

N° d'ordre :

THÈSE



Présentée à

L'Université Bordeaux 1

Ecole Doctorale des Sciences Chimiques

Par **Vincent NORDMANN**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : Chimie organique

Caractérisation et impact des différentes fractions d'une biomasse lignocellulosique pour améliorer les prétraitements favorisant sa méthanisation

Utilisation de la paille de blé comme biomasse lignocellulosique d'étude

Directeur de thèse : **Stéphane GRELIER**

Co-encadrante : **Frédérique HAM-PICHAVENT**

Soutenue le 16 décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

Mme CARRERE Hélène, Directrice de recherche, INRA Narbonne (LBE)

Rapporteur

M GERARDIN Philippe, Professeur, Université de Lorraine (LERMAB)

Rapporteur

M. CRAMAIL Henri, Professeur, Université Bordeaux 1 (LCPO)

Président

M. POUECH Philippe, Chef de projets senior méthanisation, APESA

Examineur

M. GRELIER Stéphane, Professeur, Université Bordeaux 1 (LCPO)

Directeur de thèse

Mme. HAM-PICHAVENT Frédérique, Docteur, Université Bordeaux 1 (LCPO)

Co-encadrante

REMERCIEMENT

Après une première année de recherche au sein de l'Unité des Sciences du Bois et des Biopolymères (USBB) j'ai intégré le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) pour y finir ma thèse (2 ans). Dans ces deux laboratoires j'ai rencontré des gens passionnés par leur travail qui m'ont accueilli chaleureusement. Je souhaite donc remercier les deux directeurs de ces laboratoires pour m'avoir fait confiance et permis de rejoindre leurs équipes : Stéphane GRELIER (directeur-adjoint) pour l'USBB et Henri CRAMAIL pour le LCPO. Je souhaite aussi remercier ce dernier pour avoir présidé le jury de ma thèse.

Ma thèse étant en collaboration CIFRE avec l'Association Pour l'Environnement et la Sécurité en Aquitaine (APESA), je tiens à remercier Bernard de GUILLEBON pour m'avoir accueilli dans son entreprise, ainsi que Jean-Louis CRABOS, responsable du plateau technique de l'APESA.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail de doctorat, pour leurs remarques constructives vis-à-vis du manuscrit et pour la discussion fructueuse qui a suivi ma soutenance : Hélène CARRERE, directrice de recherche INRA au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE) de Narbonne ; Philippe GERARDIN, directeur du Laboratoire d'Etude et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMAB).

J'adresse mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse, Stéphane GRELIER, Professeur au LCPO. Sa disponibilité et Sa confiance au cours de ses trois années de thèse ont été de véritables atouts. Je tiens à saluer sa patience et l'énergie qu'il m'a communiqué lors de la rédaction.

Qu'aurait été cette thèse sans ma co-encadrante, Frédérique HAM-PICHAVANT, Ingénieur de Recherche au LCPO. Non contente de m'initier à la chimie du bois et des biomasses lignocellulosiques elle a été un véritable soutien tant sur le plan scientifique qu'humain durant ces trois ans.

Je tiens enfin à remercier mon co-encadrant industriel, Philippe POUECH, chef de projet méthanisation à l'APESA, pour les conseils avisés qu'il a toujours su me donner sur la méthanisation. Merci également à Camille LAGNET, chargée de mission compostage-méthanisation à l'APESA qui, sans avoir la fonction d'encadrante, m'a encadré de fait pour les tests du potentiel méthane.

Mes remerciements s'adressent également au personnel du LCPO qui m'a permis de mener à bien cette thèse : Anne-Laure WIROTIUS pour les analyses RMN, Eric VIROL pour les analyses par chromatographie liquide, Gérard DIMIER pour les analyses par spectrométrie Infrarouge. Les tests du potentiel méthane n'auraient pas pu être effectués sans l'aide des techniciens du plateau technique de l'APESA, merci donc à Blandine SCHRAAUWERS, Christophe DESCAMPS, Erice ARRIBARROUY et Joël LAUR. Merci aussi à Jean-Michel LASNIER du CESAMO, pour l'analyse de la lignine en RMN du phosphore ; ainsi qu'à Eric LEBRAUD de l'ICMCB, pour les analyses par diffraction aux rayons X.

Je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes travaillant au LCPO, doctorants comme permanents. Grâce à vous et à votre bonne humeur, le travail au laboratoire fût un vrai plaisir. Un grand merci à mes collègues de bureau : Maud, Olivia, Patricia, Valentina, Alex. Nos discussions me manquent déjà...

Merci à tous mes amis de Bordeaux, de Strasbourg, de Paris et d'ailleurs pour tous les bons moments passés ensemble. Sans vouloir les citer tous, ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour deux amis de longue date, qui prétendent encore que « à Bordeaux il pleut tout le temps (et qu'il fait toujours nuit) ».

Merci bien sûr à toutes les personnes qui ont participé à ma construction, tant personnelle que professionnelle.

Merci enfin à mes parents et à ma famille qui m'a soutenu durant les 28 dernières années.

Résumé :

La méthanisation est un processus biologique de transformation des matières organiques libérant principalement du méthane et du dioxyde de carbone. Cette technologie connaît un essor important pour la production de biométhane, source d'énergie renouvelable. Elle présente cependant des rendements de dégradation faibles lorsque de la biomasse lignocellulosique est utilisée comme matière première.

Pour optimiser son rendement, la paille de blé a été sélectionnée comme biomasse représentative et l'impact sur la méthanisation de chacune des fractions (extractibles, hémicelluloses, cellulose et lignine) a été évalué. Une biomasse de synthèse a été construite à partir des constituants purs de la paille de blé afin d'évaluer l'impact des interactions lignine-holocellulose. Le potentiel de méthanisation de différentes molécules phénoliques, provenant de la dégradation de la lignine, a été déterminé. Elles inhibent la méthanisation à l'exception de trois d'entre elles qui présentent un rendement de méthanisation élevé : l'acide vanillique, l'acide férulique et le syringaldéhyde.

Différents prétraitements physiques (le chauffage par échangeur thermique ou par irradiation aux micro-ondes ainsi que la sonication et le raffinage papetier) et chimique (la soude, l'ammoniaque et l'ozone) ont ensuite été sélectionnés, et leurs impacts sur la composition de la paille et sa méthanisation ont été mesurés. Les meilleurs rendements de méthanisation ont été obtenus suite à l'exposition aux micro-ondes en présence de soude.

Mots clés :

- Méthanisation
- Méthane
- Lignocellulose
- Van Soest
- Klason
- Déconstruction
- Cellulose
- Lignine
- Molécules phénoliques
- Paille de blé
- Prétraitement
- Micro-onde
- Ultrasons
- Soude
- Ozone

Abstract:

Methanization or anaerobic digestion is a biological process to transform organic matter into a gas mixture composed by a majority of methane and carbon dioxide. This technology has a significant growth for the production of biomethane as renewable energy source. However this biotechnological route has low performances when lignocellulosic biomass is used as raw material.

Wheat straw has been chosen as typical biomass and the role of each lignocellulosic fraction (extractives, cellulose, hemicelluloses and lignin) has been determined on the performance of anaerobic digestion. A synthetic biomass has been built with different pure constituents of the wheat straw to assess the impact of holocellulose-lignin interactions on methanization. Then methane potential of various lignin degradation products (phenolic molecules) has been studied. Majority of them have been shown an inhibitory effect but three of them have been converted to methane, namely ferulic and vanillic acids and syringaldehyde.

Various physical pretreatments (heating, microwave irradiation, sonication and refining) and chemