,

2018), these experimental results could help to develop an extraction route from okoume waste wood for the design of films and materials with controlled properties.

Table 14. Acetylation degree of hemicelluloses

		Ac %[a]	DS_{Ac} Man*p*[b]	NMR δC / δH ppm	DS_{Ac} Xyl*p*[c]	NMR δC / δH ppm
DMSO	SW	4.1	0,24	***O*-2** 71.85 / 5.30 ***O*-3-**	0,18	***O*-2** 73.85 / 4.52 ***O*-3** 75.45 / 4.82
	HW	1.0	0,02	***O*-2** - ***O*-3** 73.36 / 4.96	0,04	***O*-2** 70.25 / 4.50 ***O*-3** 75.45 / 4.82
H_2O-SE	SW	8.4	0,25	***O*-2** 73.66 / 5.28 ***O*-3** 75.47 / 5.19	0,20	***O*-2** 71.02 / 4.50 ***O*-2,3** 72.00 / 4.84 ***O*-3** 77.13 / 4.64
	HW	6.2	0,08	***O*-2** 73.13 / 5.25 ***O*-3-**	0,26	***O*-2** 72.55 / 4.50 ***O*-2,3** 72.00 / 4.84 ***O*-3** 77.13 / 4.64

[a]Ac: Acetic acid (% of dry mass of hemicelluloses after saponification); [b]DS_{AC} Man*p*: Degree of substitution of mannose residue with acetyl groups; [c]DS_{AC} Xyl*p*: Degree of substitution of xylose residue with acetyl groups.

4 Conclusion

Steam explosion pretreatment was assessed for the extraction of high molecular weight hemicelluloses directly from okoume SW and HW and compared to traditional extraction methods with DMSO and alkali solution performed from bleached wood. The SE parameters which include a short steaming duration and a mechanical defibration limit the polysaccharide hydrolytic breakdown and enhance the efficiency of the subsequent extraction. The recovery of high molecular weight GX was performed using a SE treatment after basic impregnation. On the other hand, after a water pre-soaking, SE allowed the recovery of a mixture of highly O2 and / or O3 acetylated GX and GM. It clearly appeared that H_2O-SE preserved the acetyl moieties in a greater extent compared to the mild DMSO extraction. The results obtained in our study showed that (1) SE can be employed for the extraction of complex polysaccharides from wood for characterization purposes, (2) okoume wood hemicelluloses are primarily composed of highly acetylated GX with a relatively high amount of acetylated GM in the SW. The impact of this work could involve better recovery of waste from the okoume industry in Gabon with a view to the production of hemicellulose-based materials.

Acknowledgments:

The EA 4370 LERMAB is also supported by the French National Research Agency through the Laboratory of Excellence ARBRE (ANR-12-LABXARBRE-01). The National Agency of Fellowships of Gabon (ANBG) and Campus France are thanked for the financial support granted to the PhD student Errol MOUGNALA MOUKAGNI. The authors thank the NMR plateform, Institut Jean Barriol, CRM2, Lorraine University – CNRS.

Résultats complémentaires

S 1. Poids moléculaire (Mw) et polydispersité (IP) des les hémicelluloses extraites

En complément des résultats présentés dans le Table 12, le Tableau 15 rassemble les masses molaires moyennes en nombre (Mn) et en masse (Mw) ainsi que la polydispersité des hémicelluloses d'okoumé déterminées par la chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Tableau 15. Poids moléculaire (Mw), masse molaire en nombre (Mn) et polydispersité (IP) des hémicelluloses

Essais	Treatments		Impr[a]	S°[b]	Mw (kDa)	Mn (kDa)	IP[c]
1	NaOH	SW			64	50	1.3
2		HW			56	44	1.3
3	DMSO	SW			29	23	1.3
4		HW			24	22	1.1
5	Steam explosion	SW	H_2O	3.1	9	6	1.5
6			H_2O	3.6	26	22	1.2
7			H_2O	3.9	21	19	1.1
8		HW	H_2O	3.1	10	8	1.3
9			H_2O	3.6	11	9	1.2
10			H_2O	3.9	6	5	1.2
11		SW	NaOH	3.1	97	83	1.2
12			NaOH	3.6	104	89	1.2
13			NaOH	3.9	86	68	1.3
14		HW	NaOH	3.1	64	51	1.2
15			NaOH	3.6	69	56	1.2
16			NaOH	3.9	70	59	1.2

[a]Impregnation conditions prior to SE; [b] Severity factor of SE; [c] Polydispersity (Mw / Mn)

L'impact des conditions réactionnelles sur les masses molaires en masse (Mw) a déjà été discuté précédemment. Les résultats présentés dans le Tableau 15 montrent des indices de polydispersité (PD) très proches se situant dans l'intervalle 1,1 à 1,5. Ces faibles IP ne doivent pas éluder l'hétérogénéité des masses molaires des chaînes d'hémicelluloses obtenues à partir de différents types de prétraitements. Il a en effet été souligné en accord avec la littérature, que les conditions basiques permettaient la récupération de polysaccharides présentant des Mw significativement supérieurs. La présence de chaînes de grands poids moléculaires dans les solutions alcalines a été discutée par Sun et al., (2012) qui avait montré que les hémicelluloses solubles dans les alcalins (NaOH) avaient une structure plus linéaire et UN poids moléculaire moyen plus élevé que

les hémicelluloses hydrosolubles, les conditions alcalines permettant de réduire la cinétique des réactions de dégradation hydrolytique des polysaccharides (Rissanen et al., 2014)

De plus, il est à souligner que les fractions présentant des masses molaires les plus importantes (Mw ≈ 100 kDa, Mn ≈ 90 kDa, PI ≈ 1.2) ont été isolées par le procédé d'explosion à la vapeur en milieu basique (essais 11 à 16). Les polysaccharides extraits par ce procédé présentent des masses molaires sensiblement supérieures à ceux isolés par un procédé d'extraction classique solide/liquide (Mw ≈ 60 kDa, Mn ≈ 45-50 kDa, PI ≈ 1.3, essais 1 et 2). Ce résultat, en accord avec les travaux de Wojtasz - Mucha et al., 2017, pourrait être lié à l'étape de dépressurisation explosive. En effet, la décompression rapide provoque au sein du matériau des forces de cisaillement qui affectent sa porosité entraînant une augmentation de l'extractabilité des molécules et macromolécules qui le constituent (Kvist et al., 2018). Par ailleurs, les hémicelluloses extraites par explosion à la vapeur présentient Des poids moléculaires similaires à celles extraites du bois d'Épicéa dans les mêmes conditions (Chadni et al., 2019b). Toutefois, dans cette étude les hémicelluloses extraites par une solution alcaline après une délignification ont des Mw inférieurs à ceux de l'Eucalyptus (Xiao et al., 2020)

En outre, les valeurs des poids moléculaires des hémicelluloses solubles dans le DMSO sont inférieures à celles des hémicelluloses extraites par une solution alcaline après une délignification des sciures. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres biomasses telles que les cultures de *Neosinocalamus affinis* de différents âges (Yue et al., 2018a) et le *Caragana korshinskii* (Bian et al., 2010).

De façon globale, les poids moléculaires des hémicelluloses d'aubier sont supérieurs à ceux du bois de cœur, et ce quel que soit le traitement. Cette tendance a été observée pour les hémicelluloses extraites à partir du bois d'Eucalyptus (Xiao et al., 2020).

S 2. Spectres IRTF des hémicelluloses extraites par (A) : DMSO, (B) : NaOH-SE ; (C) : H_2O - SE

Les hémicelluloses extraites à partir de bois de cœur d'okoumé par explosion à la vapeur ont été décrites précédemment. Sont présentés ici les spectres ITRF des hémicelluloses extraites par le DMSO ainsi qu'une comparaison bois de cœur/aubier des fractions extraites par explosion à la vapeur (Figure 43).

Les spectres FTIR présentés sur la Figure 43, montrent des profils typiques des hémicelluloses observés par plusieurs auteurs dans d'autres matériaux lignocellulosiques tels que l'Eucalyptus (Chadni et al., 2019c, 2019a; Morais de Carvalho et al., 2017a). On note que les hémicelluloses extraites avec le DMSO et le H_20-SE conservent la bande 1735 cm^{-1} caractéristique de l'étirement carbonyle (C=O) des fonctions ester ou acide carboxylique. Ce signal est en accord avec la présence d'acides acétique et uronique montrée par chromatographie (voir Table 12). La présence d'esters d'acide acétique issus de groupements acétyles a pu être confirmée par la présence d'une bande de forte intensité à 1234 cm^{-1} (pour les extraits de DMSO) et 1244 cm^{-1} (pour les extraits de H_20-SE) attribuée aux liaisons de déformation C-0 δ (C-O) des fonctions esters des xylanes (Rowley et al., 2013). Ces résultats confirment l'acétylation des extraits démontrée par RMN.

Quel que soit le mode d'extraction, toutes les chaînes d'hémicellulose contiennent la bande à 1595 - 1631 cm^{-1} attribuée à l'eau adsorbée et/ou aux acides uroniques ν(COO-) des chaînes d'hémicelluloses (Gil-Ramirez et al., 2018a). Cette bande était la plus forte pour le H_2O-SE-HW. La bande de 1508 cm^{-1} est absente dans les extraits DMSO et H_2O-SE alors qu'elle est fortement marquée dans les extraits NaOH-SE. Ce résultat confirme la présence d'une grande quantité de lignine résiduelle dans les hémicelluloses NaOH-SE. Les bandes supplémentaires à 1460 cm^{-1} attribuées aux déformations δ(C-H) des groupes CH_3-O des unités S et G sont en accord avec la présence de lignine (Lv et al., 2015; Xue et al., 2012) dans les chaînes d'hémicellulose issues de l'extraction NaOH.

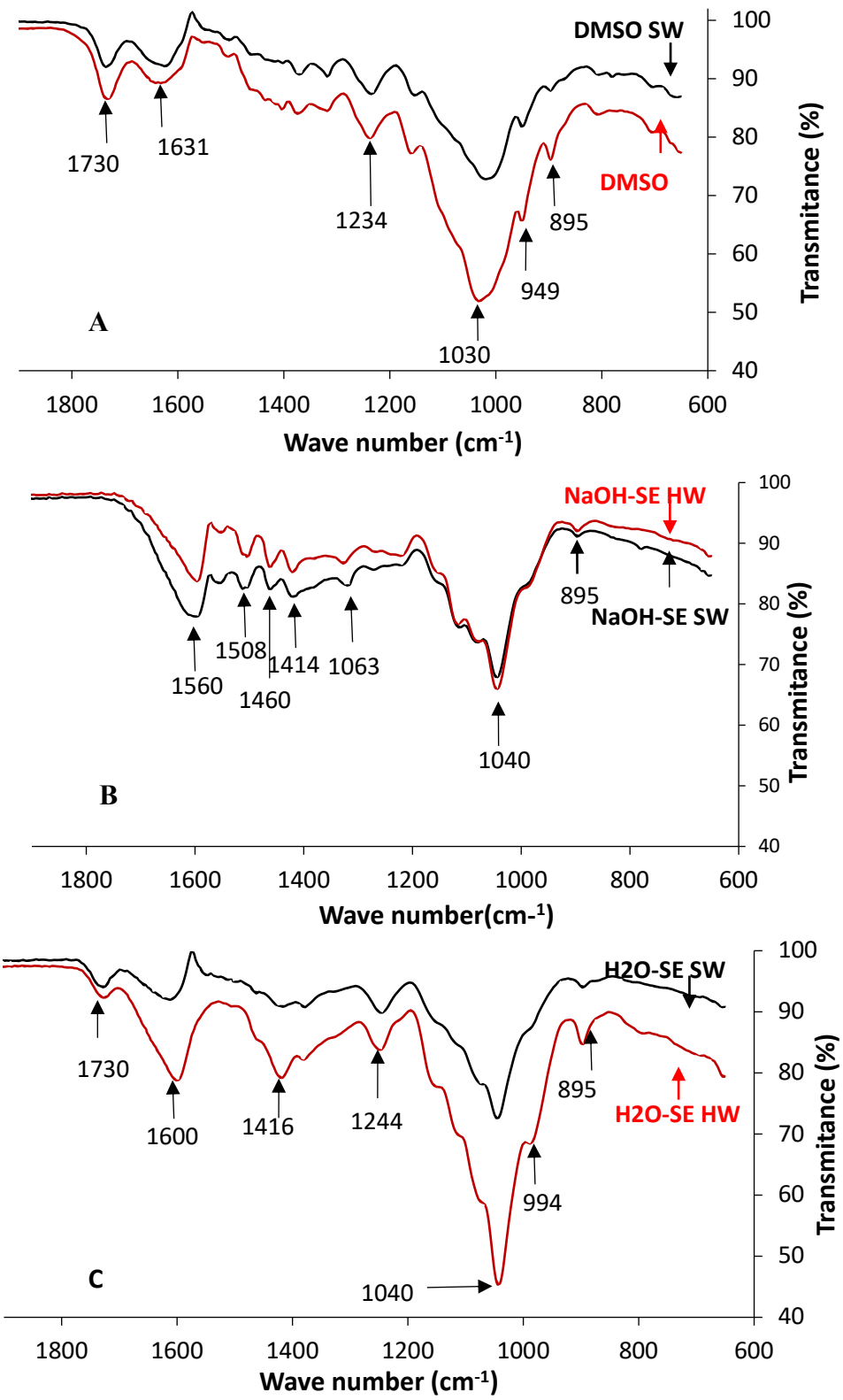


Figure 43. Spectres des hémicelluloses par le DMSO et par explosion à la vapeur (S = 3,1)

La bande à 895 cm^{-1} indiquant la déformation δ(C1-H) des vibrations du cycle ß des unités glycosidiques pourrait être attribuée aux liaisons C1-H de la chaîne ß-(1-4)-D-Xylopyranose (Xyl*p*). La forte intensité de cette bande a souligné la richesse de H_2O – SE - HW en xylose comme indiqué dans le Table 12 (sévérité = 3. 1). L'abondance des unités Xyl*p* dans les hémicelluloses extraites est renforcée par les vibrations à 1040 cm^{-1} des liaisons C-O et C-C des xylanes (Sun et al., 2016) ou des alcools acycliques secondaires des xylanes (Marques et al., 2019). L'empreinte plus nette de cette bande dans H_2O-SE-HW a mis en évidence la capacité de la SE à être une technique appropriée pour la récupération du xylose du bois d'okoumé.

S 3. Analyse spectrale 2D HSQC NMR des hémicelluloses extraites du bois blanchi. Avec X : (1➔4) *β*-D-Xylopyranosyle ; U : acide 4-O-méthyl-*α*-D-glucuronique ; M : (1➔4) *β*-D-Mannosyle ; G : (1 ➔4) *β*-D-Glucosyle ; AC : acétyle.

Les spectres RMN 2D HSQC des hémicelluloses extraites par le DMSO et par le NaOH à partir du bois délignifié sont illustrés à la Figure 44.

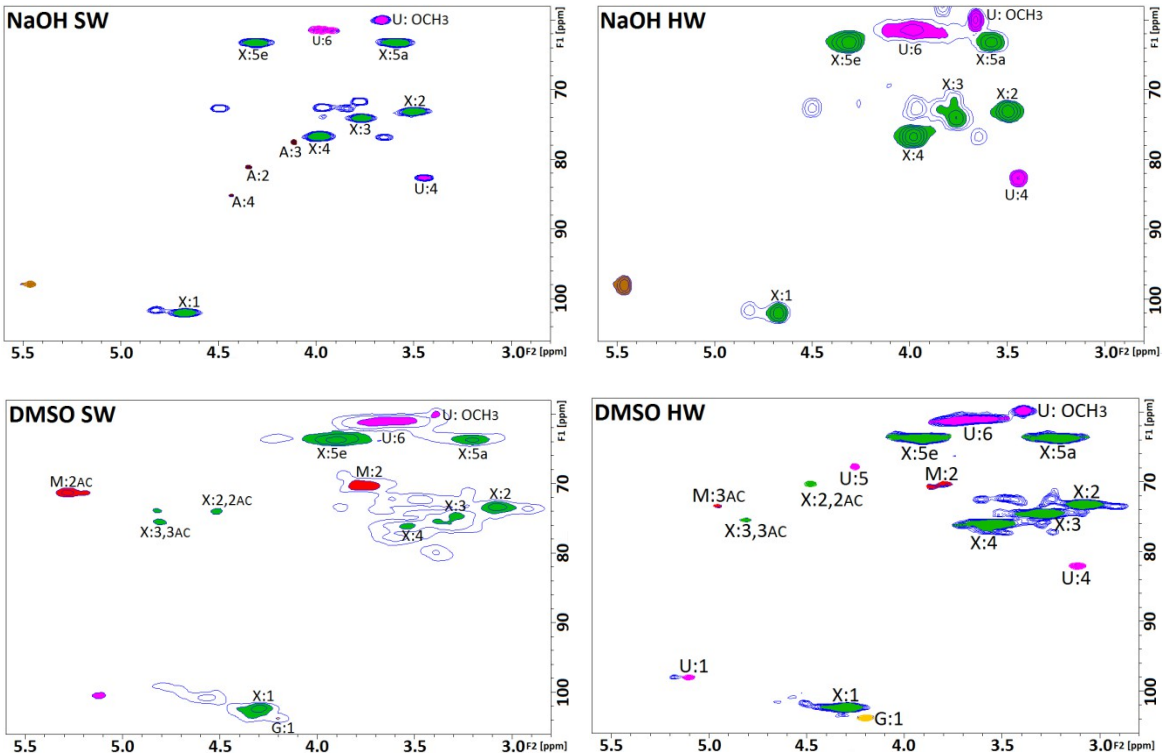


Figure 44. Spectres 2D HSQC NMR des hémicelluloses

Les attributions des différents signaux ont été effectués par rapport aux données de la littérature (Giummarella and Lawoko, 2017a; Peng et al., 2010a; Xue et al., 2012; Yue et al., 2018a). Les principaux signaux (ppm) détectés à 102,44 / 4,20 (C1-H1), 73,20 / 3,00 (C2-H2), 74,52 / 3,25 (C3-H3), 75,85 / 3,8 (C4-H4) 63,65 / 3,8 (C5e-H5e) et 63,65 / 3,13 (C5a-H5a) correspondent au squelette (1→4)-β-D-xylane. Les résidus du squelette (1→4)-β-D-mananne ont été détectés à 70 / 4,2 (C2-H2), pour les hémicelluloses extraites au DMSO. De plus, le signal des unités [O - Ac(1→2 / 3) - β-D-Xyl*p*] et le [O-Ac(1→2 / 3)-β-D-Manp] ont été détectés dans les extraits au DMSO. Les hémicelluloses extraites par le NaOH après une délignification ne présentent pas de groupes acétyles.

S 4. Analyse spectrale par RMN ^{1}H des hémicelluloses extraites par explosion à la vapeur (S = 3,1).

La RMN du proton a été utilisée en complément de la RMN HSQC pour identifier des domaines spécifiques structuraux des chaînes d'hémicelluloses de l'okoumé. Les spectres obtenus ont été renseignés sur la Figure 45.

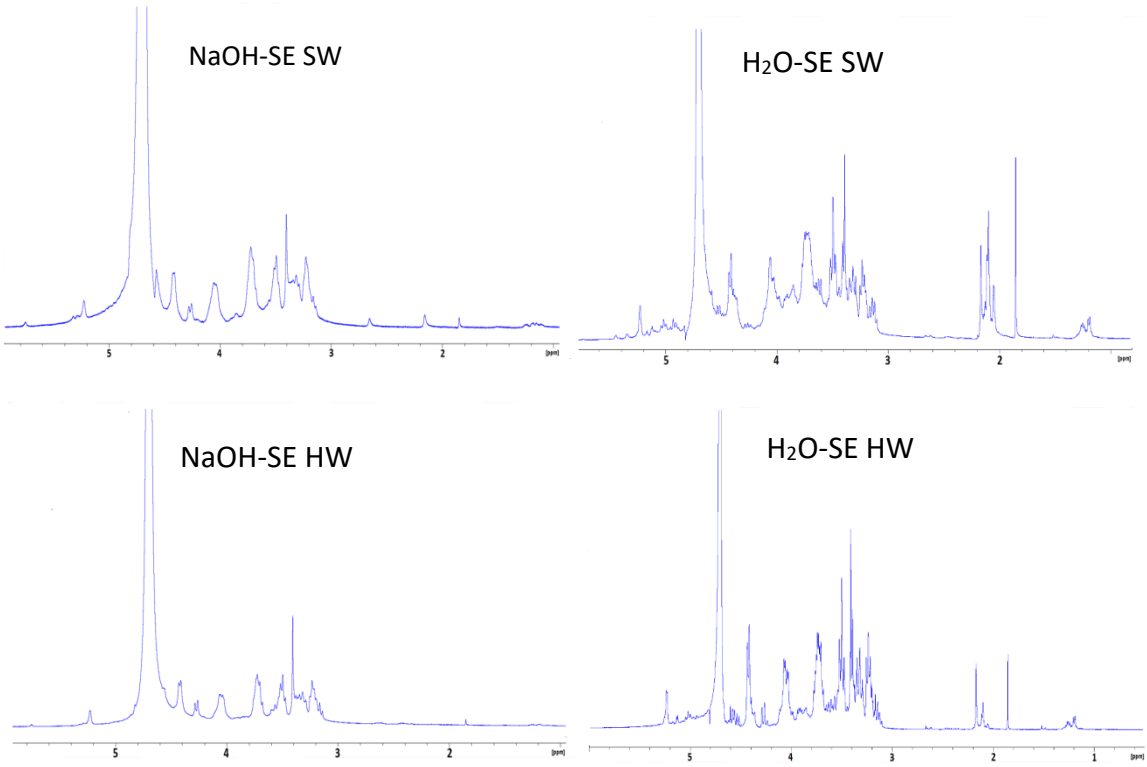


Figure 45. Spectres RMN ^{1}H des hémicelluloses (S = 3,1)

La présence de fonctions acétate dans les chaînes d'hémicelluloses H_2O-SE d'okoumé est confirmée par les pics à 2,16-2,10 ppm caractéristiques des protons méthyles des groupements acétyles (CH_3 - CO) (Morais de Carvalho et al., 2017a; Shatalov et al., 1999). L'absence de ces signaux dans les hémicelluloses NaOH-SE confirme la réaction de saponification des fonctions esters en milieu basique et est en accord avec la quasi absence des bandes à 1733 – 1726 cm^{-1} des spectres infrarouges des hémicelluloses NaOH-SE. De plus, les spectres RMN ^{1}H des hémicelluloses H_2O-SE montrent des pics à 5,12 ppm et à 4,99 ppm attribués respectivement aux H-3 des unités 2,3-di-O-acétylées de la chaine Xyl*p* et aux H-3 des unités 3-O-acétylées et substituées en O-2 par des résidus MeGlcA. Ces structures qui ont été identifiées dans les hémicelluloses de l'Eucalyptus (Carvalho et al., 2015; Morais de Carvalho et al., 2017a) ne sont pas présentes dans les hémicelluloses NaOH-SE. la présence des unités 2-O-acétylées de la chaine Xyl*p* (Xyl-2Ac) dans la chaîne d'hémicelluloses de H_2O-SE

SW et HW est également confirmée par les pics à 3,88-3,87 ppm (H-4) (Morais de Carvalho et al., 2017a) Les unités 2-O- et 3-O-acétylées de la chaine Xyl*p*, sont identifiées par les signaux à 4,57 - 4,54 ppm attribués aux H-2 et H-3 respectivement (Morais de Carvalho et al., 2017a; Shatalov et al., 1999; Yamagaki et al., 1997).

L'analyse des spectres RMN ^{1}H des hémicelluloses de SW et de HW d'okoumé montre aussi la présence de pics à 4,42-4,41 ppm que nous pouvons attribuer aux H-1 d'unités xylose liées à des unités adjacentes acétylées, Xyl (Xyl-Ac). Cet enchainement identifié dans les hémicelluloses de la paille de blé, de la bagasse et de l'Eucalyptus (Carvalho et al., 2015; Morais de Carvalho et al., 2017a; Zhao et al., 2017) montrent que les hémicelluloses de okoumé contiennent des enchaînements d'unités β-(1→4)-D-Xylopyranose ayant des groupements acétyles en O-2 et/ou les O-3.

La présence des unités *α*-D-MeGlcA est confirmée par les déplacements chimiques caractéristique fortement déblindés de leurs H-1 à 5,29 ppm (Shatalov et al., 1999) que nous notons en particulier chez les hémicelluloses H_2O-SE. L'existence de cet acide glucuronique dans les hémicelluloses de SW et de HW d'okoumé est aussi mis en évidence par ses H-2 et H-3 qui résonnent à 3,51-3,50 ppm et 3,73-3,72 ppm (Sun et al., 2012), respectivement. Par ailleurs, nous observons dans le spectre RMN ^{1}H des hémicelluloses H_2O-SE SW un signal à 5,36 ppm que nous pouvons attribuer aux H-1 des résidus arabinoses monosubstitués type *α*-(1→3)-L-arabinofuranose liés à la chaine Xyl*p* sur le O-3. (Morais de Carvalho et al., (2017) Signalons aussi que le pic à 5,23 ppm peut être également attribué aux résidus *α*–(1→2)-L-arabinofuranoses liés à la chaine *Xylp* sur le O-2 des xylanes di-substitués. Ces structures qui ont été identifiées dans la bagasse de canne à sucre et dans la paille de blé par Izydorczyk and Biliaderis, (1992) semblent être constitutives de la chaîne d'hémicelluloses de l'okoumé. De plus, la présence dans les hémicelluloses H_2O-SE des pics à 3,62-3,61 ppm, attribués entre autres aux H-1 des résidus *α*-L-arabinofuranoses (Xue et al., 2012) semble confirmer l'existence dans ces hémicelluloses, d'unités arabinoses liées à la chaîne principale de xylane. Cette hypothèse est appuyée par les pics à 3,51-3,50 ppm que l'on note dans toutes les hémicelluloses de l'okoumé, ces pics ont été attribués aux H-5 axiaux (ax) des *α*-L-arabinofuranoses chez les hémicelluloses des bambous (Sun et al., 2012).

D'autres composés tels que le galactose ont été identifiés parmi les sucres simples des chaînes d'hémicelluloses de l'okoumé, mais leurs déplacements chimiques apparaissent superposés à d'autres composés. Ils seraient identifiables à 4,98, 4,09, et 3,94 ppm correspondant respectivement aux pics des H-1, H-4 et H-3 des unités *α*-D-*Galp* (Shatalov et al., 1999)(Shatalov et al., 1999).

S 5. RMN ^{13}C des hémicelluloses provenant de l'explosion à la vapeur (S = 3,1). (a) : H_2O- SE SW et (b) : H_2O- SE HW

Les hémicelluloses ont été également analysées par spectroscopie RMN du carbone. Les spectres H_2O-SE obtenus sont indiqués sur la Figure 46, et les déplacements chimiques caractéristiques sont renseignés dans le Tableau 16.

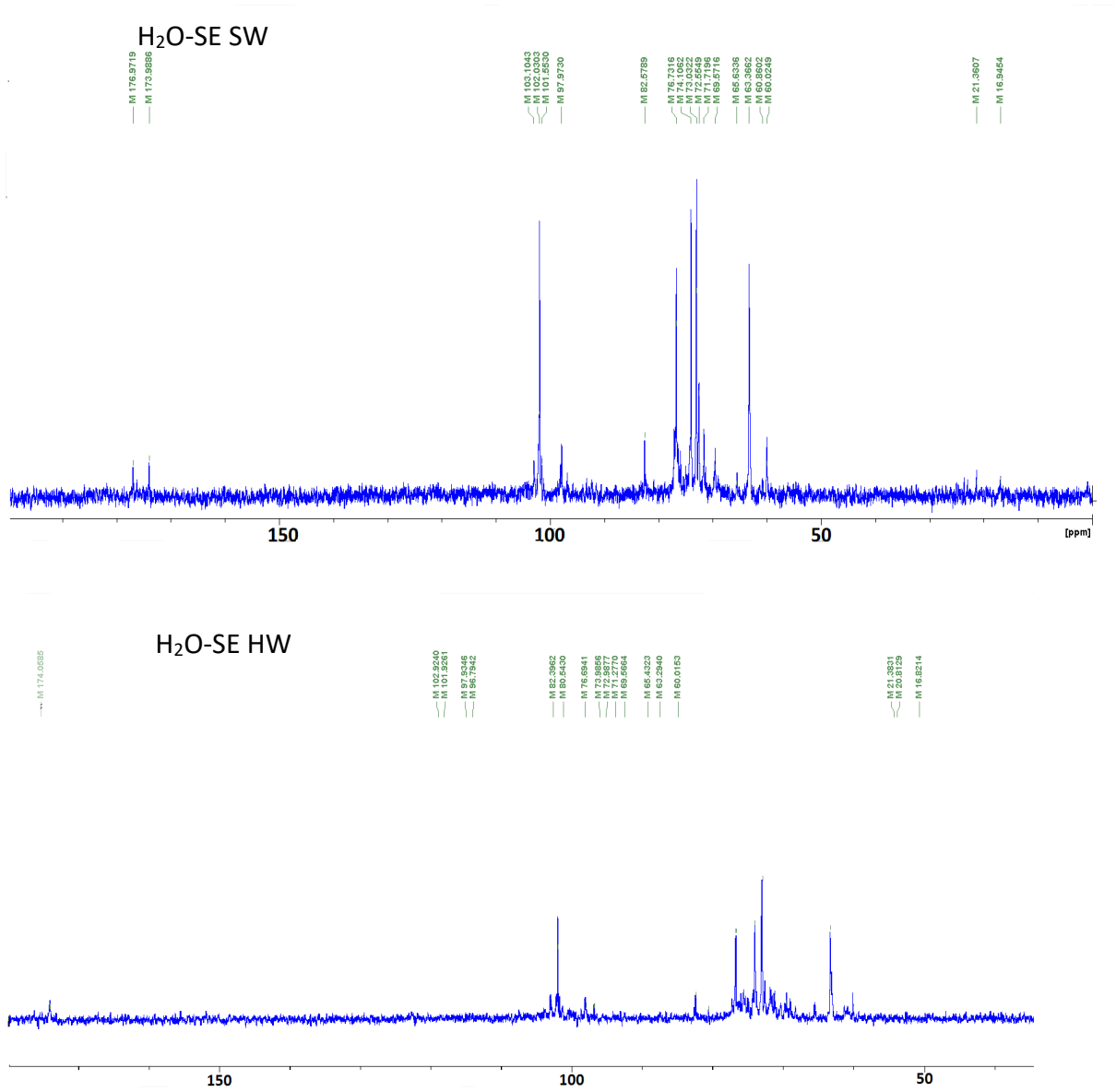


Figure 46. Spectres RMN ^{13}C des hémicelluloses (S =3,1)

En accord avec de la littérature (Shatalov et al., 1999; Xue et al., 2012), les pics à 101,86 - 101,63, 76,69-76,39, 73,85-73,62, 72,79-72,46 et 62,97-63,20 ppm représentent

respectivement, les C-1, C-4, C-3, C-2 et C-5 des unités β-(1→4)-D-xylanes de ces hémicelluloses. On révèle des pics à 97,92-97,46, 82,41-82,64, 71,30-69,45 ppm correspondant respectivement aux C - 1, C-4 et C-5 des β-(1→4)-D-MeGlcA (Shatalov et al., 1999 ; Sun et al., 2012) qui confirment la présence des résidus d'acides glucuroniques dans les chaînes d'hémicelluloses de l'okoumé.

Les fonctions carbonyles des groupements acides carboxyliques (HO-C=O) et les carbones des CH_3-O- en rapport avec les pics à 173,98-174,00 ppm et 59,95-60,02 ppm respectivement, prouvent aussi l'existence des résidus d'acides *α*-D-MeGlcA dans les chaînes d'hémicelluloses de SW et de HW d'okoumé.

Tableau 16. Déplacements chimiques (ppm) des spectres RMN ^{13}C des hémicelluloses d'okoumé (S=3,1)

	Unités structurales	Attributions (ppm)							
		1	2	3	4	5eq	5ax	6	OCH_3
H_2O-SE SW	Xyl*p*	102,03	73,03	74,10	76,73	63,37	63,37		
	MeGlcA	97,97	72,55		82,57	71,72	71,27	176,97	60,02
	Man*p*	103,10						69,57	21,36
H_2O-SE HW	Xyl*p*	101,92	72,98	73,99	76,69	63,29	63,29		
	MeGlcA	97,92			82,39	71,27	71,27	176,87	60,01
	Man*p*	102,92			80,54			69,56	21,38

*Xyl*p*: β-(1→4)-D-D-xylopyranose. MeGlcA: 4-O-Méthyl-β-(1→4)-D-glucopyranose. Man*p* : β- (1→4)-D-manopyranose.

S 6. Opportunité de valorisation des hémicelluloses par la fabrication de films plastiques biodégradables

L'une des applications possibles de ce travail consiste en la production de films pour l'emballage. En effet il a été décrit que les hémicelluloses polymériques présentaient des propriétés prometteuses pour cette application : elles sont filmogènes, biodégradables, imperméables à l'oxygène et biocompatibles (Hartman et al., 2006a).

Au cours d'une étude préliminaire, des films ont été produits par casting à partir d'une solution aqueuse d'hémicelluloses extraites du bois de cœur d'okoumé par explosion à la vapeur (NaOH-SE et H_2O-SE) contenant 40% en masse de glycérol, un plastifiant biosourcé. La Figure 47 montre l'aspect visuel des films obtenus.

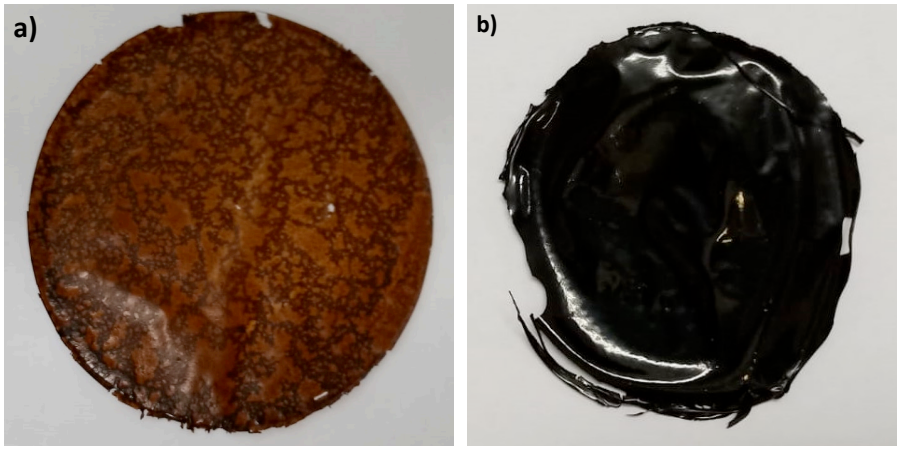


Figure 47 présentant l'effet des conditions de prétraitement sur les aspects visuels des films d'hémicelluloses issus de l'explosion à la vapeur (S = 3,1) du cœur d'okoumé. a) Film d'hémicelluloses extraite par H_2O-SE. b) Film d'hémicelluloses extraite par NaOH-SE

Les propriétés mécaniques du film NaOH-SE ont été étudiées par des essais de traction. Nous avons obtenu une résistance ultime à la traction de 8,08 ± 0,34 N, pour un temps de rupture 7,85 ± 2,75 s. Ces résultats sont prometteurs au regard de ceux obtenus dans au laboratoire sur des films d'autres essences comme l'épicéa (Chadni et al., 2020)

Selon qu'il s'agisse d'une extraction des hémicelluloses en milieu neutre ou basique, les films produits présentent des aspects visuels différents que l'on peut relier aux teneurs en lignine soluble respectives. Le film obtenu à partir des hémicelluloses prétraitées en milieu basique contenant une grande quantité de lignine résiduelle est plus sombre que celui issu du prétraitement en milieu neutre.

Cet aspect peut être considéré comme une propriété visuelle indésirable concernant certaines applications d'emballage (Bahcegul et al.,2012). Néanmoins, il a été montré au laboratoire par Chadni et al (2020) que des films à base d'hémicelluloses d'épicéa extraites par explosion à la vapeur avaient la capacité non seulement de constituer une barrière à l'oxygène efficace (< 10 cm^3.µm.jour) mais également de filtrer efficacement les UV dans la région 190-400 nm grâce à la présence de 11 % (en masse) de lignine résiduelle.

Ces résultats préliminaires prometteurs permettent d'envisager des perspectives de développement de films à haute performance et respectueux de l'environnement pour l'emballage alimentaire en substitution de films plastiques. Cette étude mériterait néanmoins d'être approfondie par des analyses complémentaires sur l'ensemble des échantillons et par une optimisation des conditions d'extraction des hémicelluloses.

Conclusion du chapitre 3

Le but de ce chapitre était d'évaluer le procédé de d'explosion (SE) à la vapeur pour l'extraction d'hémicelluloses polymériques mais également de contribuer à une meilleure connaissance de la composition du bois de coeur (HW) et de l'aubier (SW) d'okoumé. Diverses conditions de traitement (Facteurs de sévérité et pH d'imprégnation) ont été appliquées aux sciures d'okoumé. Des extractions conventionnelles en milieu basique ou avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) ont également été réalisées à partir de SW et de HW délignifiés à des fins de comparaison. Les hémicelluloses ont ensuite été récupérées par précipitation à l'éthanol. Il a été démontré que le facteur de sévérité et l'étape d'imprégnation avant SE influencent fortement les propriétés des hémicelluloses extraites. Une imprégnation basique avant SE (NaOH-SE) a permis de récupérer du GX à haut poids moléculaire (Mw = 65-100 kDa), alors qu'une imprégnation à l'eau avant SE (H_2O-SE) a produit des GX et des GM de poids moléculaires compris entre 6 et 26 kDa. D'une manière générale, les hémicelluloses extraites de SW présentaient un poids moléculaire plus élevé que HW. Il a été démontré avec un grand intérêt que l'imprégnation à l'eau de la sciure de bois, suivi de SE préservait des fragments d'hémicelluloses acétylés, avec un degré d'acétylation plus élevé que l'extraction douce au DMSO. D'une manière générale, il ressort qu'il s'agisse de H_2O-SE ou de l'extraction au DMSO, les fragments d'hémicelluloses présentaient un degré d'acétylation plus élevé pour SW que pour HW. Les résultats obtenus dans ce chapitre montrent que (1) les hémicelluloses du bois d'okoumé sont principalement composées de GX fortement acétylés avec une quantité relativement élevée de GM plus acétylés dans le SW, (2) le prétraitement à la vapeur peut être employé pour l'extraction des hémicelluloses polymériques du bois pour des applications à développer. La production de film par casting pour l'emballage à partir de solution aqueuse d'hémicelluloses et avec l'aide de glycérol comme plastifiant a été expérimentée avec succès dans une étude préliminaire.

Toutefois, le procédé utilisé dans cette étude pour la récupération des hémicelluloses implique une étape par précipitation à l'éthanol utilisant de grands volumes de solvant. Cette étape complique une éventuelle montée en échelle du procédé compte tenu notamment des coûts élevés associé au recyclage du solvant.

Références bibliographiques

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour. Technol. 101, 4851–4861. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093

Anris Starlin Peguy, E., Bi Athomo Arsene, B., Marcia, V., Louis, D., Tchiama Rodrigue, S., Bertr, C., 2019. Extraction and Characterization of Aucoumea klaineana Pierre (Okoume) Extractives. J. Renew. Mater. 7, 517–522. https://doi.org/10.32604/jrm.2019.04051

Bertaud, F., Holmbom, B., 2004. Chemical composition of earlywood and latewood in Norway spruce heartwood, sapwood and transition zone wood. Wood Sci. Technol. 38, 245–256. https://doi.org/10.1007/s00226-004-0241-9

Besserer, A., Obame, S.N., Safou-Tchima, R., Saker, S., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2022. Biorefining of Aucoumea klaineana wood: Impact of steam explosion on the composition and ultrastructure the cell wall. Ind. Crops Prod. 177, 114432. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114432

Bian, J., Peng, F., Xu, F., Sun, R.-C., Kennedy, J.F., 2010. Fractional isolation and structural characterization of hemicelluloses from Caragana korshinskii. Carbohydr. Polym. 80, 753–760. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.023

Blanpain-Avet, P., Migdal, J.F., Bénézech, T., 2009. Chemical cleaning of a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate suspension—Characterization of hydraulic and chemical cleanliness. J. Membr. Sci. 337, 153–174. https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.03.033

Brunck, F., Grison, F., Maître, H.-F., 1990. L'okoumé Aucoumea klaineana Pierre : monographie. CIRAD-CTFT.

Campestrini, L.H., Silveira, J.L.M., Duarte, M.E.R., Koop, H.S., Noseda, M.D., 2013a. NMR and rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan. Carbohydr. Polym. 94, 511–519. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.020

Campestrini, L.H., Silveira, J.L.M., Duarte, M.E.R., Koop, H.S., Noseda, M.D., 2013b. NMR and rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan. Carbohydr. Polym. 94, 511–519. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.020

Carvalho, D.M. de, Sevastyanova, O., Penna, L.S., Silva, B.P. da, Lindström, M.E., Colodette, J.L., 2015. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. Ind. Crops Prod. 73, 118–126. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.021

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2019b. Steam explosion process for the selective extraction of hemicelluloses polymers from spruce sawdust. Ind. Crops Prod. 141, 111757. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111757

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2019c. Steam explosion process for the selective extraction of hemicelluloses polymers from spruce sawdust. Ind. Crops Prod. 141, 111757. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111757

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Desobry, S., Brosse, N., 2020. Elaboration of hemicellulose-based films: Impact of the extraction process from spruce wood on the film properties. Carbohydr. Res. 497, 108111. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108111

Evtuguin, DmitryV., Tomás, JorgeL., Silva, ArturM.S., Neto, C., 2003a. Characterization of an acetylated heteroxylan from Eucalyptus globulus Labill. Carbohydr. Res. 338, 597–604. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00529-3

Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., Ayoub, A., 2017. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and

adhesives. Ind. Crops Prod. 107, 370–377. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.055
Gil-Ramirez, A., Salas-Veizaga, D.M., Grey, C., Karlsson, E.N., Rodriguez-Meizoso, I., Linares-Pastén, J.A., 2018a. Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (Chenopodium quinoa Willd.). Ind. Crops Prod. 121, 54–65. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.074
Gil-Ramirez, A., Salas-Veizaga, D.M., Grey, C., Karlsson, E.N., Rodriguez-Meizoso, I., Linares-Pastén, J.A., 2018b. Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (Chenopodium quinoa Willd.). Ind. Crops Prod. 121, 54–65. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.074
Giummarella, N., Lawoko, M., 2017a. Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood. ACS Sustain. Chem. Eng. 5, 5156–5165. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00511
Gröndahl, M., Eriksson, L., Gatenholm, P., 2004. Material Properties of Plasticized Hardwood Xylans for Potential Application as Oxygen Barrier Films. Biomacromolecules 5, 1528–1535. https://doi.org/10.1021/bm049925n
Hartman, J., Albertsson, A.-C., Lindblad, M.S., Sjöberg, J., 2006a. Oxygen barrier materials from renewable sources: Material properties of softwood hemicellulose-based films. J. Appl. Polym. Sci. 100, 2985–2991. https://doi.org/10.1002/app.22958
Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., 1992. Effect of molecular size on physical properties of wheat arabinoxylan. J. Agric. Food Chem. 40, 561–568. https://doi.org/10.1021/jf00016a006
Krawczyk, H., Persson, T., Andersson, A., Jönsson, A.-S., 2008a. Isolation of hemicelluloses from barley husks. Food Bioprod. Process. 86, 31–36. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2007.10.018
Kvist, P., Schuster, E., Lorén, N., Rasmuson, A., 2018. Using fluorescent probes and FRAP to investigate macromolecule diffusion in steam-exploded wood. Wood Sci. Technol. 52, 1395–1410. https://doi.org/10.1007/s00226-018-1039-5
Lv, P., Perre, P., Perré, G.A., 2015. TGA-FTIR Analysis of Torrefaction of Lignocellulosic Components (cellulose, xylan, lignin) in Isothermal Conditions over a Wide Range of Time Durations. Bioresources 10, 4239. https://doi.org/10.15376/biores.10.3.4239-4251
Marques, A.I., Serrano, M. de L., Alves, A.M.B., de Sousa, A.P.M., 2019. Isolation of xylans from bleached Eucalyptus kraft pulp by antisolvents precipitation. Cellulose 26, 1977–1992. https://doi.org/10.1007/s10570-018-1941-x
Marques, G., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Evtuguin, D.V., 2010. Acetylated heteroxylan from Agave sisalana and its behavior in alkaline pulping and TCF/ECF bleaching. Carbohydr. Polym. 81, 517–523. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.043
Martínez-Abad, A., Giummarella, N., Lawoko, M., Vilaplana, F., 2018. Differences in extractability under subcritical water reveal interconnected hemicellulose and lignin recalcitrance in birch hardwoods. Green Chem. 20, 2534–2546. https://doi.org/10.1039/C8GC00385H
Michalak, L., Knutsen, S.H., Aarum, I., Westereng, B., 2018. Effects of pH on steam explosion extraction of acetylated galactoglucomannan from Norway spruce. Biotechnol. Biofuels 11, 311. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1300-z
Mikkonen, K.S., Tenkanen, M., 2012. Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. Trends Food Sci. Technol. 28, 90–102. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.012
Morais de Carvalho, D., Martínez-Abad, A., Evtuguin, D.V., Colodette, J.L., Lindström, M.E., Vilaplana, F., Sevastyanova, O., 2017a. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. Carbohydr. Polym. 156, 223–234. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.022
Obame, S.N., Ziegler-Devin, I., Safou-Tchima, R., Brosse, N., 2019. Homolytic and Heterolytic Cleavage of β-Ether Linkages in Hardwood Lignin by Steam Explosion. J. Agric. Food Chem.

67, 5989–5996. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01744
Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J.A., 1987. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci. 321, 523–536.
Peng, F., Ren, J.-L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., Sun, R.-C., 2010a. Fractionation of Alkali-Solubilized Hemicelluloses from Delignified *Populus gansuensis* : Structure and Properties. J. Agric. Food Chem. 58, 5743–5750. https://doi.org/10.1021/jf1003368
Pereira Marques, F., Lima Soares, A.K., Lomonaco, D., Alexandre E Silva, L.M., Tédde Santaella, S., de Freitas Rosa, M., Carrhá Leitão, R., 2021. Steam explosion pretreatment improves acetic acid organosolv delignification of oil palm mesocarp fibers and sugarcane bagasse. Int. J. Biol. Macromol. 175, 304–312. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.174
Ramachandriya, K.D., Wilkins, M., Pardo-Planas, O., Atiyeh, H.K., Dunford, N.T., Hiziroglu, S., 2014. Simultaneous saccharification and fermentation of Eastern redcedar heartwood and sapwood using a novel size reduction technique. Bioresour. Technol. 161, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.005
Rissanen, J.V., Grénman, H., Xu, C., Willför, S., Murzin, D.Y., Salmi, T., 2014. Obtaining Spruce Hemicelluloses of Desired Molar Mass by using Pressurized Hot Water Extraction. ChemSusChem 7, 2947–2953. https://doi.org/10.1002/cssc.201402282
Rodrigue, S.-T., Sébastien, N.O., Nicolas, B., Patrice, S., Timoléon, A.B., 2016. Investigating the potential of Aucoumea klaineana Pierre sapwood and heartwood wastes to produce cellulosic ethanol. Afr. J. Biotechnol. 15, 2587–2595. https://doi.org/10.5897/AJB2016.15515
Rowell, R.M., Rowell, R.M. (Eds.), 2005. Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites. CRC Press, Boca Raton. https://doi.org/10.1201/9780203492437
Rowley, J., Decker, S.R., Michener, W., Black, S., 2013. Efficient extraction of xylan from delignified corn stover using dimethyl sulfoxide. 3 Biotech 3, 433–438. https://doi.org/10.1007/s13205-013-0159-8
Safou-Tchiama, R., de Jéso, B., Akagah, A.G., Sèbe, G., Pétraud, M., 2007a. A preliminary survey of the interfacial bonding of some tropical hardwoods towards succinic anhydride and 2-octen-1-yl succinic anhydride molecules: Impact of lignin and carbohydrate polymers structure on the chemical reactivity. Ind. Crops Prod. 26, 173–184. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.03.001
Safou-Tchiama, R., de Jéso, B., Akagah, A.G., Sèbe, G., Pétraud, M., 2007b. A preliminary survey of the interfacial bonding of some tropical hardwoods towards succinic anhydride and 2-octen-1-yl succinic anhydride molecules: Impact of lignin and carbohydrate polymers structure on the chemical reactivity. Ind. Crops Prod. 26, 173–184. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.03.001
Shatalov, A.A., Evtuguin, D.V., Pascoal Neto, C., 1999. (2-O-α-d-Galactopyranosyl-4-O-methyl-α-d-glucurono)-d-xylan from Eucalyptus globulus Labill. Carbohydr. Res. 320, 93–99. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00136-6
Sjöström, E., 1993a. WOOD POLYSACCHARIDES, in: Wood Chemistry. Elsevier, pp. 51–70. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092589-9.50007-3
Sun, S.N., Yuan, T.-Q., Li, M.F., Cao, X.F., Xu, F., Liu, Q.Y., 2012. Structural characterization of hemicelluloses from bamboo culms (neosinocalamusaffinis). Cellul. Chem. Technol. 46, 165–176.
Sun, S.N., Yuan, T.Q., Li, M.F., Cao, X.F., Xu, F., Liu, Q.Y., n.d. Structural characterization of hemicelluloses from bamboo culms (neosinocalamus affinis) 12.
Sun, X.-F., Feng, Y., Shi, X., Wang, Y., 2016. Preparation and Property of Xylan/Poly(Methacrylic Acid) Semi-Interpenetrating Network Hydrogel. Int. J. Polym. Sci. 2016, e8241078. https://doi.org/10.1155/2016/8241078

Teleman, A., Nordström, M., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O., 2003a. Isolation and characterization of O-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. Carbohydr. Res. 338, 525–534. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00491-3

Teleman, A., Nordström, M., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O., 2003b. Isolation and characterization of O-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. Carbohydr. Res. 338, 525–534. https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00491-3

Timell, T.E., 1967a. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1, 45–70. https://doi.org/10.1007/BF00592255

Voepel, J., Sjöberg, J., Reif, M., Albertsson, A.-C., Hultin, U.-K., Gasslander, U., 2009. Drug diffusion in neutral and ionic hydrogels assembled from acetylated galactoglucomannan. J. Appl. Polym. Sci. 112, 2401–2412. https://doi.org/10.1002/app.29878

Wang, K., Jiang, J.-X., Xu, F., Sun, R.-C., 2009. Influence of steaming explosion time on the physic-chemical properties of cellulose from Lespedeza stalks (Lespedeza crytobotrya). Bioresour. Technol. 100, 5288–5294. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.019

Willför, S., Sjöholm, R., Laine, C., Roslund, M., Hemming, J., Holmbom, B., 2003. Characterisation of water-soluble galactoglucomannans from Norway spruce wood and thermomechanical pulp. Carbohydr. Polym. 52, 175–187. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00288-6

Willför, S., Sundberg, A., Pranovich, A., Holmbom, B., 2005. Polysaccharides in some industrially important hardwood species. Wood Sci. Technol. 39, 601–617. https://doi.org/10.1007/s00226-005-0039-4

Wojtasz-Mucha, J., Hasani, M., Theliander, H., 2017. Hydrothermal pretreatment of wood by mild steam explosion and hot water extraction. Bioresour. Technol. 241, 120–126. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.061

Xiao, M.-Z., Chen, W.-J., Cao, X.-F., Chen, Y.-Y., Zhao, B.-C., Jiang, Z.-H., Yuan, T.-Q., Sun, R.-C., 2020. Unmasking the heterogeneity of carbohydrates in heartwood, sapwood, and bark of Eucalyptus. Carbohydr. Polym. 238, 116212. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116212

Xue, B.-L., Wen, J.-L., Xu, F., Sun, R.-C., 2012. Structural characterization of hemicelluloses fractionated by graded ethanol precipitation from Pinus yunnanensis. Carbohydr. Res. 352, 159–165. https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.02.004

Yamagaki, T., Maeda, M., Kanazawa, K., Ishizuka, Y., Nakanishi, H., 1997. Structural Clarification of *Caulerpa* Cell Wall/M,3-Xylan by NMR Spectroscopy. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1077–1080. https://doi.org/10.1271/bbb.61.1077

Yuan, X, Wang, J., Yao, H., 2006. Production of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fibre by xylanases from. Food Chem. 95, 484–492. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.043

Yue, P.-P., Fu, G.-Q., Hu, Y.-J., Bian, J., Li, M.-F., Shi, Z.-J., Peng, F., 2018a. Changes of Chemical Composition and Hemicelluloses Structure in Differently Aged Bamboo (*Neosinocalamus affinis*) Culms. J. Agric. Food Chem. 66, 9199–9208. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03516

Zhao, X., Tong, T., Li, H., Lu, H., Ren, J., Zhang, A., Deng, X., Chen, X., Wu, A.-M., 2017. Characterization of hemicelluloses from Neolamarckia cadamba (Rubiaceae) during xylogenesis. Carbohydr. Polym. 156, 333–339. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.041

Zhao, Y., Sun, H., Yang, B., Weng, Y., 2020. Hemicellulose-Based Film: Potential Green Films for Food Packaging. Polymers 12, 1775. https://doi.org/10.3390/polym12081775

Ishii, T., Shimizu, K. Chemistry of cell wall polysaccharides (2001), In Hon, D.N.-S.; Shiraishi, N. Cellul. Chem. Technol., second edition (p175-212), Marcel Dekker Inc., New York (USA).

Chapitre 4 :

Steam explosion of Aucoumea klaineana Pierre sapwood : membrane separation of acetylated hemicelluloses

Chapitre 4 : Steam explosion of *Aucoumea klaineana* Pierre sapwood : membrane separation of acetylated hemicelluloses

Contexte et objectif général

Le chapitre précédent s'est focalisé sur l'extraction d'hémicelluloses d'okoumé par un procédé de prétraitement par explosion à la vapeur. Ce procédé de destructuration du matériau lignocellulosique permet ainsi d'extraire une partie des hémicelluloses en phase aqueuse mais également de récupérer une pâte riche en lignine et en cellulose. On rappelle que la valorisation de la fraction cellulosique de cette pâte issue de l'okoumé a précédemment été étudiée dans la thèse de Sébastien Ngwa Obame (Obame, 2020).

Ce prétraitement peut être considéré comme éco-responsable puisqu'il utilise de l'eau comme milieu réactionnel, il ne nécessite pas (ou peu) de réactifs chimiques, et il apparaît comme énergétiquement économique car il nécessite des temps de séjour très courts (ordre de la minute). Il peut par ailleurs être transposé à une échelle industrielle avec des volumes réactionnels bien plus importants permettant l'extraction de quantités importantes d'hémicelluloses.

Afin de déterminer les conditions les plus favorables pour l'extraction des hémicelluloses d'okoumé, douze conditions expérimentales ont été ainsi choisies, en faisant varier :

- La nature de la biomasse : cœur ou aubier d'okoumé
- Les conditions d'imprégnation de la sciure d'okoumé : Eau ou NaOH (1M)
- La température de réaction : 170°C, 190°C, 210°C
- Le temps de séjour : 5 min, 7 min, 10 min

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont permis de dégager une condition particulièrement satisfaisante. Ainsi le prétraitement de l'aubier imprégné à l'eau à 170°C pour un temps de séjour de 10 minutes semble être la condition la plus favorable car il ne requiert pas l'utilisation de soude et il est réalisé à une température assez basse, qui le rend énergétiquement plus économe. Il a également été démontré par Ngwa Obame que cette condition est avantageuse pour une valorisation de la pâte cellulosique en bioéthanol car elle permet d'obtenir des taux

d'hydrolysabilité enzymatique importants (~ 60 %). Enfin, dans le cadre de ce travail, cette condition particulière permet par ailleurs d'isoler des hémicelluloses avec des poids moléculaires peu élevées mais présentant l'avantage d'être fortement acétylées. Dans le chapitre précédent, les hémicelluloses solubilisées en phase aqueuse après prétraitement par explosion à la vapeur étaient ensuite précipitées à l'éthanol avant d'être lyophilisées. Ce mode de précipitation est toutefois difficilement extrapolable à grande échelle en raison de son coût (volume d'éthanol à utiliser puis à recycler). Par ailleurs, il ne permet pas de sélectivité des hémicelluloses précipitées. En effet, les hémicelluloses récupérées dans les hydrolysats de bois se présentent souvent sous forme d'un mélange de monomères (pentoses et hexoses), oligomères et polymères. Selon leurs distributions de taille et leurs masses moléculaires, les hémicelluloses produites peuvent être valorisées au travers d'applications industrielles différentes. Sous forme polymère, les hémicelluloses ont par exemple été propices pour la formulation des emballages alimentaires et les hydrogels polymériques (Chadni et al., 2020; Farhat et al., 2017) ; et sous leur forme oligomère, les hémicelluloses peuvent être utilisés comme prébiotiques et pharmaceutiques (Samanta et al., 2015). Les hexoses et pentoses peuvent quant à eux être utilisés comme source de molécules plateformes : HMF et furfural obtenus par déshydrataion respectives des hexoses et pentoses, de l'acide lactique ou du 2-3 butanediol par fermentation aérobie du glucose ou du xylose, du xylitol par hydrogénation catalytique ou par bioconversion du xylose.

Nous nous sommes donc intéressés aux techniques de séparation membranaire qui permettent de traiter des volumes importants d'hydrolysats riches en hémicellulose au travers de procédés continus ou semi-continus mais également de séparer les hémicelluloses de manière sélective.

L'ensemble des analyses expérimentales effectuées et des résultats analytiques générés dans cette partie ont été regroupés dans un article intitulé « Steam explosion of *Aucoumea klaineana* Pierre sapwood : membrane separation of acetylated hemicelluloses ». Cet article est actuellement soumis dans le journal Carbohydrate Research (article en cours de révision).

Article

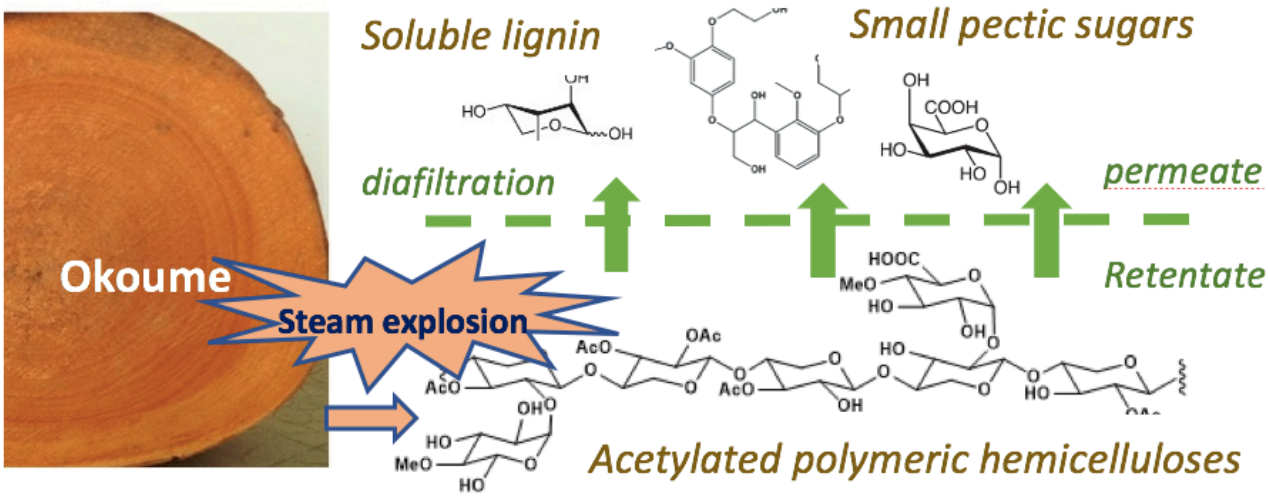
Steam explosion of *Aucoumea klaineana* Pierre sapwood: membrane separation of acetylated hemicelluloses

Errol Mougnala Moukagni[1], Isabelle Ziegler-Devin[1], Rodrigue Safou-Tchima[2¶], Arnaud Aymes[3], Romain Kapel[3], Nicolas Brosse[1*]

[1] Université de Lorraine, INRAE, LERMAB, F-54000 Nancy, France

[2] Laboratoire de Recherche et de Valorisation du Matériau Bois (LaReVa Bois). Ecole Normale Supérieure d'Enseignement Technique (ENSET). BP 3989, Libreville, Gabon.

[3] Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, CNRS UMR 7274 (LRGP)



Abstract

The fractionation of the aqueous effluent of *Aucoumea klaineana* Pierre (okoumé) sapwood steam explosion was examined by a sequential-dilution type membrane diafiltration. The permeate and retentate fractions were characterized by HPLC-SEC, HSQC-NMR, FTIR, UV-visible and HPAE-PAD ion chromatography. Diafiltration with 10 kDa regenerated cellulose membrane has been shown to provide efficient fractionation without fouling. *O*2 and/or *O*3 acetylated xylans with a lower proportion of *O*2 and / or *O*3 acetylated glucomannans were isolated in the retentate (≈ 35 % w/w based on initial effluent solid content, ≈ 1.08 % w / w based on initial dry wood, including 65 % w/w in the range 9-22 kDa). The molecular weights of the polysaccharides were significantly higher than those obtained by ethanolic precipitation. The permeate concentrated low molecular mass oligomers (90 % w / w < 2.3 kDa, ≈ 1.88 % w / w based on initial dry wood) composed of pectic sugars, highly acetylated xylans (DS ≈ 0.9) and relatively high proportion of soluble lignin (≈ 40 % w / w) including Lignin-Carbohydrate Complexes (LCCs).

Keywords : Steam explosion; *Aucoumea klaineana* Pierre; Diafiltration; Hemicelluloses.

1 Introduction

The search for an optimal use of wood according to the biorefinery concept is leading to a growing interest in the extraction of polymeric hemicelluloses which constitute the second component of wood. The potential application of hemicelluloses has been revealed in several areas, including hydrogels (Lindblad et al., n.d.) and biodegradable barrier films for food packaging (Gröndahl et al., 2004; Hartman et al., 2006b). Also, hemicellulosic chains have demonstrated their importance in the fields of bioactive polymers, hydrocolloids or as additives for paper making (Willför et al., 2008b).

Hardwoods contain two main types of hemicelluloses :

- *O*-acetyl-4-*O*-methylglucuronoxylan (10 to 35% of the wood mass) composed of a backbone of β-D-xylopyranosyl (Xyl*p*) base units, attached by β-(1→4) bonds, and 4-*O*-methyl-α-D-glucopyranosyl uronic acid (MeGlc*p*A) side groups by (1→2) bonds. Some xylose units are *O*-acetylated at C2 and/or C3.
- glucomannan (3-5% of wood mass) of low molecular weight with a ratio of one to two mannose units to one glucose unit forming β-(1→4) bonds. Glucomannans are usually acetylated on the C2 and/or C3 carbons of mannoses to the extent of one group every three units (Sjöström and Westermark, 1999b, 1999c; Timell, 1967c; S. Wang et al., 2015).

However, in wood hemicelluloses are closely interconnected with the other components of the cell wall. The linkage between hemicelluloses and lignin is provided through covalent bonds called lignin-carbohydrate complexes (LCCs), including phenylglycoside bonds, ester bonds and benzyl ether bonds. Hemicelluloses and cellulose are connected through a strong hydrogen bond network (Iiyama et al., 1994; Tenkanen et al., 1999). Consequently, the use of hemicelluloses for the elaboration of high value-added products is conditioned by an efficient pretreatment of the lignocellulosic matrix aiming at destabilizing this complex. In this context, several physical and/or chemical pretreatment methods have been reported. Alkali extraction using sodium or potassium hydroxyde is among the simplest and commonly used processes (Ebringerová et al., 2005). This method is broadly used especially for xylans recovery in good yield from biomass. Due to the basic conditions used, deacetylated and poorly branched hemicelluloses are isolated (Sun et al., 2005). Extraction by organic solvents such as dioxane and DMSO has also been reported by several authors (Hägglund et al., 1956; Haimer et al., 2010; Rowley et al., 2013). This approach which promotes the extraction of high molecular-weight and acetylated hemicelluloses close to the native form is

generally used for characterization purposes. Since few years, the isolation and characterization of Lignin-Carbohydrate-Complexes have also been attracting increasing interest, LCCs may have specific properties such as surfactant and/or biological properties (Uraki et al., 2006; Zhao et al., 2017). The production of this kind of complex polysaccharides could be of great interest for high value-added applications (Ebringerová et al., 1994; Mikkonen and Tenkanen, 2012). However, the relatively low yields and the high consumption of organic solvent limit the large-scale use of this method.

Steam explosion (SE) has proven to be a very efficient and promising process for biomass pretreatment and deconstruction. It is a thermomechanical and chemical process that is carried out under the combined effect of steam cracking and explosive decompression, providing an efficient depolymerization and extraction of soluble hemicelluloses, leaving most of the cellulose and lignin as solid residue (Ziegler-Devin et al., 2021). To date, most of the work on SE focuses on the valorization of the cellulosic fraction for bioethanol production (Barbanera et al., 2018; Tutt et al., n.d.). In 2000, Glasser et al., described the extraction from barley husks of non-cellulosic heteropolysaccharides composed mainly of xylans by SE (Cellulose 7 : 299 - 317, 2000).More recently and from the same biomass, Krawczyk et al., (Krawczyk et al., 2008b) studied the SE-extraction and fractionation of arabinoxylans for the production films for food packaging. (Chadni et al., 2019b) described a selective extraction of hemicelluloses from softwood by SE depending on the pH of the medium.

In SE pretreatment, hemicelluloses are mainly recovered as oligo and polysaccharides in the liquid phase of the treatment in complex mixture with other biomolecules. Therefore, their recovery is a crucial step in the hemicelluloses upgrading process.

Alcoholic precipitation of hemicelluloses with ethanol and methanol is a method broadly used at the lab scale. A prior neutralization of the alkaline extracts with an acid to a pH between 5.0 and 5.5 is necessary to limit the depolymerization of hemicelluloses. However, the use of large volumes of alcohol and the co-precipitation of minerals are inherent limitations of hemicelluloses precipitation. Alternative methods such as gel permeation chromatography and alkaline precipitation have also been explored for the separation and purification of hemicelluloses (Hong et al., 2007).

Compared to the aforementioned separation techniques, the ultrafiltration membrane process could have many advantages, such as low cost, energy savings and environmental friendliness

(Mohammad et al., 2012). Ultrafiltration is a well-known and widely used organic solvent-free membrane process for the separation and purification of complex mixtures of biomolecules in solution. Because of this, maximum purification of the retained solute is achieved in diafiltration mode by diluting the retentate with water or a buffer solution for selective separation of compounds based on their molecular weights. The efficiency of the separation of hemicelluloses is therefore strongly dependent on the nature of the membranes (hydrophobic/hydrophylic) used. It has been reported that the feasibility of the membrane separation process is improved by using hydrophilic membranes made of polysulfone or surface-modified polyvinyldiene fluoride with a cut - off ranging from 1 to 10 kDa and possessing a high shear rate inducing lower fouling or concentration polarization (Persson and Jönsson, 2010). Indeed, hydrophobic spercies, such as lignin or extractives (resin) can foul hydrophobic membranes during ultrafilatration whereas almost no fouling was observed by using hydrophobic membranes (Maartens et al., 2002; Persson et al., 2005)(Maartens, A., Jacobs, E.P. and Swart, P., 2002, UF of pulp and paper effluent: membrane fouling-prevention and cleaning

Several publications have been published concerning the optimization of membrane fractionation processes on hemicelluloses hydrolysates. The main problems encountered were membrane fouling and lignin removal (Al-Rudainy et al., 2020; Jönsson et al., 2008; Mänttäri et al., 2015; Oriez et al., 2019). Nitzsche et al. (2020) recently described the optimization of ultrafiltration of beechwood hydrolysate by means of an experimental design method (Nitzsche et al., 2020). Krawczyk et al., (2008)(Krawczyk et al., 2008b) studied the isolation of hemicellulose extracted from barley husks by steam explosion. However, the fractionation and fine characterization of highly acetylated hemicelluloses has never been addressed. By means of response surface methodology, the multidimensional correlation of the parameters transmembrane pressure, temperature, and pH value with the performance parameters (permeate flux, hemicellulose sugar retention, and lignin retention) was studied allowing to determine the optimum parameters of ultrafiltration.

Aucoumea klaineana Pierre (okoumé) is a Central African tropical hardwood found mainly in the Republic of Congo and Gabon. It accounts for about 130,000,000 m^3 of the total 400,000,000 m^3 of Gabon's forest reserve. Approximately 750,000 m^3 / year of waste wood (~31 % okoumé) is produced out of approximately 1,500,000 m^3 of logs processed annually in Gabon (Nze Nguema, 2009). In a recent paper (Mougnala Moukagni et al., 2021), we described the isolation and characterization of acetylated glucuronoxylans and glucomannans from okoumé sapwood by a SE process followed by ethanolic precipitation. The objective of the present work is to evaluate a fractionation by a

sequential-dilution type membrane diafiltration. A characterization of the molecular weights, the sugars content and the acylation degree has been carried out with the final goal of anticipating new uses for these insufficiently valorized wood components.

2 Materiel and method

2.1 Raw material

The samples used in this study were taken from an okoumé log in the Gabonese natural forest of Nzamaligué by the Société Equatoriale d'Exploitation Forestière (SEEF). The experiments were performed on the sapwood slices cut with a saw and then ground with a knife mill and sieved to obtain sawdust of about 2 mm.

2.2 Pretreatment by steam explosion

50 g of biomass dried at 105 °C overnight was impregnated at room temperature for 15 h in ultrapure water (solid/liquid ratio = 1:7). The impregnated biomass was recovered with a filter paper and introduced directly into a water pressurized reactor. Saturated steam at high pressure and temperature (8 bars, 170 °C) is injected into this batch reactor by the mean of a steam generator. After a short residence time (10 min) a sudden pressure drop is induced by a ball valve, creating hydrolytic breakdown of the LCC. Then, after pretreatment, a solid pulp (rich in both lignine and cellulose) is separated from the aqueous hydrolysate (rich in hemicelluloses) by vacuum filtration with qualitative filter paper with a retention particle size of 5-13 µm (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France).

2.3 Recovery of hemicelluloses: ultrafiltration and diafiltration

A Cogent Process Scale tangential flow system (Millipore, Molsheim, France) was used to perform the filtration experiments. Ultrafiltration (UF) was performed on 10, 100 and 500 kDa NMWCO (Nominal Molecular Weight CutOff) regenerated cellulose UF hollow fiber membranes (Molssheim, Millipore, France) with a surface area of 340 cm^2. 100 mL of the explanted hydrolysate was collected and ultrafiltered at room temperature at 2.0 bar transmembrane pressure (TMP). After 10 minutes of total circulation, permeate and retentate were sampled for analysis.

The 10 kDa membranes were selected for 100 mL diafiltration (DF) of the explanted hydrolysate. Transmembrane pressure was maintained at 1.5 bar. Diafiltration consisted of keeping the feed volume constant by adding deionized water. The volume of water added at each DF cycle was equal to the volume of the retentate. Sequential-dilution type diafiltration was conducted up to 6 diafiltration volumes (DV). At each diavolume, a flow to the retentate was collected for analyses. The concentrated overall permeate and the final retentate were freeze-dried and then analyzed.

2.4.1 Determination of sugars and uronic acids and soluble lignin

The processing and analysis of the chemical composition of the extracts was adapted from the National Renewable Energy Laboratory (NREL / TP-510-42623) standard. Briefly, 15 mg of hemicelluloses powder were dissolved in 9.5 mL of ultrapure water. Then, the pH was measured, and the necessary amount (349 µL) of 72 % H2SO4 was added to reach an acid concentration of 4 %. Samples were then incubated at 121 °C in for 1 h. The sample volume was then completed to 10 mL. For the steam explosion pretreatment, 2.5 mL of the resulting liquid phase were hydrolyzed by adding 87 µL of 72 % H_2SO_4 to reach a final acid concentration of 4 %. Resulting solutions were diluted then analyzed for monosaccharides and uronic acids content by high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (HPAEC - PAD, ICS - 3000 Dionex) with a Dionex CarboPac PA-20 analytical column (3 × 150 mm) and its guard-column. The separation is done at 35 °C at an isocratic flow rate of 0.4 $mL.min^{-1}$, with an eluent consisting of soda (250 mM), water and sodium acetate (1 M) in variable proportion (concentration gradient). An external calibration is performed with 7 calibration points per sugar or uronic acid. The acid soluble lignin (ASL) content was determined from absorbance at 205 nm according to Lin and Dence (Lin and Dence, 1992).

2.4.2 Steric exclusion chromatography (SEC)

The molar mass distribution of the ultafiltered and diafiltered fractions was determined by size exclusion chromatography coupled to a refractive index detector (Shimadzu Prominence). Two serially coupled columns are used (Phenomenex GFC-P2000, 3000 and 4000) to separate hemicelluloses. Samples are separated at 37 °C; 0.25 M aqueous sodium nitrate ($NaNO_3$) solution is used as eluent with a flow rate of 0.7 $mL.min^{-1}$. A pullulan polysaccharide calibration kit was used, including 10 pullulan standards, with molecular weight varying from 180 Da to 700 kDa [Agilent

Technologies, Pullulan Polysaccharide Calibration Kit, Part number: PL2090-0101]. Mw and Mn values are determined after slicing the chromatogram and by using Shimadzu LabSolutions software.

2.4.3 Acetyl contents

Acetyl content of DF fractions was determined after acetic acid determination by adapting the protocol of Yuan et al., 2006. 1000 µL of the DF fractions (10 mg of retentate in 5 mL of water) are saponified with NaOH (1250 µL at 0.4 M) for 2h in the dark, and at room temperature in a 5mL volumetric flask. The reaction is stopped by adding 0.4 M H_3PO_4 to the mark. The solutions are analyzed by HPLC (Shimadzu Prominence). The compounds are separated at 30 °C on a C18 - Luna 2 column (Phenomenex) with a flow rate of 0.8 $mL.min^{-1}$. The eluent is a 5.10^{-3} M sulfuric acid solution. The detection is performed by UV at 210 nm. An external calibration with 5 calibration points is performed.

2.4.4 Fourier transform infrared spectroscopy

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was performed on the DF fraction powders. The infrared spectra were acquired on a Thermo Scientific iD3ZnSe ATRdNicolet iS 5 FTIR spectrometry unit for a frequency range of 4000 cm^{-1} to 650 cm^{-1}. The spectra were analyzed by Thermo Scientific OMNIC software.

2.4.5 2D HSQC NMR

The 2-dimensional heteronuclear singular quantum coherence (HSQC) nuclear magnetic resonance (NMR) analyses were performed on a 400-MHz Bruker instrument with a standard Bruker program. The powders (~ 60 mg) were dissolved in 0.5 mL of 99.7 % deuterium oxide (D_2O) and filtered on cotton. The analysis was made at room temperature (25 °C). The number of complex points collected was 1024 for the ^1H dimension with a relaxation of 1.5- and 256 time increments were recorded in the ^{13}C dimension. Calculations of DSAc Xylp and DSAc Manp are obtained using equations 1 and 2.

Eq 1

$$\mathrm{DS(Ac)}\ Xylp = \frac{\frac{[\mathrm{Ac}]^{a}}{[\mathrm{Man+Xyl}]^{b}}}{1+\frac{[\mathrm{Man\ Ac}]^{c}}{[\mathrm{Xyl\ AC}]^{c}}}$$

Eq 2

$$DS(Ac)\ Manp = \frac{[Ac]^{a}}{[Man + Xyl]^{b}} - DS(Ac)\ Xly$$

a) Acetyl content determined by HPLC; b) Sugars content determined by HPEAC-PAD; c) Integration ratio by HSQC-NMR

3 Results and discussion

The hemicellulosic fractions were recovered from the liquid effluent of okoumé sapwood SE pretreatment (170 °C-10 min). A sequential process ultrafiltration-diafiltration of **SE effluent** was carried out to produce **Permeate** and **Retentate** fractions Figure 48.

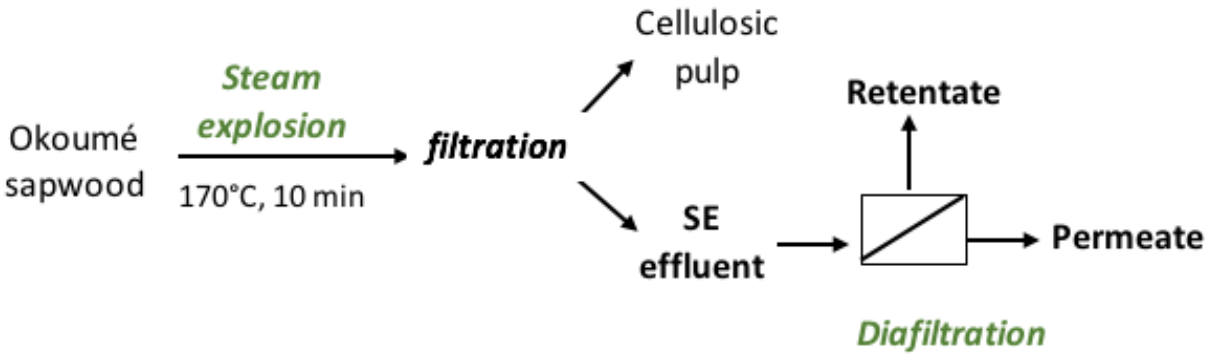


Figure 48. Separation of hemicellulose

3.1.1 Ultrafiltration - Diafiltration

In a preliminary study, the performance of three ultrafiltation membranes (cut off 10 kDa, 100 kDa and 500 kDa) were experimented for the fractionation of the liquid effluent of the SE in full recirculation mode. The retentate and permeate were recovered and analyzed by steric exclusion chromatography (Suppl Materials – S 1-3). The 10 kDa membrane, which gave the better results with a high intensity of the peaks of high molecular weight compounds in the retentates, was selected. Ultrafiltration of steam explosion liquor was made on diafiltration mode in order to get a better separation. Figure 49 shows the permeate flow rate evolution during diafiltration (up to 6 diavolumes). The flow rate increased until the third diavolume and tends to stabilize thereafter. After membrane flushing with water, no significant reduction in permeate flux was observed, indicating

that fouling of the membrane was negligible. Fouling was however expected due to the high polarity of the chosen membrane material (regenerated cellulose). From these observations it can be deduced that the increase flux is due to a viscosity reduction of permeate because of the concentration decrease in low molar weight molecules during DF. Then the concentration tends to stabilize because of permeate viscosity tends to pure water viscosity. This behavior was already observed during DF of other polyoside separation (Andersson et al., 2007).

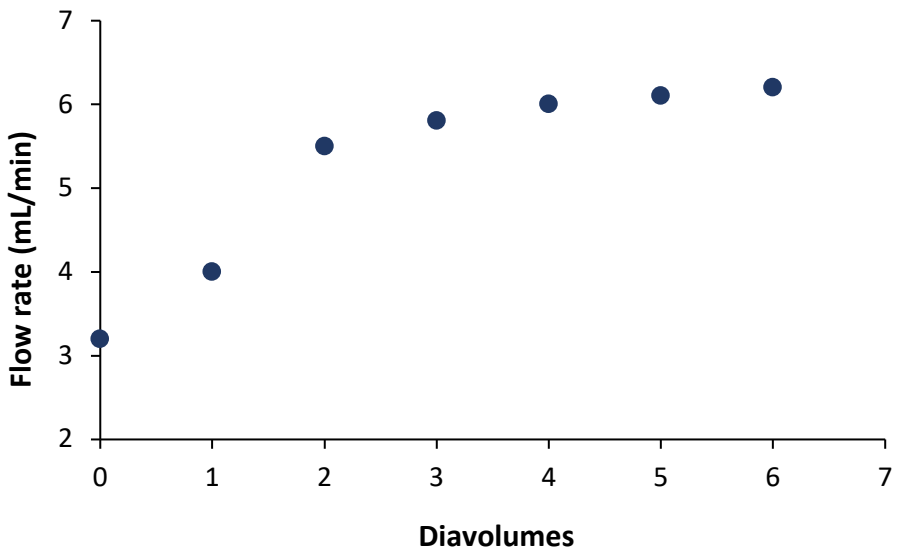


Figure 49. Permeate flow rate evolution during diafiltration

Dry matter content measurements) showed higher proportions of dry matter yield in the **Permeate** with 63.1 wt % and 58.8 wt % for the unfiltered and filtered dry matter respectively (based on **SE effluent** dry matter). Based on initial dry wood, **Permeate** and **Retentate** dry extracts accounted for 1.88 % w/w and 1.08 % w / w respectively. The efficiency of the fractionation process has been clearly demonstrated by HPLC-SEC. **SE effluent**, **Permeate** and **Retentate** fractions were analyzed by Size Exclusion Chromatography. The chromatograms obtained showed five main signals from 0.5 kDa to 22 kDa. The distribution w/w in the 5 compartments is given in Figure 50 for the **Permeate**, **Retentate** and **SE effluent** (see Supplementary Materials – S 3). The number-average molecular weight (Mn), weight average molecular weight (Mw) and polydispersity (IP = Mw / Mn) are also given in the S 4. It can be seen that the SE effluent exhibited a broad molecular weight distribution and that the diafiltration process resulted in efficient separation. In the **Retentate**, 65 % w/w of the extracts contained hemicelluloses in the range 9.2-22.0 kDa and ≈ 80 % w / w had Mw > 4.5 kDa. Interestingly, the **Retentate** fraction concentrated hemicelluloses of significantly

higher molecular weight than those previously recovered by ethanolic precipitation (Mw ≈ 9 kDa) (Mougnala Moukagni et al., 2021). On the other hand, the **Permeate** contained smaller oligomers in the range 0.5 - 1.2 kDa, ≈ 90% w /w with Mw < 2.3 kDa. This observation is in good agreement with the study performed with barley husks where the average molecular weight of polysaccharides was 24,000 g / mol after steam explosion (liquid A) and 54,000 g / mol after diafiltration (Krawczyk et al., 2008b).

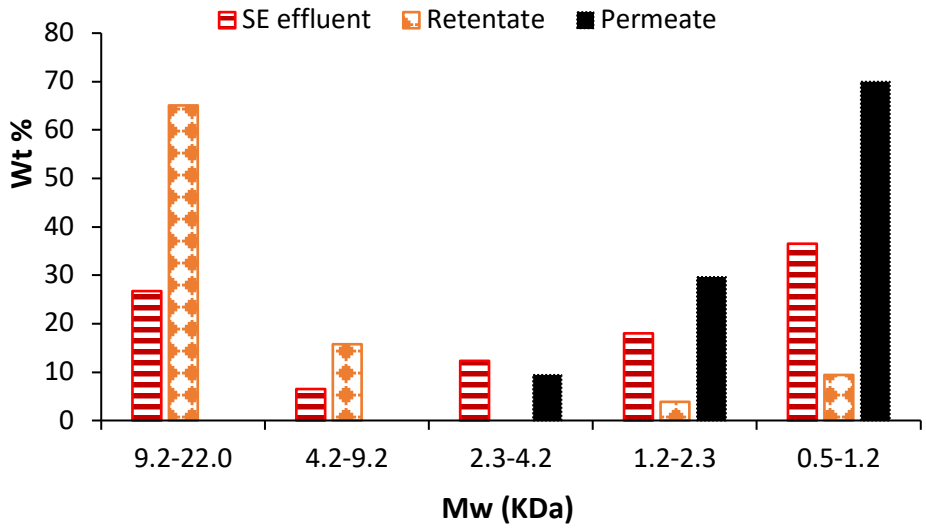


Figure 50. Mw distribution determined by SEC of Permeate, Retentate and SE effluent

3.1.2 Composition of hemicelluloses

The hemicelluloses fractions isolated in this study were analyzed in terms of monosaccharides by ion chromatography after controlled acid hydrolysis, acetyl group content by saponification and HPLC analysis and soluble lignin by UV quantification. The relative composition of **SE effluent**, **Permeate** and **Retentate** are compared to wood composition (Table 17). Considering the complexity of the mixture to be analyzed, the results are reported as relative composition by weight % in order to facilitate the comparison of the fractions.

Table 17. Sugar composition of okoumé sapwood, SE effluent, Retentate and Permeate

	wood	SE effluent	Permeate	Retentate
DM %[a]		0.7 (0.0)	63.06	35.60
yield %[b]			1.88	1.08
Fuc[C]	0.1 (0.0)	0.7 (0.0)	0.8 (0.0)	0.1 (0.0)
Rha[c]	0.5 (0.0)	4.0 (0.7)	2.5 (0.0)	3.0 (0.1)
Ara[c]	0.8 (0.0)	15.2 (0.1)	15.7 (0.5)	1.5 (0.0)
Gal[c]	1.1 (0.0)	9.9 (0.2)	6.9 (0.2)	6.8 (0.1)
Glc[c]	76.5 (0.2)	15.13 (0.0)	5.6 (0.2)	15.6 (0.8)
Xyl[c]	17.0 (0.0)	31.4 (0.1)	15.0 (1.4)	29.6 (0.4)
Man[c]	3.3 (0.0)	7.3 (0.3)	4.4 (0.4)	5.0 (0.1)
GalUA[c]	0.8 (0.3)	4.8 (0.0)	2.3 (0.1)	4.4 (0.0)
GlcUA[c]	0.2 (0.0)	0.4 (0.0)	0.2 (0.0)	0.3 (0.0)
MeGlcUA[d]	nq[g]	nq	2.8	17.4
Ac[e]	nq	nq	5.4	10.9
ASL[f]	-	11.1 (5.0)	38.5 (0.2)	5.5 (0.3)

[a] Dry matter content (%) in Peremate and Retentate based on initial SE effluent DM
[b] wt% based on initial dry wood.
[c]Xylose, mannose, glucose, arabinose, galactose, Rhamnose, galacturonic and glucuronic acid %, determined after hydrolysis by HPEAC-PAD.
[d] Estimation by HSQC-NMR.
[e] Acetic acid quantifed by HPLC after saponification.
[f] Acid soluble lignin, estimation by UV-visible
[g] Not quantified

As expected high amounts of xylose (34.7 %) were detected in the **SE effluent**, xylans being the predominant non-cellulosic polysaccharides in okoumé sapwood accounting for 80 % w / w of the hemicellulose (Mougnala Moukagni et al., 2021). This result is consistent with the hydrolysis of non-cellulosic polysaccharides by autohydrolysis during the SE. The presence of mannose and glucose (8.1 % and 16.7 % respectively) is justified by the fact that okoumé sapwood contained ≈ 5-6 % of glucomannans. The significantly higher proportions of Ara, Gal, Rha and GalUac were detected in the **SE effluent** compared to sapwood composition (16.8 %, 11.0 %, 4.4 % and 5.3 % compared to 0.5 %, 0.7 %, 0.6 % and 0.1 % respectively). This is due to the preferential hydrolysis of the primary cell wall and middle lamella during SE previously reported (Feng et al., 2018; Sauvageon et al., 2018), these tissues being rich in pectic polysaccharides such as rhamnogalacturonans and arabinans.

It can be noticed from (Table 17) that diafiltration allowed an efficient separation of arabinose which is primarily recovered in the **Permeate** fraction. This result is explained by the high susceptibility of arabinan chains toward hydrolysis producing almost exclusively monomeric arabinose (Desharnais et al., 2011). An efficient recovery of soluble lignin in the **Permeate** was also

observed. This result is in accordance with Sun and Yomkinson (2000) (Sun and Tomkinson, 2000) who showed that soluble lignin produced by uncatalyzed-SE of hardwood was composed of small lignin fragments (Mw ≈ 2500 Da, Mw / Mn = 1.5).

Xylose is still the dominant sugar in the retentate of diafiltration attesting the recovery of high molecular weight xylans. Interestingly, the ratio Man/Glc in **Retentate** (Man / Glc ≈ 0.40) was lower than that of **Permeate** (Man / Glc ≈0.77) and did not match that in okoumé glucomannans previously reported (Man / Glc ≈ 1). This relatively high glucan concentration in the retentate can be explained by the retention of high molecular weight cellulose fragments produced during the explosive decompression of SE.

The FTIR spectra of the **Permeate** and **Retentate** are shown in Figure 51 and are in good agreement with other works (Morais de Carvalho et al., 2017b; Rowley et al., 2013). The acetylation of all the fractions has been confirmed by the band at 1730 cm^{-1} characteristic of the stretching of the carbonyl group (C=O) of the ester group and by the peak at 1244 cm^{-1} assigned to C-0 δ (C-O) deformation of the ester functions. All hemicellulose fractions contain the band at 1595-16031 cm^{-1} attributed to adsorbed water and / or ν(COO-) uronic acids of hemicelluloses chains (Gil-Ramirez et al., 2018b). In agreement with the UV quantification (Table 17), the stronger signal at 1508 cm^{-1} for the **Permeate**, attributed to C=C stretching in the aromatic ring of the lignin, confirmed the higher amounts of residual lignin than for the **Retentate** (Table 17).

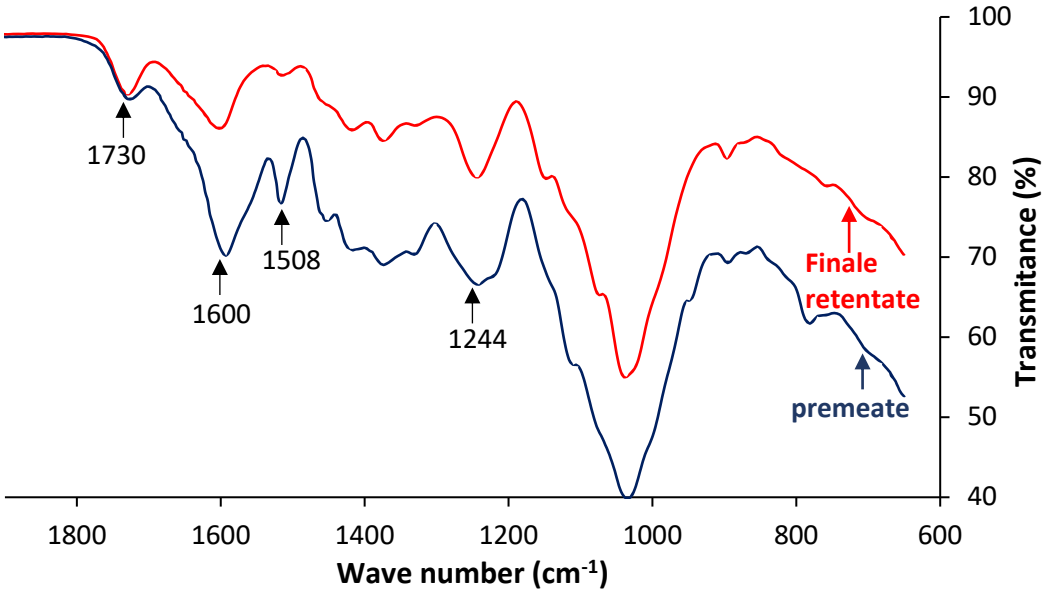


Figure 51. FTIR spectra of Retentate and Permeate

2D HSQC NMR analysis was used to better understand the molecular structure of the diafiltration **Retentate** and **Permeate** fractions. The NMR spectra are presented in Figures 4A and 4B and in Supplementary Material section (S 7). Assignments of the different signals were made with respect to literature data (Giummarella and Lawoko, 2017b; Peng et al., 2010b; Sun et al., n.d.; Yue et al., 2018a).

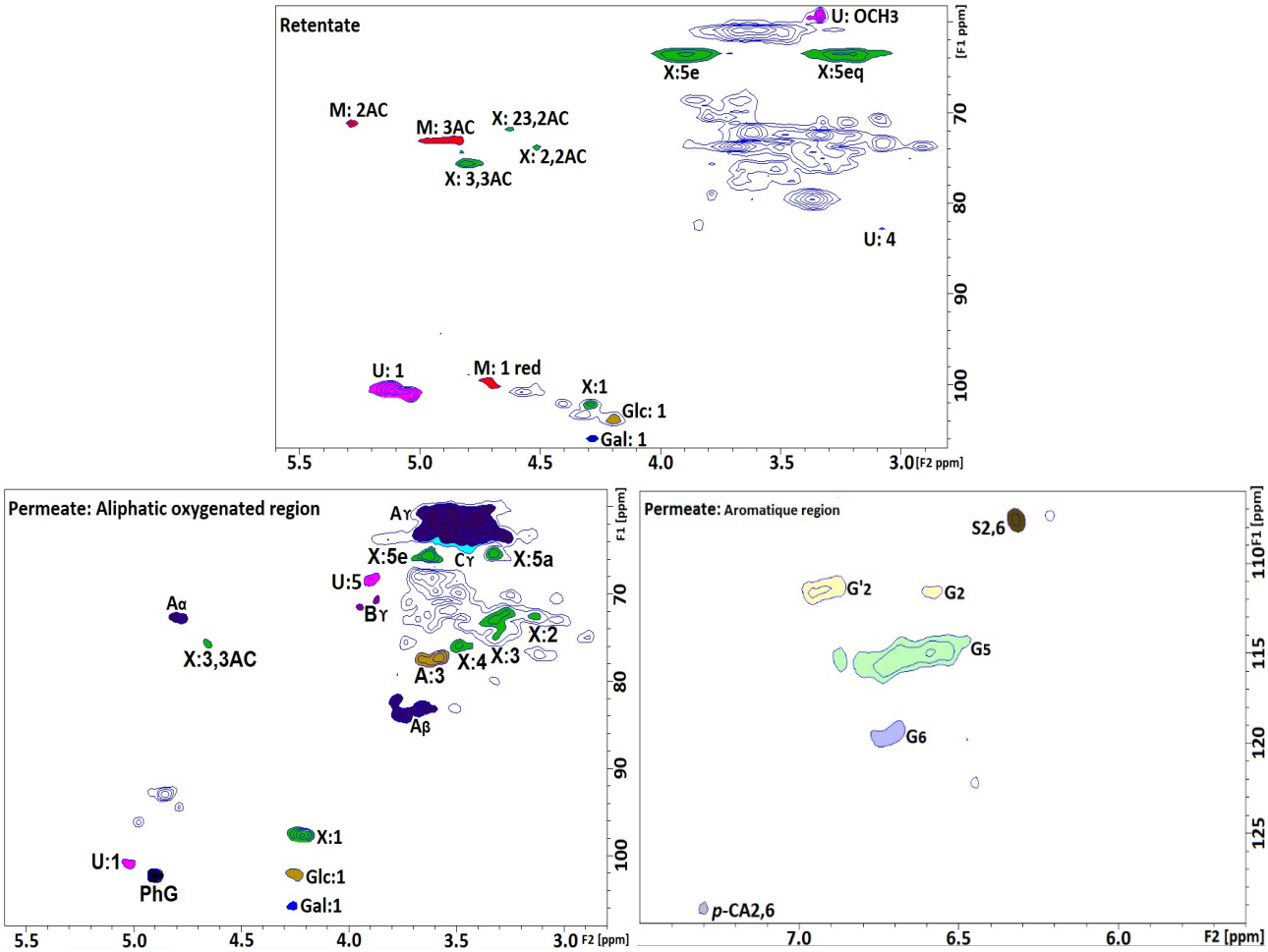


Figure 52.2D HSQC NMR Spectral analysis of hemicellulose: X: (1➔4) ***β***-D-Xylopyranosyl ; U: 4-O-methyl-***α***-D-glucuronic acid ; M: (1➔4) ***β***-D-Mannosyl ; G: (1 ➔4) ***β***-D- Glucosyl ; A: α-L-Araninosyl ; Ac: acetyl; A: Cγ/Hγ in β-O-4 linkage ; A: Cβ/Hβ in *β*-O-4 linkage from guaiacyl units ; C: Cγ/Hγ in phenylcoumaran substructure ; S: C2,6/H2,6 in syringyl units ; G: C2/H2 in guaiacyl units; G': C2/H2 in oxidized guaiacyl units; G: C5/H5 in guaiacyl units ; G: C6/H6 in guaiacyl units ; p-CA2,6: C2,6/H2,6 in p-hydroxybenzoate units;

The $^{13}C/^{1}H$ NMR correlations corresponding to the *O*-acetyl groups of hemicelluloses through the signals of of [*O*-Ac(1→2 / 3)-*β*-D-Xylp] and [*O*-Ac(1→2 / 3)-*β*-D-Manp] were gathered in Table 2 and determined the distribution pattern of signals. The acetic acid content presented in Tables 1 and 2 was determined by HPLC after saponification. The acetylation of **Permeate** and **Retentate** clearly

appeared in both HSQC spectra (Figure 52 and S 7). The acetylation degrees were determined by HPLC and are given in Table 18. Interestingly, it appears that diafiltration allowed to recover highly acetylated fraction in the retentate (13.2 % w / w). Based on previous report, a semi quantification of acetyl units in xylan and mannan backbone was performed using NMR and HPLC data (Mougnala Moukagni et al., 2021) and is gathered in Table 18. For **Retentate**, it is observed that both xylose and mannose residues are *O*2 and/or *O*3 acetylated with a comparable degree of acetylation ($DS_{Ac} \approx 0.40$). The permeate displayed globally a lower acetylation content (5.4 % w / w). However, according to the NMR data the acetylation in **Permeate** involved mostly the xylose units which are highly acetylated ($DS_{Ac} \approx 0.9$). A lower proportion of MeGlcUA was also detected in **Permeate** compared to **Retentate**. Soluble lignin was identified in the aromatic region of the HSQC NMR spectrum of the **Permeate** (S 7). An intense cross peak at δH / δC-3.60 / 56.19 ppm attested the presence of lignin methoxy groups. Guaiacyl and syringyl residues in soluble lignin were confirmed by the cross peak at δH / δC-6.92-111.33 ppm (C_2 / H_2 in G), δH / δC-6.69 / 115.28 ppm (C_5 / H_5 in G), δH / δC-6.70 / 119.28 ppm (C_6 / H_6 in G) and δH / δC-6.57 / 104.42 ppm ($C_{2,6}$ / $H_{2,6}$ in S). Small amounts of H units were also detected at 7.30 / 129.18 ppm ($C_{2,6}$ / $H_{2,6}$ in H). The presence of aryl-ether bonds seems to be attested by the cross signals at δH / δC-4.79 / 72.66 ppm and δH / δC-3.70 / 82.90 ppm assigned to CH$\boldsymbol{\alpha}$ and CH β in β-O-4 interunit linkages respectively. According to previous papers, lignin-carbohydrate linkages in LCC can be detected by HSQC NMR especially the phenyl-glycosidic bond correlation signal which was clearly assigned in the lateral chain region. The detection of this cross signal at δH / δC - 4.90 / 102.08 ppm in the **Permeate** suggested the presence of LCCs and justified the high-water solubility of these lignin fragments. This observation is in agreement with previous results showing that LCCs extracted by TMP or hydrolytic processes exhibited low molecular mass (0.4 – 7 kDa) and high water solubility (Steinmetz, 2020; Zhang et al., 2019).

Table 18. Acetylation degree

	Ac %[a]	DS_{Ac} Man*p*[b]	NMR δC / δH ppm	DS_{Ac} Xyl*p*[c]	NMR δC / δH ppm
Retentate	10.9	0.40	***O*-2** 71.60 / 5.30 ***O*-3**- 73.25 / 4.95	0.40	***O*-2** 73.85 / 4.52 **O-2,3** 71.80 / 4.70 ***O*-3** 76.00 / 4.82
Permeate	5.4	-	--	0.87	**O-3** 75.5 / 4.80

[a]Ac: Acetic acid (wt %); [b]DS_{AC} Man*p*: Degree of substitution of mannose residue with acetyl groups; [c]DS_{Ac}Xyl*p*: Degree of substitution of xylose residue with acetyl groups.

4 Conclusion

The steam explosion process of okoumé wood produced not only a pretreated cellulosic pulp but also a water effluent containing acid soluble lignin and oligo/polysaccharides displaying a broad of molecular weight distribution. The fractionation of this aqueous stream by diafiltration with a 10 kDa membrane allowed the separation of acetylated xylans and glucomannans of relatively high molecular weight from small pectic oligomers, low molecular mass xylans and soluble lignin including lignin carbohydrate complexes. The results presented in this paper are part of a research program aiming to valorize the co-products of the okoumé industry in Gabon according to the concept of biorefinery by using all the components of the feedstock including non-cellulosic biopolymers.

Acknowledgements:

EA 4370 LERMAB is supported by the French National Research Agency through the ARBRE Laboratory of Excellence (ANR-12-LABXARBRE-01). The authors thank the Agence Nationale des Bourses du Gabon (ANBG) and Campus France for the financial support. The authors also thank the LRGP (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés) and the RMN platform, Institut Jean Barriol, CRM2, Université de Lorraine - CNRS.

Résultats complémentaires

S 1. Suivi de l'exclusion de tailles par ultrafiltration. P : Perméat ; R : Rétentat

Une étude préliminaire a été réalisée pour comparer les performances de 3 membranes d'ultrafiltration présentant des seuils de coupure de 10 kDa, de 100 kDa et de 500 kDa. Les chromatogrammes indiqués à la Figure 53 ont montré une distribution de 5 familles de masse molaire (Mw) principalement regroupées en polysaccharide avec Mw > 15 kDa (pics 1 et 2)), Oligosaccharides avec Mw ≈ 6 kDa (pics 3 et 4) et mono/di/trisaccharides avec Mw ≈ 0,5 kDa (pic 5). On observe un déplacement des pics du perméat vers les masses molaires les plus faibles, par rapport au mélange initial. Par rapport au mélange initial, les membranes 100 kDa et 500 kDa présentent des pics plus intenses avec un gradient vers les grandes Mw, montrant que ces seuils sont très élevés pour favoriser une bonne séparation. D'autre part, la membrane de 10 kDa montre les pics avec une intensité approximativement similaire au mélange initial. Ces pics sont les moins intenses par rapport aux membranes 100 kDa et 500 kDa, ce qui révèle une transmission totale ou presque totale des fractions de faible Mw, et une rétention totale des composés de haut Mw. Ces observations suggèrent qu'une meilleure sélectivité de séparation peut être attendue avec la membrane de 10 kDa.

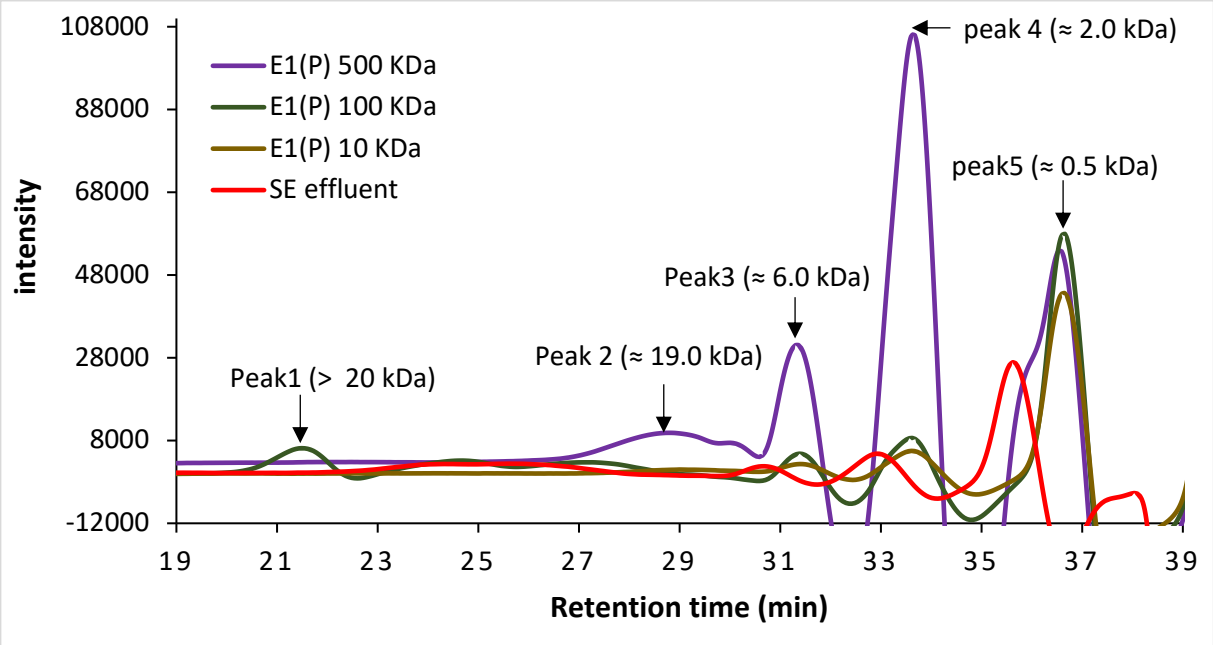


Figure 53. Chromatographie d'exclusion de tailles lors de l'UF

S 2. Pourcentage de matière sèche. UDM : Matière sèche non filtrée ; FDM : Matière sèche filtrée ; LW : Perte de poids

La mesure du taux de matière sèche a permis de déterminer la quantité en résidu sec dans le rétentat, le permeat et la solution avant la diafiltration. Les rendements en matières sèches ont été renseignés sur la Figure 54. La répartition de la matière sèche dans les deux compartiments montre que des proportions de matière sèche sont plus grandes dans le perméat avec 63,08 % de composé de faible poids moléculaire pour le perméat non filtré, contre 58,79 % pour le perméat filtré. Quant au rétentat, il est constitué de 35,60 % de de composés de haut poids moléculaire pour le rétentat non filtré, contre 35,09 pour le rétentat filtré.

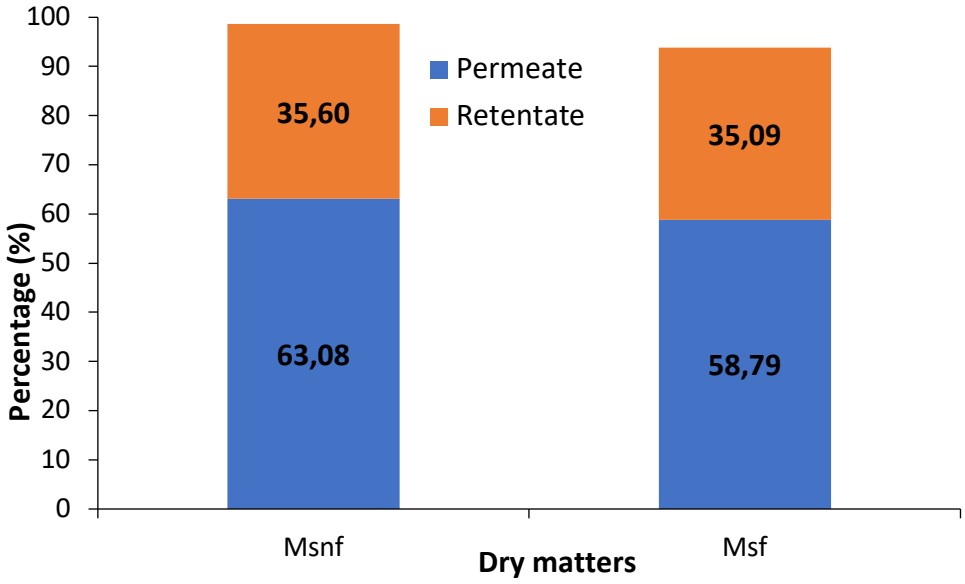


Figure 54. Matières sèches

S 3. Suivi de l'exclusion de tailles de l'effluent SE et des diavolumes (DV)

Les résultats présentés sur la Figure 55 montrent les profils d'élution obtenus par HPLC-SEC de la solution initiale et du retentat après chaque diavolume. On note une diminution progressive de l'intensité des pics des composés de faible poids moléculaire, et une augmentation de l'intensité des pics de composés de poids moléculaire élevé à mesure que le nombre de diavolumes augmente. Les composés de faibles poids moléculaires ont été quasiment éliminés de la solution initiale lors de la diafiltration. Ce résultat était attendu à cause de l'ajout d'eau qui favorise le transfert des petits solutés vers le perméat. On note avec intérêt que l'enrichissement des sucres de faible poids moléculaire diminue au cours de la diafiltration, alors que l'enrichissement en polysaccharides augmente continuellement.

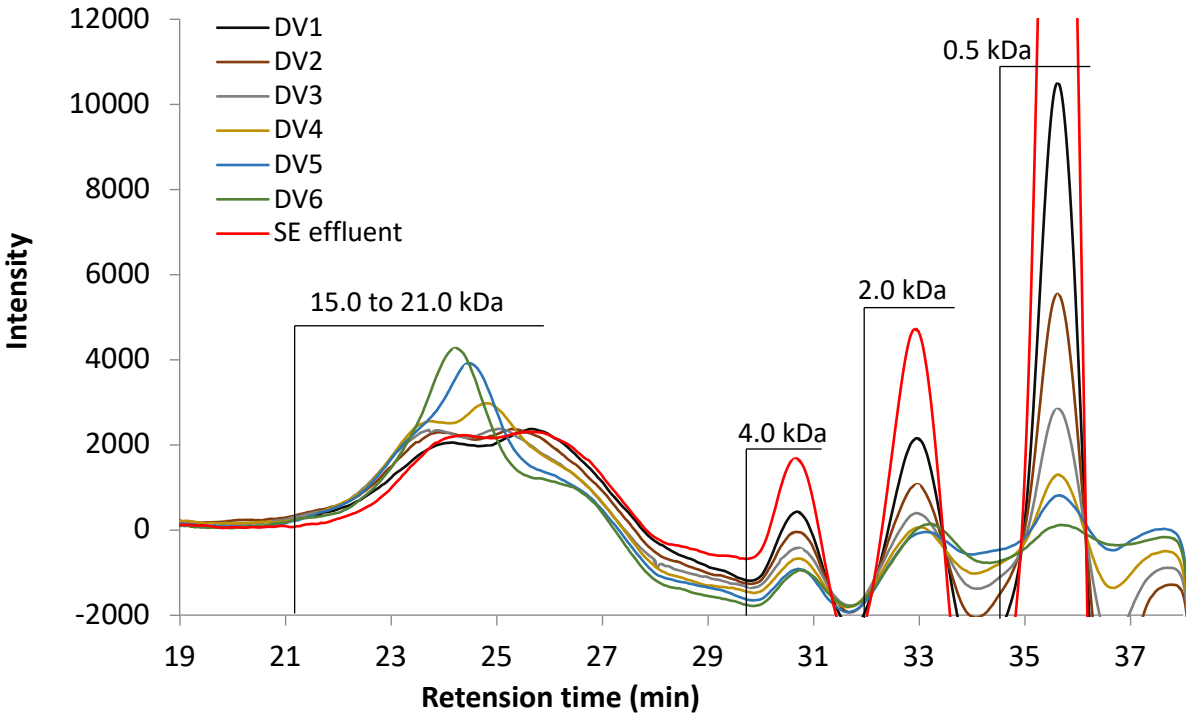


Figure 55. Chromatographie d'exclusion de tailles de l'effluent SE et des diavolumes (DV)

S 4. Poids moléculaire (Mw) et polydispersité (Mw/Mn) pour le perméat et le rétentat extraits

L'analyse des masses moléculaires des 2 fractions de la diafiltration confirme l'enrichissement des saccharides de petits poids moléculaires dans le perméat alors que l'enrichissement de saccharides de grande taille augmente (Tableau 19).

Tableau 19. Valeurs des poids moléculaires (Mw) et des indices de polydispersité (Mw / Mn)

	Peaks	Mn	Mw	Mw / Mn
Permeate	1	5185	5907	1.13932
	2	2350	2415	1.02744
	3	1142	1179	1.03213
	4	498	506	1.01666
Retentate	1	22643	29144	1.28711
	2	9433	9807	1.03958
	3	3296	3296	1.00006
	4	2367	2394	1.01117

S 5. Analyse spectrale RMN 2D HSQC du perméat

Afin d'approfondir les analyses sur les structures chimiques des différentes fractions après diafiltration, la mesure de la RMN hétéro-nucléaire bidimensionnelle à corrélation quantique unique (HSQC) a été utilisée dans cette étude. Le spectre RMN HSQC du perméat est renseigné sur la Figure 56. Les principaux signaux ont été attribués en se basant sur les données de la littérature précédente. Il est intéressant de noter la présence de trois principales régions, notamment la région (I) des chaînes latérales aliphatiques (δC / δH 5- 38 /0,5-2,5), la région (II) des chaînes latérales aliphatiques oxygénées (δC / δH 45-105 / 2,5-5,6), et la région (III) aromatique (δC / δH 95-135 / 5,6-8,0). Dans la région des chaines latérales aliphatiques oxygénées, les signaux du β-(1→4)-D-xylp O-acétylé du xylane ont été détectés sur le spectre HSQC du perméat. De plus, des corrélations provenant des unités 4-O-méthyl-α-D-GlcUA et α-L-arabinofuranosyl ont été observées dans cette région. Cette région du spectre a également montré des signaux (δC / δH 50-90 / 2,5-6,0), correspondant aux liaisons β-O-4 aryléther, et aux liaisons Cα-Hα et Cγ-Hγ. Dans la région aromatique (δC / δH 100-150 / 6,0-8,0), le spectre HSQC du perméat a présenté les signaux des principales unités S, G et H de la lignine, et des résidus pCA. En plus, le glycoside de phényle (PhG) des liaisons LCC a été particulièrement observé.

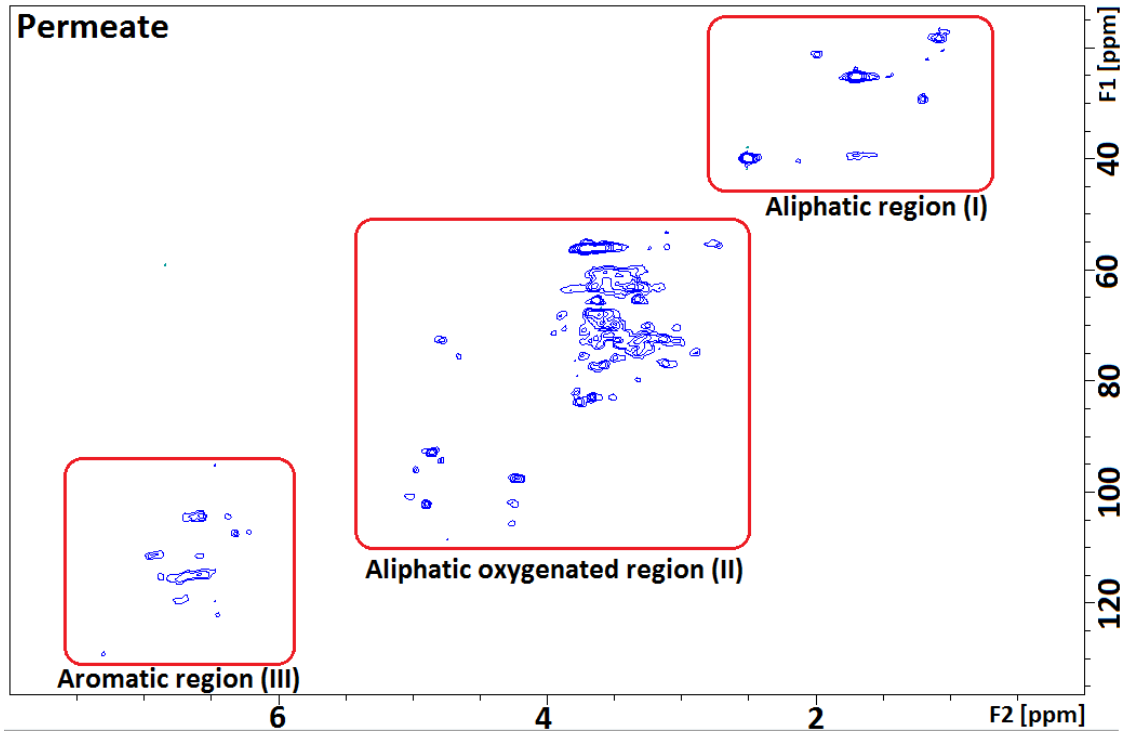


Figure 56. Spectre RMN 2D HSQC du perméat

Conclusion du Chapitre 4

Le procédé d'explosion a la vapeur a permis d'extraire des hémicelluloses d'okoumé sous forme d'un hydrolysat aqueux. Ces effluents aqueux ont ensuite été filtrés, en débutant par une étude préliminaire des performances de 3 membranes d'ultrafiltration (seuil de coupure 10 kDa, 100 kDa et 500 kDa), puis en une analyse de l'effluent initial et du perméat obtenus par SEC. Cette étape a montré que la membrane de 10 kDa produisait de meilleurs résultats avec un perméat riche en composés de faibles poids moléculaires et un retentat enrichit en composé de hauts poids moléculaires. Pour une séparation plus efficace des constituants de l'effluent aqueux de l'explosion à la vapeur d'okoumé, une diafiltraion de type séquentielle dilution a été réalisée avec la membrane de 10 kDa. Cette étape a permis d'isoler des xylanes acétylés *O*2 et / ou *O*3 et une proportion plus faible de glucomannanes acétylés *O*2 et/ou *O*3, de hauts poids moléculaires dans le rétentat. Les masses moléculaires des polysaccharides du retentat étaient plus élevées que celles obtenues par précipitation à l'éthanol dans le chapitre précédant. Dans le perméat, les composés de faible poids moléculaire, principalement les xylanes fortement acétylés, les sucres pectiques, une quantité élevée de lignine soluble, ainsi que les complexes lignine-glucides (LCC) ont été isolés. La filtration membranaire est donc une bonne approche alternative pour la séparation des polysaccharides et d'autres biomolécules contenues dans les hydrolysats du bois d'okoumé. Combinée à l'explosion à la vapeur, ce procédé pourrait donc permettre de traiter des volumes importants de biomasses en vue d'une valorisation des connexes d'okoumé.

Références bibliographiques

Al-Rudainy, B., Galbe, M., Wallberg, O., 2020. From lab-scale to on-site pilot trials for the recovery of hemicellulose by ultrafiltration: Experimental and theoretical evaluations. Sep. Purif. Technol. 250, 117187. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117187

Andersson, A., Persson, T., Stålbrand, H., Jönsson, A.-S., 2007. Comparison of diafiltration and size-exclusion chromatography to recover hemicelluloses from process water from thermomechanical pulping of spruce. Appl. Biochem. Biotechnol. 136, 13.

Barbanera, M., Lascaro, E., Foschini, D., Cotana, F., Buratti, C., 2018. Optimization of bioethanol production from steam exploded hornbeam wood (Ostrya carpinifolia) by enzymatic hydrolysis. Renew. Energy 124, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.022

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2019b. Steam explosion process for the selective extraction of hemicelluloses polymers from spruce sawdust. Ind. Crops Prod. 141, 111757. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111757

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2019c. Steam explosion process for the selective extraction of hemicelluloses polymers from spruce sawdust. Ind. Crops Prod. 141, 111757. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111757

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Desobry, S., Brosse, N., 2020. Elaboration of hemicellulose-based films: Impact of the extraction process from spruce wood on the film properties. Carbohydr. Res. 497, 108111. https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108111

Desharnais, L., Du, F., Brosse, N., 2011. Optimization of Galactoglucomannans and Acidic Arabinans Recovery in Softwood. Ind. Eng. Chem. Res. 50, 14217–14220. https://doi.org/10.1021/ie202273d

Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T., 2005. Hemicellulose, in: Heinze, T. (Ed.), Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use, Advances in Polymer Science. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–67. https://doi.org/10.1007/b136816

Ebringerová, A., Hromádková, Z., Kačuráková, M., Antal, M., 1994. Quaternized xylans: synthesis and structural characterization. Carbohydr. Polym. 24, 301–308. https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90075-2

Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., Ayoub, A., 2017. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. Ind. Crops Prod. 107, 370–377. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.055

Feng, Y.-H., Cheng, T.-Y., Yang, W.-G., Ma, P.-T., He, H.-Z., Yin, X.-C., Yu, X.-X., 2018. Characteristics and environmentally friendly extraction of cellulose nanofibrils from sugarcane bagasse. Ind. Crops Prod. 111, 285–291. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.041

Giummarella, N., Lawoko, M., 2017a. Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood. ACS Sustain. Chem. Eng. 5, 5156–5165. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00511

Gröndahl, M., Eriksson, L., Gatenholm, P., 2004. Material Properties of Plasticized Hardwood Xylans for Potential Application as Oxygen Barrier Films. Biomacromolecules 5, 1528–1535. https://doi.org/10.1021/bm049925n

Hägglund, E., Lindberg, B., Mcpherson, J., Sillén, L.G., Thorell, B., 1956. Dimethylsulphoxide, a Solvent for Hemicelluloses. https://doi.org/10.3891/ACTA.CHEM.SCAND.10-1160

Haimer, E., Wendland, M., Potthast, A., Henniges, U., Rosenau, T., Liebner, F., 2010. Controlled precipitation and purification of hemicellulose from DMSO and DMSO/water mixtures by carbon dioxide as anti-solvent. J. Supercrit. Fluids 53, 121–130.

https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.02.009
Hartman, J., Albertsson, A.-C., Lindblad, M.S., Sjöberg, J., 2006a. Oxygen barrier materials from renewable sources: Material properties of softwood hemicellulose-based films. J. Appl. Polym. Sci. 100, 2985–2991. https://doi.org/10.1002/app.22958
Hong, J.E., Pyo, H., Park, S.-J., Lee, W., 2007. Determination of hydroxy metabolites of polychlorinated biphenyls in plasma and tissue by gas chromatography/mass spectrometry. J. Chromatogr. B 856, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.001
Iiyama, K., Lam, TBT., Stone, B.A., 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. Plant Physiol. 104, 315–320.
Jönsson, A.-S., Nordin, A.-K., Wallberg, O., 2008. Concentration and purification of lignin in hardwood kraft pulping liquor by ultrafiltration and nanofiltration. Chem. Eng. Res. Des. 86, 1271–1280. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2008.06.003
Krawczyk, H., Persson, T., Andersson, A., Jönsson, A.-S., 2008a. Isolation of hemicelluloses from b
Lin, S.Y., Dence, C.W. (Eds.), 1992. Methods in Lignin Chemistry, Springer Series in Wood Science. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7
Lindblad, M.S., Ranucci, E., Albertsson, A.-C., n.d. Biodegradable Polymers from Renewable Sources. New Hemicellulose-Based Hydrogels 6.
Maartens, A., Jacobs, E.P., Swart, P., 2002. UF of pulp and paper effluent: membrane fouling-prevention and cleaning. J. Membr. Sci. 209, 81–92. https://doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00266-1
Meng, F., Chae, S.-R., Drews, A., Kraume, M., Shin, H.-S., Yang, F., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. Water Res. 43, 1489–1512. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.044
Michalak, L., Knutsen, S.H., Aarum, I., Westereng, B., 2018. Effects of pH on steam explosion extraction of acetylated galactoglucomannan from Norway spruce. Biotechnol. Biofuels 11, 311. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1300-z
Mikkonen, K.S., Tenkanen, M., 2012. Sustainable food-packaging materials based on future biorefinery products: Xylans and mannans. Trends Food Sci. Technol. 28, 90–102. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.012
Mohammad, A.W., Ng, C.Y., Lim, Y.P., Ng, G.H., 2012. Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane Fouling, and Fouling Control. Food Bioprocess Technol. 5, 1143–1156. https://doi.org/10.1007/s11947-012-0806-9
Morais de Carvalho, D., Martínez-Abad, A., Evtuguin, D.V., Colodette, J.L., Lindström, M.E., Vilaplana, F., Sevastyanova, O., 2017a. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. Carbohydr. Polym. 156, 223–234. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.022
Morais de Carvalho, D., Martínez-Abad, A., Evtuguin, D.V., Colodette, J.L., Lindström, M.E., Vilaplana, F., Sevastyanova, O., 2017b. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. Carbohydr. Polym. 156, 223–234. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.022
Mougnala Moukagni, E., Ziegler-Devin, I., Safou-Tchima, R., Brosse, N., 2021. Extraction of acetylated glucuronoxylans and glucomannans from Okoume (Aucoumea klaineana Pierre) sapwood and heartwood by steam explosion. Ind. Crops Prod. 166, 113466. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113466
Nitzsche, R., Gröngröft, A., Goj, I., Kraume, M., 2020. Ultrafiltration of Beechwood Hydrolysate for Concentrating Hemicellulose Sugars and Removal of Lignin—Parameter Estimation Using Statistical Methods and Multiobjective Optimization. Ind. Eng. Chem. Res. 59, 7875–7887. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c00487
Obame, S.N., 2020. Optimisation du prétraitement par explosion à la vapeur des coproduits de

l'industrie du bois d'okoumé : vers une production d'éthanol cellulosique (phdthesis). Université de Lorraine.
Obame, S.N., Ziegler-Devin, I., Safou-Tchima, R., Brosse, N., 2019. Homolytic and Heterolytic Cleavage of β-Ether Linkages in Hardwood Lignin by Steam Explosion. J. Agric. Food Chem. 67, 5989–5996. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01744
Oriez, V., Peydecastaing, J., Pontalier, P.-Y., 2019. Separation of sugarcane bagasse mild alkaline extract components by ultrafiltration – Membrane screening and effect of filtration parameters. Process Biochem. 78, 91–99. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.006
Overend, R.P., Chornet, E., Gascoigne, J.A., 1987. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments [and Discussion]. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Sci. 321, 523–536.
Peng, F., Ren, J.-L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., Sun, R.-C., 2010a. Fractionation of Alkali-Solubilized Hemicelluloses from Delignified *Populus gansuensis* : Structure and Properties. J. Agric. Food Chem. 58, 5743–5750. https://doi.org/10.1021/jf1003368
Persson, T., Jönsson, A.-S., Zacchi, G., 2005. Fractionation of hemicelluloses by membrane filtration: 14th European Biomass Conference. Proc. 14th Eur. Biomass Conf. 1693–1696.
Rowley, J., Decker, S.R., Michener, W., Black, S., 2013. Efficient extraction of xylan from delignified corn stover using dimethyl sulfoxide. 3 Biotech 3, 433–438. https://doi.org/10.1007/s13205-013-0159-8
Samanta, A.K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A.P., Senani, S., Sridhar, M., 2015. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre 5, 62–71. https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003
Sauvageon, T., Lavoie, J.-M., Segovia, C., Brosse, N., 2018. Toward the cottonization of hemp fibers by steam explosion – Part 1: defibration and morphological characterization. Text. Res. J. 88, 1047–1055. https://doi.org/10.1177/0040517517697644
Sjöström, E., 1993a. WOOD POLYSACCHARIDES, in: Wood Chemistry. Elsevier, pp. 51–70. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092589-9.50007-3
Sjöström, E., Westermark, U., 1999b. Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution, in: Sjöström, Eero, Alén, R. (Eds.), Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking, Springer Series in Wood Science. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03898-7_1
Steinmetz, V., 2020. Procédés membranaires et biotechnologiques pour la valorisation de ressources végétales résiduaires : cas de la lignine thermomécanique (phdthesis). Université de Strasbourg.
Sun, R., Tomkinson, J., 2000. Fractionation and Characterization of Water-soluble Hemicelluloses and Lignin from Steam-exploded Birchwood. Int. J. Polym. Mater. 45, 1–19. https://doi.org/10.1080/00914030008034866
Sun, S.-N., Cao, X.-F., Xu, F., Sun, R.-C., Jones, G.L., Baird, M., 2014. Structure and thermal property of alkaline hemicelluloses from steam exploded Phyllostachys pubescens. Carbohydr. Polym. 101, 1191–1197. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.109
Sun, S.N., Yuan, T.-Q., Li, M.F., Cao, X.F., Xu, F., Liu, Q.Y., 2012. Structural characterization of hemicelluloses from bamboo culms (neosinocalamusaffinis). Cellul. Chem. Technol. 46, 165–176.
Sun, X.-F., Sun, Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Extraction and Characterization of Original Lignin and Hemicelluloses from Wheat Straw. J. Agric. Food Chem. 53, 860–870. https://doi.org/10.1021/jf040456q
Tenkanen, M., Tamminen, T., Hortling, B., 1999. Investigation of lignin-carbohydrate complexes in kraft pulps by selective enzymatic treatments. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 241–248. h

Timell, T.E., 1967a. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1, 45–70. https://doi.org/10.1007/BF00592255
Timell, T.E., 1967b. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1, 45–70. https://doi.org/10.1007/BF00592255
Timell, T.E., 1967c. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1, 45–70. https://doi.org/10.1007/BF00592255
Tutt, M., Kikas, T., Kahr, H., Pointner, M., Kuttner, P., Olt, J., n.d. Using steam explosion pretreatment method for bioethanol production from floodplain meadow hay 8.
Uraki, Y., Usukura, Y., Kishimoto, T., Ubukata, M., 2006. Amphiphilicity of a lignin-carbohydrate complex 60, 659–664. https://doi.org/10.1515/HF.2006.111
Wang, C., Yang, J., Wen, J., Bian, J., Li, M., Peng, F., Sun, R., 2019. Structure and distribution changes of Eucalyptus hemicelluloses during hydrothermal and alkaline pretreatments. Int. J. Biol. Macromol. 133, 514–521. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.127
Wang, K., Jiang, J.-X., Xu, F., Sun, R.-C., 2009. Influence of steaming explosion time on the physic-chemical properties of cellulose from Lespedeza stalks (Lespedeza crytobotrya). Bioresour. Technol. 100, 5288–5294. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.019
Wang, S., Ru, B., Lin, H., Sun, W., 2015. Pyrolysis behaviors of four O-acetyl-preserved hemicelluloses isolated from hardwoods and softwoods. Fuel 150, 243–251. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.02.045
Wang, Y., Azhar, S., Lindström, M.E., Henriksson, G., 2015. Stabilization of Polysaccharides During Alkaline Pre-Treatment of Wood Combined with Enzyme-Supported Extractions in a Biorefinery. J. Wood Chem. Technol. 35, 91–101. https://doi.org/10.1080/02773813.2013.875041
Willför, S., Sundberg, K., Tenkanen, M., Holmbom, B., 2008a. Spruce-derived mannans – A potential raw material for hydrocolloids and novel advanced natural materials. Carbohydr. Polym. 72, 197–210. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.006
Willför, S., Sundberg, K., Tenkanen, M., Holmbom, B., 2008b. Spruce-derived mannans – A potential raw material for hydrocolloids and novel advanced natural materials. Carbohydr. Polym. 72, 197–210. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.08.006
Yue, P.-P., Fu, G.-Q., Hu, Y.-J., Bian, J., Li, M.-F., Shi, Z.-J., Peng, F., 2018a. Changes of Chemical Composition and Hemicelluloses Structure in Differently Aged Bamboo (*Neosinocalamus affinis*) Culms. J. Agric. Food Chem. 66, 9199–9208. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03516
Zhao, X., Tong, T., Li, H., Lu, H., Ren, J., Zhang, A., Deng, X., Chen, X., Wu, A.-M., 2017. Characterization of hemicelluloses from Neolamarckia cadamba (Rubiaceae) during xylogenesis. Carbohydr. Polym. 156, 333–339. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.041
Ziegler-Devin, I., Chrusciel, L., Brosse, N., 2021. Steam Explosion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Mini-Review of Theorical and Experimental Approaches. Front. Chem. 9, 705358. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.705358.

Chapitre 5:

Effect of combined treatments for the Extraction of tropical hardwood polymeric hemicelluloses

Chapitre 5 : Effect of combined treatments for the Extraction of tropical hardwood polymeric hemicelluloses

Contexte et objectif général

Dans les parties précédentes, les hémicelluloses ont été extraites du bois d'okoumé en utilisant un prétraitement alcalin ou par un solvant (le DMSO) ou encore par explosion à la vapeur. Toutes ces méthodes présentent certaines limites telles que la dégradation partielle des hémicelluloses et / ou des rendements d'extraction relativement faibles dus à une perturbation incomplète de la matrice llignocellulosique. Aucune de ces méthodes prises séparément ne peut conduire à des rendements d'extraction importants sans dénaturer profondément la chaine polysaccharidique.

Dans cette partie, une approche en deux étapes, qui combine un prétraitement par explosion à la vapeur avant ou après une extraction séquentielle en milieu basique et/ou blanchiment par délignification a été appliquée pour extraire les hémicelluloses du bois d'okoumé.

Dans la littérature cette approche visant à lever les phénomènes de récalcitrance pour l'extraction d'hémicelluloses a déjà été abordée. Ainsi un procédé synergique basé sur un traitement hydrothermique et alcalin a été étudié par plusieurs auteurs (Sun et al., 2014; Wang et al., 2019). Dans ce type de prétraitement, la méthode hydrothermique vise sélectivement les hémicelluloses ensuite un traitement alcalin est appliqué pour isoler la lignine et les hémicelluloses résiduelles.

La structure chimique des hémicelluloses obtenues a été étudiée en détail pour une compréhension approfondie des processus chimiques engagés. Nous nous sommes également appliqués à étudier l'impact des traitements à l'échelle pariétale. Des techniques microscopiques (microscopie optique, de fluorescence, électronique) ont été mobilisées afin de mieux comprendre l'impact des traitements et des traitements combinés sur la structure des parois végétales.

L'ensemble des résultats de cette étude est présenté sous forme d'un manuscrit intitulé « Effect of combined treatments for the Extraction of tropical hardwood polymeric hemicelluloses ».

Article

Effect of combined treatments for the Extraction of tropical hardwood polymeric hemicelluloses

Errol Mougnala Moukagni[1], Arnaud Besserer[1], Isabelle Ziegler-Devin[1], Rodrigue Safou-Tchima[2], Nicolas Brosse[1]

[1] Université de Lorraine, INRAE, LERMAB, F-54000 Nancy, France

[2] Laboratoire de Recherche et de Valorisation du Matériau Bois (LaReVa Bois). Ecole Normale Supérieure d'Enseignement Technique (ENSET). BP 3989, Libreville, Gabon.

Abstract

Five cumulative pretreatments involving bleaching and/or steam explosion and/or alkaline extraction processes have been studied for polymeric hemicelluloses extraction from okoumé sapwood. Morphological analysis of the cell wall of untreated and steam exploded wood was performed by optical and fluorescence microscopy after dyeing. Hemicelluloses extracts were characterized by HPEAC / PAD ion chromatography, steric exclusion chromatography (SEC), and high-performance liquid chromatography (HPLC). Near infrared spectroscopy, FTIR and HSQC - NMR spectroscopy analyses were also performed on the hemicelluloses extracts. Alkali extraction of bleached wood led to high yields (≈ 19 %) of high molecular mass hemicelluloses (Mw ≈ 65 kDa). It has been shown that SE pretreatment allowed the recovery of highly acetylated polymers with a low degree of branching. A bleaching step prior to SE increased accessibility to hemicelluloses extraction but weakened the pulp and led to the removal of micro-particles of wood during the SE.

Key words: Aucoumea klaineana Pierre; steam explosion; acetylated glucomanans; acetylated glucuronoxylans; sapwood; heartwood

1 Introduction

Many industrial applications are based on the use of non-cellulosic polysaccharides such as guar and arabic gums, carrageenan and xanthan gum in various sectors and this interest is currently growing. In this context, wood could constitute an interesting feedstock. Indeed, wood is composed of 20 - 30 % of a complex family of non-cellulosic polysaccharides called hemicelluloses. In hardwood the dominant hemicelluloses are glucuronoxylans (20-35 %) composed of β-(1→4)-linked Xyl*p* with Ara*f* subunits, often acetylated at C2 and / or C3 position. These polysaccharides are included in a complex and recalcitrant three-dimensional network by forming covalent or non-covalent bonds with the other constituents of the wall. Giummarella and Lawoko (Giummarella and Lawoko, 2017c) showed that lignin-carbohydrate bonds play important roles in this recalcitrance through phenyl glycoside and benzyl ether-types in birch. As a result, regardless of the method considered, the extraction process used lead to relatively low hemicelluloses yields and greatly impacts their chemical structure and molar mass.

Among all the processes described for hemicelluloses extraction from wood, water-based methods have attracted most attention due to their lower environmental impact. Hydrolysis degradation by acid or basic catalysis lead to the solubilization of polysaccharide fragments. The hydrolysis sensitive linkages affected in these reactions include acetyl groups on the hemicellulose backbone, glycosidic linkages and lignocellulosic complex which include ester and ether linkage with lignin. Alkali treatment and especially sodium hydroxide have been shown to be efficient for high molecular weight hemicelluloses recovery in high yields. On an industrial scale, there is interest in isolating hemicelluloses fractions from the effluents of the thermomechanical pulping process (Persson and Jönsson, 2010) or for prehydrolysis methods before chemical pulping. Hemicelluloses extraction has been also studied by hydrothermal treatment using sub-critical water, by microwave, high voltage electric discharges.

Steam explosion (SE) is a physico-chemical pretreatment commonly used for the fractionation of wood and for its biochemical conversion into bioethanol. It is a hydrothermal process involving two steps: (1) a hydrothermal phase at 170 °C - 210 °C which provokes a hydrolytic breakdown of the lignocellulosic network and (2) a rapid depressurization inducing a defibration of the material.

As a result, a strong increase of cellulose digestibility by biocatalyst has been reported, associated with an increase of the lignocellulose components (e.g. lignin, hemicelluloses) extractability.

Sun et al. 2014 (Sun et al., 2014) studied the alkali extraction of arabinoxylans in high yields from exploded bamboo chips. In addition to the cellulosic pulp, a high amount of hemicellulosic sugars can be recovered in the water stream of SE in the form of monomeric sugar, oligomers and polymers. Simangunsong et al. 2020 (Simangunsong et al., 2020) studied the xylans recovery from SE of beechwood in neutral conditions at 190 °C during 10 min. They showed that ≈ 10 % w / w (based on initial dry wood) of xylans were recovered in the effluents. Azavedo Carvalho et al. (2018) reported the production of xylo-oligosaccharides from sugarcane bagasse by acid-catalyzed SE.

Studies have also been carried out to study changes at the parietal level using microscopic approaches (Auxenfans et al., 2017; Chabbert et al., 2018; Lancha et al., 2021; Santo et al., 2020). In addition to these methods, Vazquez-Cooz and Meyer described a differential staining approach which provides cheap and fast clues on the relative amount of cellulose and lignin in wood tissue matrix. This technique gives in situ indications of the effect of pretreatment using a standard optical microscope. It was previously reported that both dyes can bind cellulose but Astra blue can only reach cellulose when lignin is removed. It results in a red staining of lignified tissues and cells with less lignin in their cell walls are stained in blue (Srebotnik and Messner, 1994).

In previous works, we studied the extraction of hemicelluloses from *Aucoumea klaineana* Pierre (okoume) sapwood. okoumé is a tropical hardwood used industrially in Gabon for the production of veneers and plywood. The wood industry in Gabon generates huge quantities of co-products including okoumé sapwood for which optimum use is sought. SE was optimized for the recovery of high molecular mass acetylated glucuronoxylans and glucomannans in the liquid effluents of SE. However, the effect of SE on the disruption of the lignocellulosic matrix is not complete resulting in partial degradation of polysaccharide chains and limited yields.

In the present paper, combined processes involving SE and bleaching or bleaching then SE have been studied one of the goals being to gain in understanding of the importance of the lignin-polysaccharides complex in the recalcitrance. The obtained hemicelluloses were carefully characterized by high performance anion exchange chromatography (HPAEC / PAD), high performance liquid chromatography (HPLC), Near infrared spectroscopy (NIRS), Fourier transform

infrared spectroscopy (FT-IR) and heteronuclear quantum coherence (HSQC). Microscopic analyses were also performed to evaluate the effect of the steam explosion on the wood cell wall.

2 Material and methods

2.1 Raw material

The sapwood used in this study was harvested from okoumé wood from the N'Zamaligué natural forest in northern Gabon. The samples were first air-dried, then saw-cut and ground with a knife mill to obtain particles of about 2 mm.

2.2 Combined pre-treatments for hemicelluloses extraction

The workflow of the process for hemicelluloses extraction is shown on Figure 57. For the first extraction route (1), the sawdust was dried at 105°C for 24 h. Then, 50 g of biomass were freed from their extractables by a toluene/ethanol/methanol mixture (4 :1 : 1) in a soxhlet extractor (Safou-Tchiama et al., 2007a). The extracted free sawdust dried at 40 °C was dispersed in 3.7 L of permuted water. Sodium chlorite (29.5 g) and glacial acetic acid (29.5 mL) were added to the mixture and the whole was refluxed for 2 h at 70 °C. Sodium chlorite and glacial acetic acid were added every 2 h until complete bleaching. The resulting delignified residue was recovered by vacuum filtration and washed well with deionized water before drying at 40 °C. The holocellulose was placed in a pressurized reactor under a temperature of 170 °C for a residence time of 10 min and then exploded by sudden decompression. The hydrolysate from the explosion was recovered by vacuum filtration and concentrated using a rotary evaporator. The hemicelluloses were precipitated by adding 4 volumes of pure ethanol and separated from the remaining liquid by centrifugation at 4000 rpm for 10 min. Finally, the precipitate was gently re-solubilized in distilled water and dialyzed with a membrane with a cut-off of 2.5 kDa, before being lyophilized. These hemicelluloses are names B / SE.

For the second extraction route, 50 g of dried biomass was impregnated with water or sodium hydroxide and then pretreated by steam explosion (170°C ; 10 min). After the pretreatment, the liquid phase was recovered by vacuum filtration, the hemicelluloses were obtained by ethanol precipitation, as previously described. The hemicelluloses fractions from the liquid phases of the steam explosion of wood impregnated with water or sodium hydroxide are named H_2O-SE and NaOH respectively. Furthermore, the solid phase was recovered, air-dried and oven-dried at 104°C. Then, the biomass

was extracted with a toluene/ethanol/methanol mixture (4 :1 :1) and delignified with sodium chlorite and glacial acetic acid. Finally, the biomass was treated with a 2 % alkaline NaOH solution at 70 °C. The supernatant was adjusted to pH 5.5 to 6.0 with glacial acetic acid before concentration. Hemicelluloses were recovered by ethanol precipitation followed by centrifugation, dialysis, and lyophilization. These hemicelluloses are names SE / B.

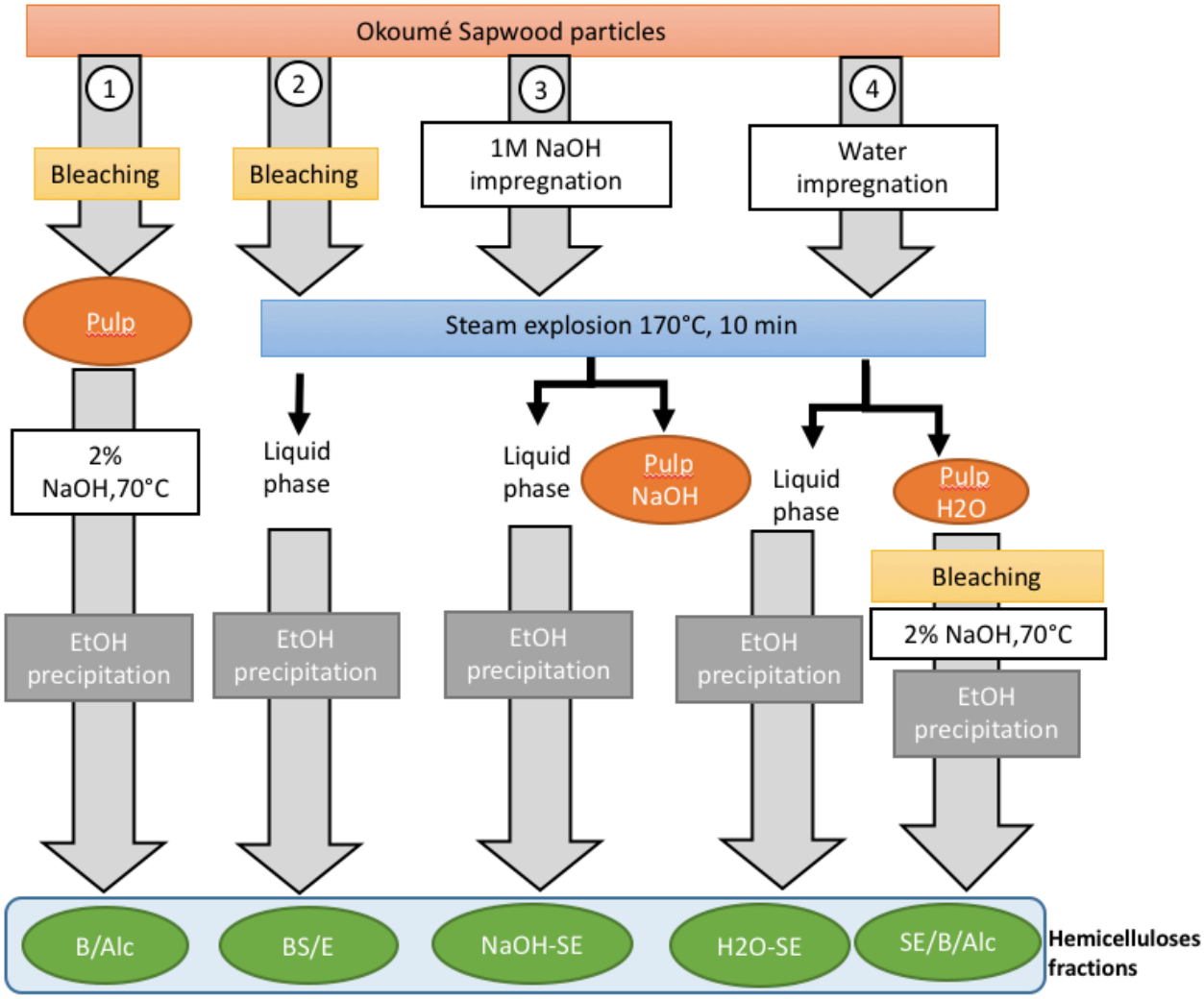


Figure 57. Process of extraction of hemicelluloses. The five different routes are shown. See text for more details. B / Alc: hemicelluloses recovered after bleaching and alkaline extraction. B / SE: hemicelluloses recovered after okoumé sapwood bleaching and steam explosion. SE - NaOH: hemicelluloses after steam explosion of alkali impregnated biomass. hemicelluloses recovered after okoumé sapwood bleaching and steam explosion. SE-H_2O : hemicelluloses after steam explosion of water impregnated biomass. SE / B: hemicelluloses after steam explosion under neutral conditions and subsequent bleaching and alkaline extraction of hemicelluloses.

2.3 Measurement of monosaccharides and uronic acids using HPAEC-PAD

Monosaccharides and uronic acids from the extracts were analyzed according to NREL/TP-510-42618, using a high-performance anion exchange chromatograph coupled to pulsed amperometric detection (HPAE-PAD, ICS-3000 Dionex) with a Dionex CarboPac PA-20 analytical column (3 × 150 mm). The separation was performed with an isocratic eluent flow rate of 0.4 $mL.min^{-1}$ at 35 °C with the following composition: 99.2 % ultrapure water / 0.8% 250 mM NaOH (0-20min); 75 % ultrapure water 20 % 250 mM NaOH / 5 % 1 M of CH_3COONa - 20 mM NaOH (20-37min) and 40 % ultrapure water / 20 % 250 mM NaOH / 40 % 1 M CH_3COONa – 20 mM NaOH (37 - 45min). Each elution was followed by a wash and equilibration time. External standards were used for the analysis of: fucose (Fuc), glucose (Glc), xylose (Xyl), galactose (Gal), mannose (Man), rhamnose (Rha), arabinose (Ara), glucuronic acid (GlcA) and galacturonic acid (GalA).

2.4 Acetic acid measurement by high performance liquid chromatography (HPLC)

The acetic acid content of hemicelluloses was determined after a saponification reaction. Acetic acid was analyzed according to NREL/TP-510-42623. The concentration was measured by high-performance liquid chromatography coupled to a UV detector (Shimadzu Prominence) using a RezexTM RHM-Monosaccharide H^+ column (8 %) with sulfuric acid (H_2SO_4 - 5.10^{-3} M) as the mobile phase with an isocratic flow rate of 0.8 $mL.min^{-1}$ and a temperature of 60°C. the wavelength for acetic acid detection was 210 nm. External calibration was performed with six calibration points per standard.

2.5 Steric Exclusion Chromatography

Molecular weight distribution of hemicelluloses was performed by a Shimadzu Prominence HPLC system. The stationary phase was composed of two columns connected in series: Phenomenex Polysep GFC-P as guard column (7.8 x 35 mm), Phenomenex Polysep GFC-P3000 and GFC-P2000 as analytical columns (7.8 x 300 mm). Samples were separated at 35°C with a flow rate of 0.7 $mL.min^{-1}$ and an eluent consisting of 0.25 M $NaNO_3$. Detection was done with a refractive index detector (Shimadzu RID-20A). Pullulan standards of known molar masses were used for calibration.

2.6 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Hemicelluloses dry extracts were analyzed using an FTIR spectrophotometer (Thermo Scientific iD3ZnSe ATR-Nicolet iS 5 FTIR spectrometer unit). The scan range was 650- 4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1}. The spectra were processed using ThermoScientific OMNIC software.

2.7 Near infrared spectrometry (NIRS)

An acquisition of near infrared spectra (NIRS) was carried out on the radial plane of wood blocks was carried out on the particles of okoumé wood. The calculation of the second derivative was performed on a wavelength between 6500 and 4500 cm^{-1}. Then, a principal component analysis (PCA) was performed to discriminate the samples according to their chemical compositions.

2.8 NMR analyses

^{1}H nuclear magnetic resonance (^{1}H NMR) and heteronuclear single quantum coherence (2D-HSQC) spectra were determined on a Bruker 400 MHz spectrometer with a standard Bruker program. Hemicelluloses were dissolved in 99.7 % deuterium oxide (D_2O). The mixture was homogenized with an ultrasound for 30 min for better dissolution. The number of complex points collected was 1024 for the ^{1}H dimension with a relaxation of 1.5 and 256 time increments were recorded in the ^{13}C - dimension. HSQC spectra were taken at room temperature. Standard Bruker Topspin-NMR software was used to process the data. The calculations of DSAc Xylp and DSAc Manp are given in equations 2 and 3.

2.9 Microscopy

Thin sections were made in the transverse direction with a sliding microtome (SM200 R, Leica, Germany) for bright-field transmission observations. Sections were stained with 1 % astra solution and counterstained with 0,1 % safranin solution according to the protocol described by Srebotnik and Messner (1994). Acquisitions were performed using an Olympus CX31 microscope equipped with an Olympus Color view III CCD camera.

Fluorescence observations were performed on a Leica DM 2700M microscope equipped with a CCF DFC7000T camera and an XYZ scanning stage. Filter cubes L5 (EX = 480 / 40, LP505 dichroic, BP527 / 30), N2.1 (EX = 515-560, LP580 dichroic, LP590) were used for fluorescence visualization of cellulose + lignin (green channel) and lignin (red channel).

3 Results and discussion

Hemicelluloses have been extracted from okoumé sapwood by SE according to different pathways given in Figure. 1A bleaching step performed before or after SE was performed with an oxidative agent (chlorite), SE and B / SE hemicelluloses were recovered in the liquid effluent of the SE process, performed at 170 °C during 10 min and BAlc and SE / BAlc by an alkali extraction from the beached pulp. B / SE and SE / B / Alc are the result of combined processes according to Figure 1. All the hemicelluloses were isolated by ethanolic precipitation and dialysis.

3.1 Microscopy

Morphological analysis of the cell wall of untreated okoumé sapwood, Pulp NaOH and Pulp H_2O (see Figure 58) was investigated by astra blue-Safranine double staining of the cell wall. Representative pictures are shown on Figure 58. A pink staining of the wood tissues indicated a low accessibility of the astra blue dye to the cellulose due to the lignin occurrence in the cell wall. A cell shape alteration with a reduction in sphericity was observed after SE as previously described by (Besserer et al., 2022) in okoumé wood. Moreover, cell wall of the pretreated sample differed strongly in their staining. The blue color of NaOH - SE reveals a delignification of the S3 and S2 layers with a pink/red staining only occurring in the cell corner and in the S1 / middle lamella layers.

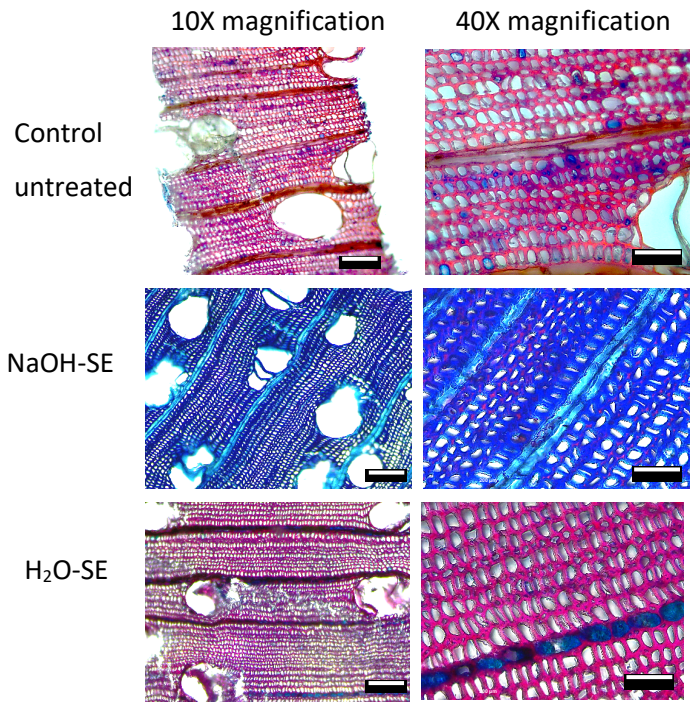


Figure 58. Effect of the steam explosion pretreatment on wood cell wall observed by optical microscopy after dyeing

To investigate further the steam explosion effects on pulps, fluorescence microscopy was used to analyze the relative distribution of sugars and lignin within the cell wall (Figure 59) of untreated okoumé sapwood and NaOH-SE. Safranin is a metachromatic dye which bind to holocellulose and emits red fluorescence when cell wall is lignified and green signal in low lignin containing cell wall (Bond et al., 2008a). In agreement with the literature (Bond et al., 2008b; Lancha et al., 2021), Figure 59 A shows that the cell wall layers S1 - S3 of untreated wood are composed of a mixture of sugars and lignin, which appears in a yellow stain, the middle lamella being rich in lignin (Figure 60 B). In contrast, in NaOH-SE large changes are observed in the distribution of sugars and lignin within the cell wall. Indeed, C - D shows a high holocellulose content in the S1 - S3 sublayers of the cell wall. Comparison of the line profiles (Figure 59 B and Figure 59 D) suggests a migration of lignin at the lumen surface of the fibers. This is also well described in the literature (Besserer et al., 2022). These observations are due to lignin dissolution in basic conditions and are in accordance with the observation by optical microscopy after dyeing (Figure 58).

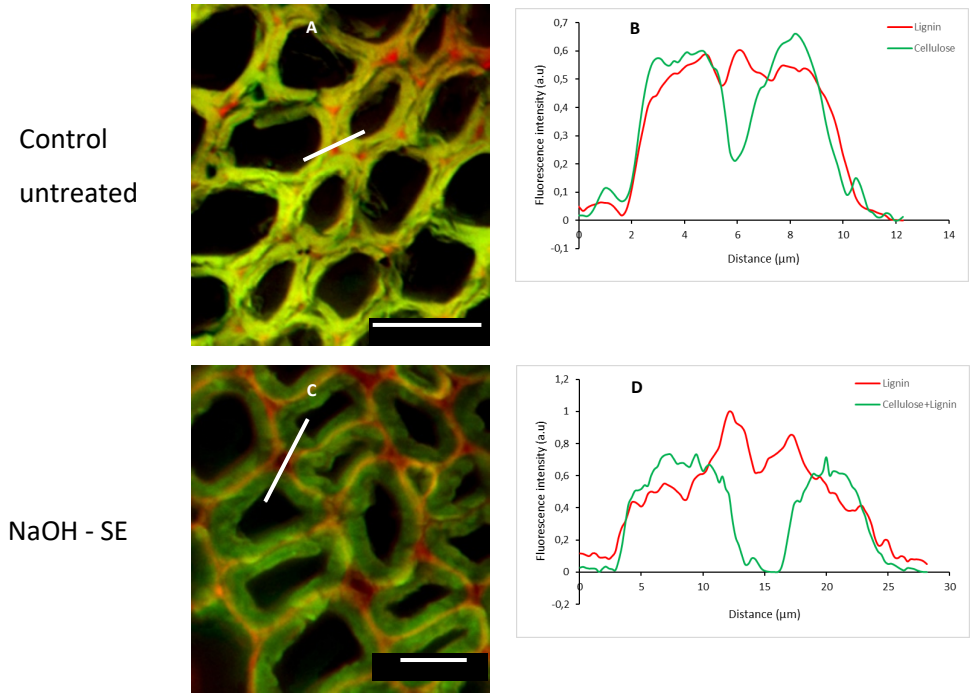


Figure 59. Cell morphology and cellulose/lignin distribution of raw and treated materials

3.2 Characterization

Hemicelluloses fractions extracted according to the different pathways given in Figure 57 have been quantified are characterized in terms of mass distribution (Table 20) and sugars and acetic acid (Table 21). B / Alc was isolated in high yield (18.7 %) with a relatively high molecular weight. As expected for hardwood, xylose was the predominant sugars accounting for 80 % w / w of the hemicellulose. The yield of hemicelluloses recovered from the liquid effluent of steam explosion (H_2O - SE) was lower, exhibited lower molecular weight because of the acid-catalyzed hydrolysis of glyosidic linkages during the steaming step of steam explosion (Table 20 and Table 21).

Table 20. Molecular weight distribution of recovered hemicelluloses

Treatments	Yield (%)	Mn (kDa)	Mw (kDa)	Mw / Mn
H_2O-SE	2.2	6.6	9.1	1.2
NaOH-SE	4.4	83.1	97.7	1.4
B/SE	10.2 ± 1.4	21.4	22.8	1.1
SE/B/Alc	11.3 ± 0.6	22.8	31.5	1.4
B/Alc	18.7± 0 .6	49.6	63.7	1.3

As shown in Table 21, relatively high amounts of mannose and glucose (11.3 % and 9.3 % respectively) were detected in H_2O - SE and assigned to glucomannans (GM). This observation is in line with our previous study using a mild DMSO extraction. GM usually account for 3-4 % w / w in hardwood but it has been shown by that okoumé sapwood contained relatively higher amounts of GM (≈ 6-7 %) with a ratio Glc / Man ≈ 1 / 1.

The xylose / arabinose (Xyl / Ara) ratio is a direct measure for the degree of substitution and an important indicator for structural feature of arabinoxylans (AX) molecules. The Xyl/Ara ratios given in Table 2 are in the following order: B / Alc < NaOH-SE < SE / B / Alc < H_2O-SE ≈ B / SE. The relatively high value observed for H_2O - SE and B / SE suggested a very low degree of branching which can be justified by an extensive hydrolysis of the arabinan chains during the steam explosion treatment. A comparison of the composition of B / Alc and SE / B /Alc can also provide insights into the effect of steam explosion pretreatment on the parietal hemicelluloses. Indeed, it was observed that SE / B / Alc had a lower Mw and a higher Xyl / Ara ratio than B / Alc (31.5 kDa and 40 versus 37.2 kDa and 18 kDa respectively) suggesting a depolymerization of arabinan hemicellulose chains, in the wood cell wall during the steam explosion.

Table 21. Composition of sugars and acetic acid (% of dry mass of hemicelluloses molar mass of hemicelluloses) of hemicelluloses

Treatments	Xyl	Man	Glc	Ara	Gal	Rha	GalA	Xyl / Ara	Ac. ac
H_20 - SE	47.7	11.3	9.3	0.5	5.4	4.6	5.4	95	8.4
NaOH - SE	30.7 ± 1.1	-	0.8 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0	38	
B / SE	45.5 ± 9.1	7.2 ± 2.4	18.2 ± 2.7	0.5 ± 0.1	4.5 ± 0.6	1.2 ± 0.1	5.7 ± 0.9	91	5.8
SE / B / Alc	60.1 ± 5.0	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.9 ± 0.1	40	
B / Alc	80.7 ± 0.3	-	3.1 ± 0.1	4.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	5.5 ± 0.1	18.3	

The acetylation degrees determined by HPLC after saponification of the hemicellulosic fractions are given in Table 21. As expected, NaOH - SE, B/Alc and SE / B / Alc were totally desacetylated because of the alkali conditions used for the hemicelluloses extraction. On the other hand, H_2O / SE and B / SE were acetylated (8.4 and 5.8 % respectively). The relatively high acetylation degree of okoumé sapwood xylans was previously discussed (Mougnala Moukagni et al., 2021).

A comparison of H_2O - SE and B / SE showed that the bleaching step prior to steam explosion greatly increased the hemicelluloses extractability. We observed an increase in yield of 5 to 10 % respectively. The molecular masses of B / SE were also significantly higher than that of H_2O - SE

(23 kDa and 9 kDa respectively) with a lower acetylation degree (5.8 wt % for B / SE compared to 8.4 wt % for H_2O-SE). These observations can be justified by the cleavage the lignocellulosic complex during bleaching previously observed by microscopy (Figure 58 and Figure 59) facilitating the extraction of high molecular weight hemicelluloses. This confirmed that the stability of the linkages between lignin and hemicelluloses may play a central role in hemicellulose recalcitrance during hydrothermal extraction. For B / SE a relatively higher amounts of Glc was recovered (≈ 18 %). In order to rationalize this observation, an SEM study was performed and showed the presence of wood microparticles in the B / SE hemicelluloses sample. Micrographs are given in Supplementary material section S1. These particles were not removed by the filtration technique used (Whatman paper) and were recovered after dialysis and lyophilization. This observation can be rationalized by the tearing and the ablation of wood small fragments by steam explosion, the delignified wood being more friable and fragile. We can deduct from these observations that B / SE promoted the extraction of relatively high molecular weight xylans, with a low degree of arabinan branching, low acetylation degree and associated to microsized wood fragments.

3.3 Spectroscopic characterization

The effects of the steam explosion on wood pulps (Pulp NaOH and Pulp H_2O) and hemicelluloses extracts (NaOH-SE, SE / B / Alc and B / SE) were evaluated by near-infrared spectroscopy (NIRS) and compared to okoumé wood. Result of the principal component analysis on second derivative of the spectra is plotted on Figure 60. Principal component analysis of NIR spectra of the different hemicelluloses and pulp fraction isolated during the process. The clusters are identified by different letters and shown a clear difference between wood and pulps (cluster A and B) and hemicellulose extracts (clusters C-E). After loadings analysis and by comparison with the data previously published (Nisgoski et al., 2018; Sandak et al., 2010; Schwanninger et al., 2011) band influencing the clustering along PC1 and PC2 could be identified. On PC 1 axis, the clustering is mainly influenced by interaction of water with lignocellulosic matrix (4950 cm^{-1}, 5220 cm^{-1}), the 5944 cm^{-1} (CH_3 groups on hemicelluloses) and hemicelluloses characteristics bands (5236 cm^{-1}, 5804 cm^{-1}, 4598 cm^{-1}). Bands influencing the PC2 axis were assigned to O-H and C-H stretches in semi-crystalline or crystalline regions in cellulose (4802 cm^{-1}, 6300 cm^{-1}) and signals found in lignin Car–H str. and C=C str., 4700 cm^{-1}, first overtone strech C–H, 5890 cm^{-1}, first overtone C aromatic–H str 5938 cm^{-1} and C–H stretch and C=O stretch, 4546 cm^{-1}.

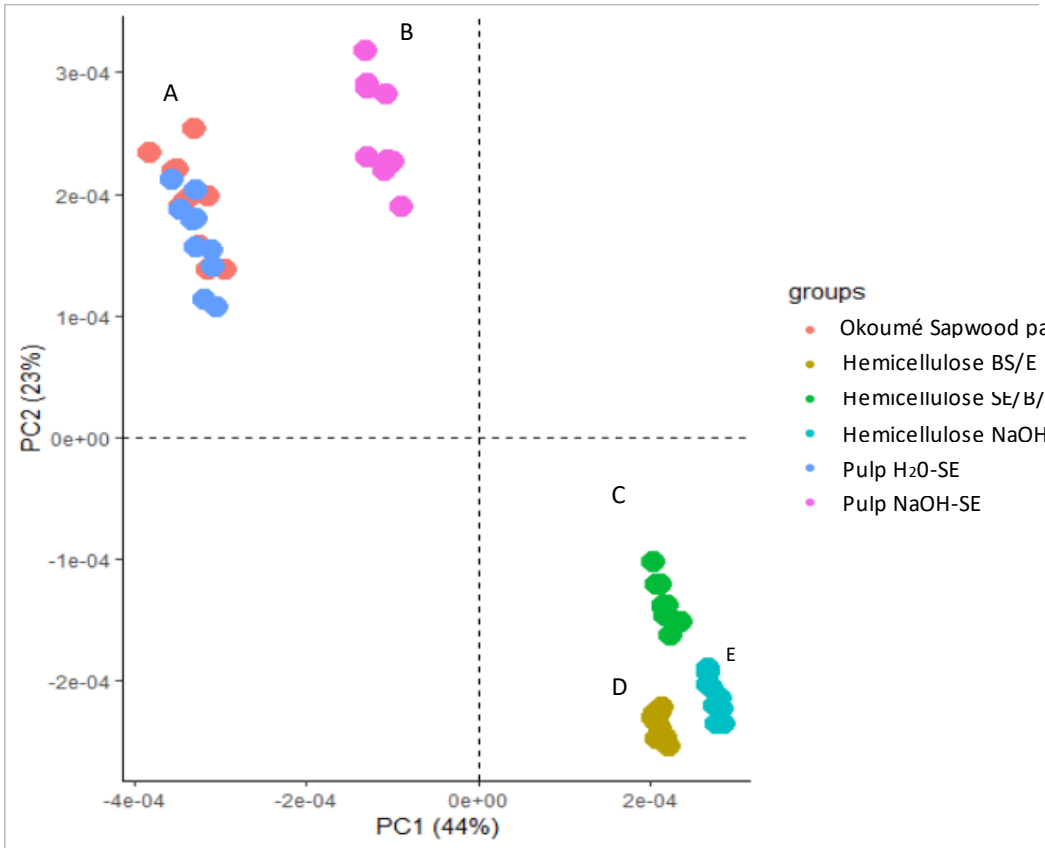


Figure 60. Principal component analysis of NIR spectra of the different hemicelluloses and pulp fraction isolated during the process. The clusters are identified by different letters

As expected and in accordance with the microscopic study (see Figure 58), these results showed only weak effects of H_2O - SE conditions on chemical composition of wood cell wall (Figure 60, cluster A). Regarding NaOH - SE pulp, a shift in PC1 is justified by a significant reduction in the lignin content of the wood particles. The carbohydrates composition as well as water interaction were not strongly affected. Mean spectra on the different sample cluster were plot on Figure 61. For clarity reason, only hemicelluloses fractions are represented with native wood as reference. The most contributive bands identified by PCA analysis are indicated. Detail are in supplemental data S2. The hemicellulose fractions were characterized by a strong lignin removal of crystalline cellulose. The B / SE fraction seems to be more acetylated with more fragmented hemicelluloses and interact less with water than the SE / B. Because SE / B has stronger interaction with water, similar hemicellulose abundance and opposite vibration signal at 5944 cm^{-1}, it can be inferred that this sample is less acetylated than SE - NaOH and B / SE.

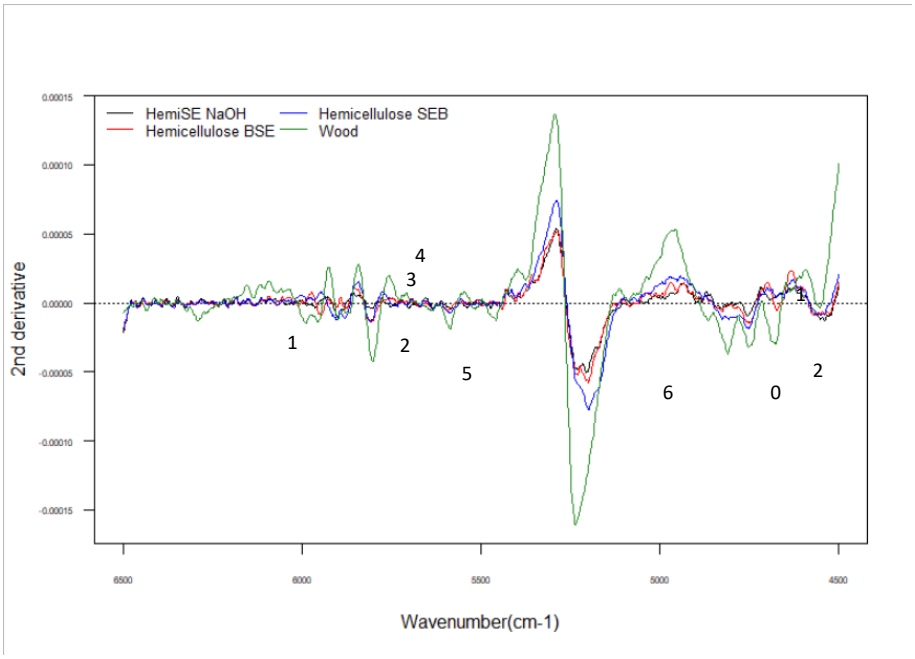


Figure 61. Mean spectra of the different samples investigated. Informative bands resulting from PCA loadings analysis are indicated on spectra. See text for details

The hemicelluloses fractions B / SE and SE / B were analyzed by FTIR. The FTIR spectra presented in Figure 62, show typical profiles of hemicelluloses observed by several authors in other lignocellulosic materials such as Eucalyptus and Epicea (Chadni et al., 2019d; Morais de Carvalho et al., 2017a). The high acetylation degree of B / SE observed by HPLC analysis (Table 21) was confirmed by a strong band at 1735 cm^{-1} characteristic of carbonyl (C=O) stretching of ester function. The presence of acetate group could also be confirmed by the presence of a strong band at 1240 cm^{-1} attributed to the C-0 δ (C-O) deformation bonds of the ester functions of xylans (Rowley et al., 2013). Regardless of extraction mode, all hemicellulose chains contained the band at 1614 cm^{-1} attributed to adsorbed water and / or ν(COO -) uronic acids in the hemicellulose chains (Gil-Ramirez et al., 2018a). This band was the most intense for B / SE. The band at 1508 cm^{-1} was absent in all extracts confirming the relatively low residual lignin concentration in the hemicellulose fractions. The high xylan content in SE / B / Alc shown in Table 2 was confirmed by intense bands at 895 cm^{-1} and 1040 cm^{-1}, assigned to C1-H bonds of the β -(1→4)-D-xylopyranose and C-O bonds of xylans respectively (Sun et al., 2014) (Marques et al., 2010).

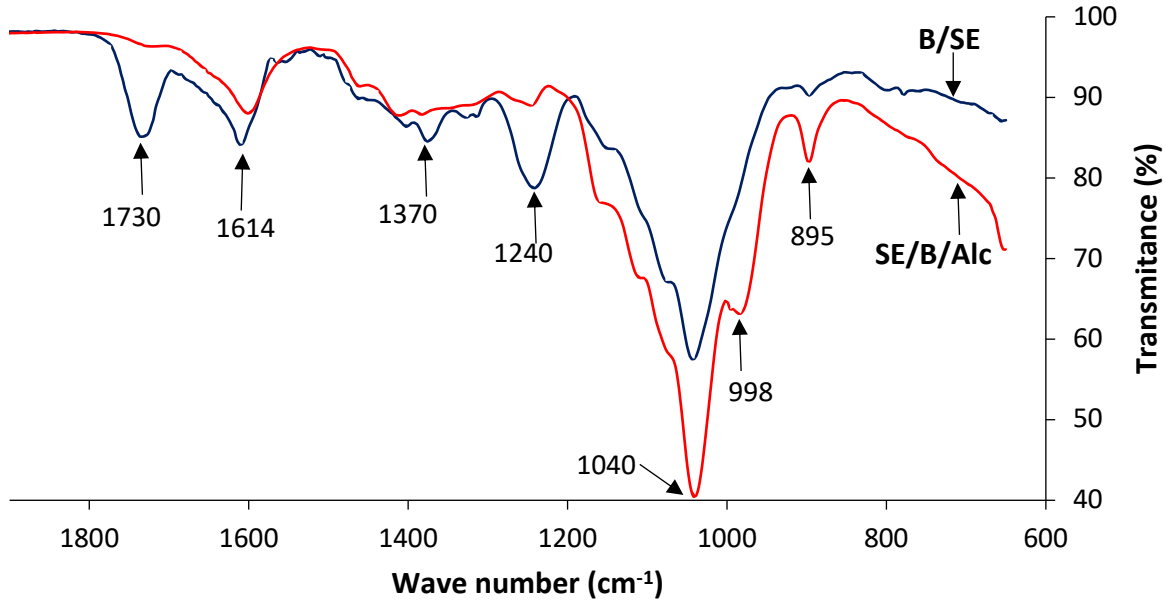


Figure 62. FT-IR spectra of B / SE and SE / B / Alc hemicelluloses

B / SE fraction was characterized by ^{1}H and HSQC NMR (Figure 63 and Figure 64). The ^{1}H NMR signals were assigned based on literature data (Morais de Carvalho et al., 2017a; Sun et al., 2012; Teleman et al., 2003a) and were reported in Table 3. The internal (1→4)-linked -ß-D-xylopyranosyl units of the glucurunoxylan backbone were clearly identified. The acetylation of B / SE was clearly observed by the signals at δH 2.0-2.4 ppm (CH_3-CO-), δH 4.55 ppm (H3 in *O*-3 acetylated Xyl_p units), δH 4.57 ppm (H2 in *O*-2 acetylated Xyl*p* units), at δH 5.12 ppm and δH 4.07 ppm (2,3- di-*O*-acetylated H-3 and H-4 respectively). In addition, the presence of 4-*O*-methylglucuronic acid was characterized by δH 5.3 ppm, 4.3 ppm and 3.5 ppm signals corresponding to the H-1, H-5, and methoxy protons, respectively, as well as a signal at 4.6 ppm assigned to the anomeric proton of MeGlcA substituted D-Xyl units. The δH peak 5.02 ppm is attributed to the H-3 of the 3-*O*-acetylated units substituted at *O*-2 by MeGlcA residues of the Xyl*p* chain.

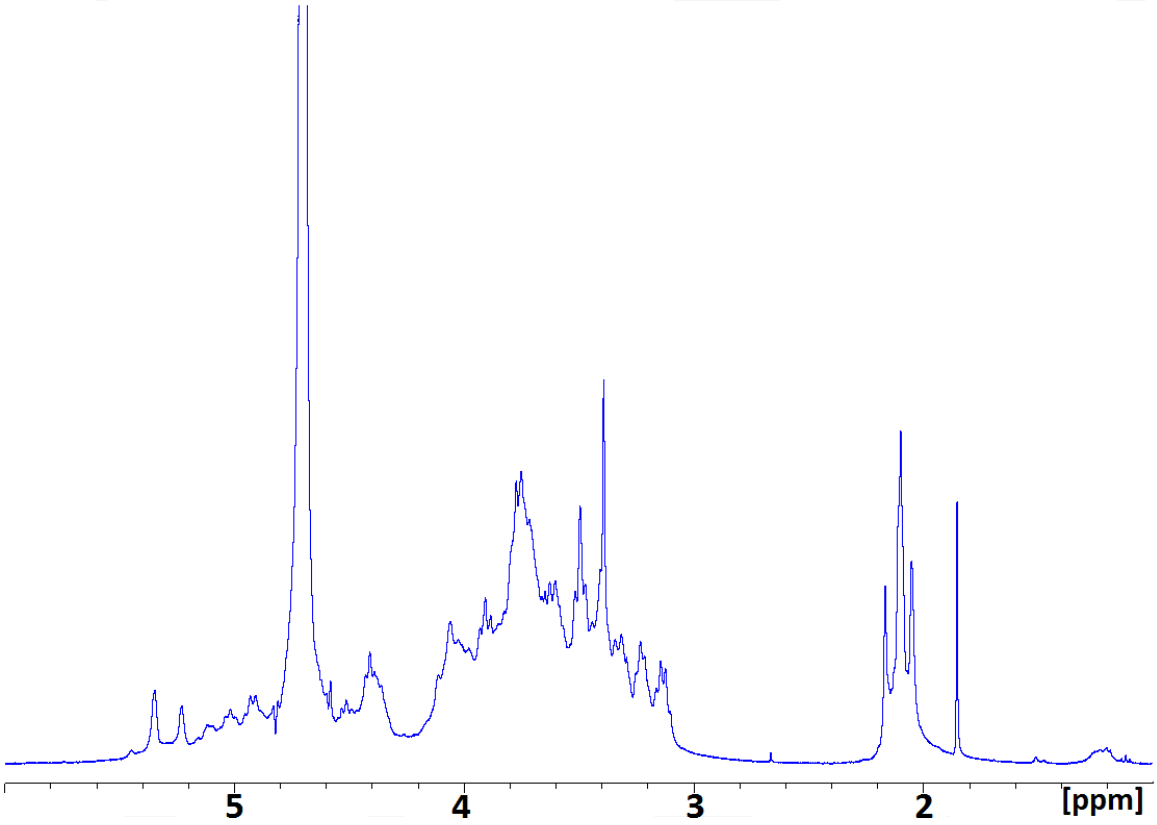


Figure 63. ^{1}H NMR spectra of B / SE hemicellulose

The distribution pattern of B / SE hemicelluloses were evaluated using HSQC NMR spectroscopy (Figure 8). The main signals were assigned based on the literature data (Campestrini et al., 2013b; Giummarella and Lawoko, 2017d; Sun et al., 2014; Yue et al., 2018b). The ^{13}C / ^{1}H chemical shifts of 102.21 / 4.40, 73.36 / 3.18, 74.00 / 3.4, 75.00 / 3.62, 63.05 / 4.00 (H-5eq), and 63.05 / 3.32 (H-5ax) ppm correspond to C-1 / H-1, C-2 / H-2, C-3 / H-3, C-4 / H-4, and C-5 / H-5 of the (1→4)-*β*-D-xylan skeleton, respectively. The C2 / H2 cross-peak assigned to the mannose unit is detected at 3.91/68.56 ppm. The cross-peaks at 97.90 / 5.23, 82.42 / 3.13, 70.00 / 4.06, 60.54 / 3.75, and 60.00 / 3.40 ppm are attributed to the C-1 / H-1, C-4 / H-4, C-5 / H-5, and -OCH_3 units of 4-*O*-methylglucuronic acid in the *O*-2 position, respectively. The presence of the acetylated *O*-2, *O*-3, and *O*-2,3 units detected at in the xylan backbone is confirmed by correlation at 73.28 / 4.62 ppm (C2 / H2), 75.17 / 4.92 (C3 / H3), and 71.32 / 4.75 ppm. The signal attributed to the acetylated *O*-3 unit corresponding to the correlation at 4.87 / 99.0 ppm (H1 / C1) was detected. A comparison of this spectrum with that of H_2O-SE showed that these two fractions exhibit great similarities in NMR. This result is in agreement with the composition of simple sugars and acetate given in Table 2.

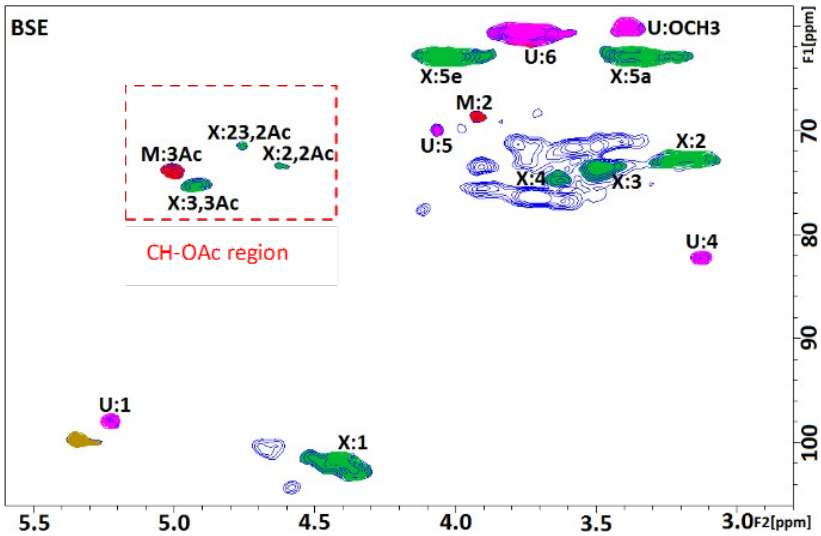


Figure 64. 2D HSQC NMR spectral analysis of B/SE hemicelluloses

* X: (1→4)-*β*-D-Xylopyranosyl ; U: 4-O-methyl- *β*-D-glucuronic acid ; M: (1→4)-*β*-D-Mannosyl; G: (1→4)-*β*-D- Glucosyl ; Ac: acetyl.

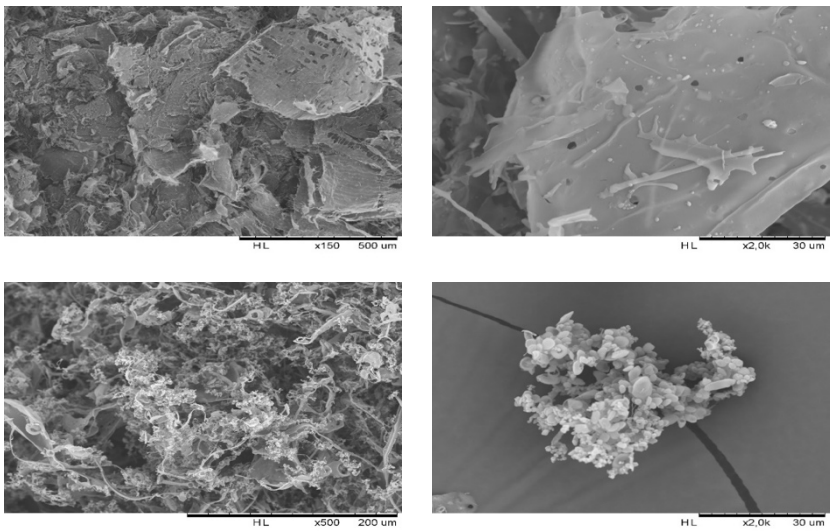
4 Conclusion

Different cumulative pretreatments involving bleaching and / or steam explosion and / or alkaline extraction processes have been considered for the extraction of polymeric hemicelluloses from okoumé wood. It has been shown that steam explosion affects the molecular weight and degree of branching of the hemicelluloses while basic treatments result in the removal of acetate units. In particular, it has been shown that the extraction of highly acetylated xylans is possible with good yields by steam explosion of delignified wood. This work provides information on recalcitrance factors limiting hemicellulose extractability and the effect of pretreatments on the disruption of the LC complex structure.

Résultats complémentaires

S 1. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage a été utilisée pour analyser B / SE en comparaison avec SE / B / Alc. La morphologie des échantillons est très différente. SE / B / Alc a une structure globulaire et aucune particule de bois ne peut être distinguée. En revanche, dans B / SE, il a été possible de visualiser l'ultrastructure cellulaire du bois en plus des hémicelluloses. Les cellules étaient fragmentées mais la paroi cellulaire était encore structurée (Figure 65). Ces particules de bois ont été arrachées du bois blanchi lors de l'explosion à la vapeur. Elles n'ont pas été éliminées par filtration sur papier et ont été récupérées après dialyse et lyophilisation en mélange avec les hémicelluloses.



Hemicelluloses
BSE (cluster D)

Hemicelluloses
SE / B / Alc (cluster C)

Figure 65. SEM des fractions d'hémicelluloses B / SE et SE / B

S 2. Analyse des charges de l'ACP

Le Tableau 22 présente, en complément des données des spectres de la Figure 61, les bandes ayant plus d'influence sur la discrimination des échantillons. Les nombres d'ondes informatifs sont corrélés à la présence des hémicelluloses, de celluloses de lignine et de l'eau contenus dans les échantillons.

Tableau 22. Tableau des bandes les plus contributives après l'analyse des charges de l'ACP

Band number on spectra	**Comtributive componment on PCA**	**Band location wavenumber (cm^{-1})**	**Wood Component**	**Bond vibration**
1	PC2	6300	Crystalline cellulose II (CII)	1st OT O–H str.
2	PC2	5976	Lignin	1st OT Car–H str
3	PC1	5944	CH_3 groups on hemicelluloses	1st OT C–H str
4	PC2	5928	Lignin	1st OT Car–H str.
5	PC1	5804	Hemicellulose	1st OT C–H str
6	PC1	5236	Hemicellulose	2nd OT C=O str.
7	PC1	5220	water	O–H asym. str. + O–H def. of H2O
8	PC1	4950	water	free water with two OH engaged in hydrogen bonding (S2)
9	PC2	4802	Semi-crystalline or crystalline regions in cellulose	O–H str. + C–H def
10	PC2	4686	Lignin	Car–H str. + C=C str.
11	PC1	4598	Hemicellulose	Not assigned
12	PC2	4546	Lignin	C–H str. + C=O str

Conclusion du chapitre 5

Dans cette partie du travail, les hémicelluloses polymériques ont été extraites par deux méthodes :

- en milieu alcalin, à partir de bois délignifié ou par explosion à la vapeur après une imprégnation à l'eau ou une imprégnation basique,
- par un traitement combiné basé sur le blanchiment suivi de l'explosion à la vapeur ou sur une explosion à la vapeur suivi d'une extraction alcaline.

Les analyses morphologiques par microscopie optique et fluorescence du bois non traité et du bois explosé à la vapeur ont indiquées que la dissolution des hémicelluloses et de la lignine sont différentes selon le pH d'imprégnation. Elles montrent que la lignine est dissoute de façon inhomogène dans la paroi cellulaire. Une grande quantité de lignine est principalement extraite des régions secondaires de la paroi cellulaire dans les conditions basiques. En outre, il a été observé qu'après une délignification du bois, l'explosion à la vapeur produit des rendements similaires en hémicelluloses par rapport à l'extraction alcaline. L'étape de la délignification avant l'explosion à la vapeur a favorisé l'extraction des hémicelluloses plus ramifiées, mais de Mw plus faible par rapport aux hémicelluloses extraites par voie conventionnelle par l'hydroxyde de sodium du bois non traité et du bois explosé à la vapeur. Enfin, il a été montré que l'explosion à la vapeur du bois délignifié produit des xylanes hautement acétylés avec des rendements élevés, et une importante quantité de glucomannanes acétylés.

Références bibliographiques

Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., Paës, G., 2017. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. Biotechnol. Biofuels 10, 36. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z

Besserer, A., Obame, S.N., Safou-Tchima, R., Saker, S., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2022. Biorefining of Aucoumea klaineana wood: Impact of steam explosion on the composition and ultrastructure the cell wall. Ind. Crops Prod. 177, 114432. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114432

Bond, J., Donaldson, L., Hill, S., Hitchcock, K., 2008a. Safranine fluorescent staining of wood cell walls. Biotech. Histochem. 83, 161–171. https://doi.org/10.1080/10520290802373354

Bond, J., Donaldson, L., Hill, S., Hitchcock, K., 2008b. Safranine fluorescent staining of wood cell walls. Biotech. Histochem. 83, 161–171. https://doi.org/10.1080/10520290802373354

Campestrini, L.H., Silveira, J.L.M., Duarte, M.E.R., Koop, H.S., Noseda, M.D., 2013. NMR and rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan. Carbohydr. Polym. 94, 511–519. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.020

Carvalho, A.F.A., Marcondes, W.F., de Oliva Neto, P., Pastore, G.M., Saddler, J.N., Arantes, V., 2018. The potential of tailoring the conditions of steam explosion to produce xylo-oligosaccharides from sugarcane bagasse. Bioresour. Technol. 250, 221–229. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.041

Chabbert, B., Terryn, C., Herbaut, M., Vaidya, A., Habrant, A., Paës, G., Donaldson, L., 2018. Fluorescence techniques can reveal cell wall organization and predict saccharification in pretreated wood biomass. Ind. Crops Prod. 123, 84–92. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.058

Chadni, M., Grimi, N., Bals, O., Ziegler-Devin, I., Brosse, N., 2019. Steam explosion process for the selective extraction of hemicelluloses polymers from spruce sawdust. Ind. Crops Prod. 141, 111757. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111757

Gil-Ramirez, A., Salas-Veizaga, D.M., Grey, C., Karlsson, E.N., Rodriguez-Meizoso, I., Linares-Pastén, J.A., 2018. Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (Chenopodium quinoa Willd.). Ind. Crops Prod. 121, 54–65. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.074

Giummarella, N., Lawoko, M., 2017a. Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood. ACS Sustain. Chem. Eng. 5, 5156–5165. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00511

Giummarella, N., Lawoko, M., 2017b. Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood. ACS Sustain. Chem. Eng. 5, 5156–5165. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00511

Lancha, J.P., Perré, P., Colin, J., Lv, P., Ruscassier, N., Almeida, G., 2021. Multiscale investigation on the chemical and anatomical changes of lignocellulosic biomass for different severities of hydrothermal treatment. Sci. Rep. 11, 8444. https://doi.org/10.1038/s41598-021-87928-y

Marques, G., Gutiérrez, A., del Río, J.C., Evtuguin, D.V., 2010. Acetylated heteroxylan from Agave sisalana and its behavior in alkaline pulping and TCF/ECF bleaching. Carbohydr. Polym. 81, 517–523. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.043

Morais de Carvalho, D., Martínez-Abad, A., Evtuguin, D.V., Colodette, J.L., Lindström, M.E., Vilaplana, F., Sevastyanova, O., 2017. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. Carbohydr. Polym. 156, 223–234. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.022

Mougnala Moukagni, E., Ziegler-Devin, I., Safou-Tchima, R., Brosse, N., 2021. Extraction of acetylated glucuronoxylans and glucomannans from Okoume (Aucoumea klaineana Pierre) sapwood and heartwood by steam explosion. Ind. Crops Prod. 166, 113466. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113466

Nisgoski, S., Batista, F.R.R., Naide, T.L., Laube, N.C.C., Leão, A.C.R., Muñiz, G.I.B. de, 2018. Discrimination of wood and charcoal from six Caatinga species by near-infrared spectroscopy. Maderas Cienc. Tecnol. 0–0. https://doi.org/10.4067/S0718-221X2018005002401

Persson, T., Jönsson, A.-S., 2010. Isolation of hemicelluloses by ultrafiltration of thermomechanical pulp mill process water—Influence of operating conditions. Chem. Eng. Res. Des. 88, 1548–1554. https://doi.org/10.1016/j.cherd.2010.04.002

Rowley, J., Decker, S.R., Michener, W., Black, S., 2013. Efficient extraction of xylan from delignified corn stover using dimethyl sulfoxide. 3 Biotech 3, 433–438. https://doi.org/10.1007/s13205-013-0159-8

Safou-Tchiama, R., de Jéso, B., Akagah, A.G., Sèbe, G., Pétraud, M., 2007. A preliminary survey of the interfacial bonding of some tropical hardwoods towards succinic anhydride and 2-octen-1-yl succinic anhydride molecules: Impact of lignin and carbohydrate polymers structure on the chemical reactivity. Ind. Crops Prod. 26, 173–184. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.03.001

Sandak, A., Sandak, J., Zborowska, M., Prądzyński, W., 2010. Near infrared spectroscopy as a tool for archaeological wood characterization. J. Archaeol. Sci. 37, 2093–2101. https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.02.005

Santo, M.C.E., Fockink, D.H., Pellegrini, V.O.A., Guimaraes, F.E.G., deAzevedo, E.R., Ramos, L.P., Polikarpov, I., 2020. Physical techniques shed light on the differences in sugarcane bagasse structure subjected to steam explosion pretreatments at equivalent combined severity factors.

Schwanninger, M., Rodrigues, J., Fackler, K., 2011. A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components. J. Infrared Spectrosc. 19, 287. https://doi.org/10.1255/jnirs.955

Simangunsong, E., Ziegler-Devin, I., Chrusciel, L., Girods, P., Wistara, N.J., Brosse, N., 2020. Steam Explosion of Beech Wood: Effect of the Particle Size on the Xylans Recovery. Waste Biomass Valorization 11, 625–633. https://doi.org/10.1007/s12649-018-0522-4

Srebotnik, E., Messner, K., 1994. A Simple Method That Uses Differential Staining and Light Microscopy To Assess the Selectivity of Wood Delignification by White Rot Fungi. Appl. Environ. Microbiol. 60, 1383–1386.

Sun, S.-N., Cao, X.-F., Xu, F., Sun, R.-C., Jones, G.L., Baird, M., 2014. Structure and thermal property of alkaline hemicelluloses from steam exploded Phyllostachys pubescens. Carbohydr. Polym. 101, 1191–1197. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.109

Sun, S.N., Yuan, T.-Q., Li, M.F., Cao, X.F., Xu, F., Liu, Q.Y., 2012. Structural characterization of hemicelluloses from bamboo culms (neosinocalamusaffinis). Cellul. Chem. Technol. 46, 165–

Teleman, A., Nordström, M., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O., 2003. Isolation and characterization of O-acetylated glucomannans from aspen and birch wood. Carbohydr. Res. 338, 525–534. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00491-3

Wang, C., Yang, J., Wen, J., Bian, J., Li, M., Peng, F., Sun, R., 2019. Structure and distribution changes of Eucalyptus hemicelluloses during hydrothermal and alkaline pretreatments. Int. J. Biol. Macromol. 133, 514–521. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.127

Yue, P.-P., Fu, G.-Q., Hu, Y.-J., Bian, J., Li, M.-F., Shi, Z.-J., Peng, F., 2018. Changes of Chemical Composition and Hemicelluloses Structure in Differently Aged Bamboo (*Neosinocalamus affinis*) Culms. J. Agric. Food Chem. 66, 9199–9208. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03516

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette étude a porté sur la valorisation des coproduits de la transformation industrielle du bois au Gabon. Elle s'est particulièrement focalisée sur l'extraction et l'analyse structurale des hémicelluloses du bois. Dans ce travail, l'okoumé a été choisi parmi les nombreuse essences que compte l'écosystème forestier gabonais, en raison de la place privilégiée qu'il occupe dans le secteur forêt-bois du Gabon. Il a été question d'analyser les relations entre les différentes conditions d'extraction et les propriétés physico-chimiques des hémicelluloses, tout en restant compatible avec la notion de bioraffinerie industrielle.

Après une synthèse bibliographique sur la structure anatomique de la paroi cellulaire végétale, et sur les procédés d'extraction, de séparation et d'analyses des hémicelluloses, le protocole expérimental mis en œuvre dans le cadre de cette étude a été décrit. Ensuite, le travail mené a été présenté en trois parties.

La première partie des expériences conduites a été rapportée au chapitre 3. Elle consistait à extraire des hémicelluloses polymériques d'aubier et de bois de cœur d'okoumé, en utilisant le procédé d'explosion à la vapeur. Pour atteindre cet objectif, les hémicelluloses ont d'abord été extraites par voies conventionnelles à l'aide d'hydroxyde de sodium ou de DMSO, à partir des sciures libres d'extractibles et délignifiées avec du chlorite de sodium et à l'acide acétique. Ces hémicelluloses ont servi de lots référents. En outre une explosion à la vapeur appliquée aux sciures du bois après une imprégnation (à l'eau ou à l'hydroxyde de sodium) à différentes température et temps de séjour a été évaluée pour l'extraction des hémicelluloses polymériques. Toutes les hémicelluloses ont été récupérées par précipitation à l'éthanol. Les résultats ont montré que l'étape d'imprégnation avant l'explosion à la vapeur influence fortement les propriétés physico-chimiques des hémicelluloses extraites. Toutes les hémicelluloses dont l'extraction impliquait ds milieux alcalins étaient de type glucuronoxylanes. Cependant, après une imprégnation basique, l'explosion à la vapeur a permis l'extraction des hémicelluloses de plus grand poids moléculaire (GX, Mw = 65-100 kDa). Alors que les extractions par le DMSO et par l'explosion à la vapeur après une imprégnation à l'eau, ont fourni un mélange le glucuronoxylanes et de glucomannanes. Quel que soit le procédé utilisé, il apparaît que les hémicelluloses extraites à partir de l'aubier avaient un poids moléculaire moyen plus élevé que celles extraites à partir du bois de cœur. Cette étude a clairement montré qu'une extraction douce par explosion à la vapeur après une imprégnation à l'eau conserve

fortement les groupes acétyles *O*2 et / ou *O*3 des hémicelluloses par rapport à l'extraction douce au DMSO (% Ac ≈ 6,6-8,4 % et 1,0-4,1 % p / p respectivement). De plus, les hémicelluloses d'aubier présentaient un degré d'acétylation plus élevé que celles du bois de cœur. En bref, les résultats obtenus dans cette partie montrent dans un premier temps que l'explosion à la vapeur, en conditions douces, peut être utilisée pour extraire des hémicelluloses présentant une structure proche de la structure native, car ces dernières conservent cours de son procédé d'extraction la majeure partie de leurs caractéristiques structurales. Dans un second temps, cette partie a montré que les hémicelluloses du bois d'okoumé sont essentiellement constituées de glucuronoxylanes hautement acétylés et d'une proportion relativement élevée de glucomannnanes acétylés dans l'aubier.

Dans un second temps, le travail s'est orienté vers la séparation, la purification et le fractionnement de l'effluent aqueux après explosion à la vapeur d'aubier d'okoumé. Cette partie a commencé par une étude préliminaire des performances de trois membranes d'ultrafiltration (seuil de coupure 10 kDa, 100 kDa et 500 kDa). Cette étape a permis de sélectionner la membrane de 10 kDa pour l'étape suivante de diafiltration. La diafiltration de type dilution séquentielle a été réalisée jusqu'à 6 volumes de diafiltration (DV). Il a été clairement montré que la diafiltration avec la membrane de 10 kDa favorise un fractionnement efficace sans encrassement. Le retentat était composé d'hémicelluloses dont les poids moléculaires sont significativement plus élevés par rapport à ceux des hémicelluloses récupérées par précipitation à l'éthanol. Ces hémicelluloses étaient composées de glucuronoxylannes hautement acétylés en *O*2 et *O*3 et d'une quantité relativement faible de glucomannanes également acétylés. Quant au perméat, il était formé de glucuronoxylannes acétylés et d'une petite proportion de pectines. Il contient également de la lignine soluble. Parmi les deux méthodes de séparation utilisées, la séparation membranaire est celle qui a permis d'isoler les hémicelluloses avec le degré d'acétylation le plus élevé.

Enfin, un procédé synergique basé sur les traitements hydrothermique et chimique a été pensé pour surmonter davantage la récalcitrance du bois. À cet effet, un premier traitement par explosion à la vapeur suivi d'une extraction alcaline été appliqué pour extraire les hémicelluloses SE / B / Alc. Un deuxième traitement impliquant une délignification suivie d'une explosion à la vapeur a été réalisé pour extraire les hémicelluloses B/SE. Les résultats ont montré que les deux méthodes produisent des rendements similaires en hémicelluloses, lesquels étaient nettement plus élevés que ceux obtenus à partir du bois explosé à la vapeur, après une imprégnation à l'eau ou à l'hydroxyde de sodium. Après une explosion à la vapeur, l'extraction alcaline a produit des hémicelluloses de poids moléculaire plus faible, par rapport à l'extraction classique à l'hydroxyde de sodium et à l'extraction par explosion à

la vapeur après une imprégnation basique. En revanche, une explosion à la vapeur après un blanchiment du bois a produit des hémicelluloses de poids moléculaire plus élevé par rapport aux hémicelluloses extraites directement par explosion à la vapeur après une imprégnation à l'eau. En outre, l'extraction par explosion à la vapeur après une délignification a permis de solubiliser les glucurunoxylanes acétylés *O*2 et / ou *O*3 et de glucomannanes acétylés *O*3. Par ailleurs, l'analyse morphologique du bois a montré une forte altération de la paroi cellulaire par le traitement d'explosion à la vapeur après une imprégnation basique.

Les résultats obtenus dans ce travail ouvrent les voies de valorisation des coproduits du secteur forêt-bois du Gabon par la formulation des biomatériaux à base d'hémicellules. En outre, des efforts doivent aussi être portés sur les potentiels prébiotiques et/ou cytotoxiques des hémicelluloses extraites.

Le travail présenté dans ce mémoire fait partie d'un projet global, qui vise une valorisation plus poussée des coproduits de la transformation industrielle du bois au Gabon. Dans une thèse soutenue par Sebastien Obame (2020), une étude préliminaire portant sur la production de bioéthanol à partir de la cellulose d'okoumé avec l'explosion à la vapeur comme prétraitement a été initiée. Dans l'approche proposée, la lignine est extraite avant les étapes d'hydrolyse / fermentation. La lignine isolée a été étudiée et il apparaît qu'elle est de grande pureté et relativement peu dégradée (proche d'une lignine organosolv). De ce fait, les travaux décrits dans la présente thèse concernent la valorisation du troisième biopolymère (les hémicelluloses) isolé dès l'étape de prétraitement. La Figure 66 ci-dessous résume l'ensemble du procédé.

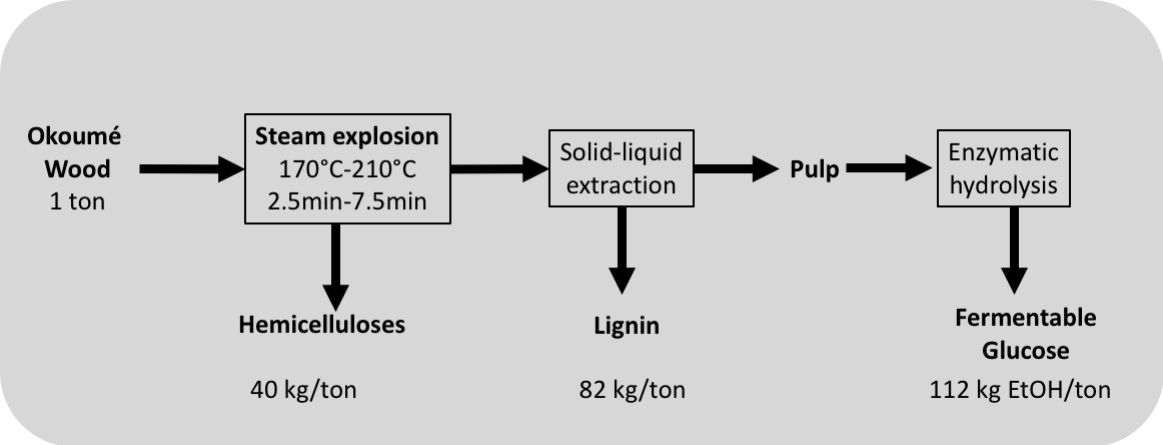


Figure 66. Procédé global de valorisation des coproduits d'okoumé

Nous espérons que ce programme de recherche permettra de mieux utiliser les coproduits abondants de l'industrie forestière du Gabon, par la production de molécules biosourcées, à partir d'une approche « bioraffinerie ».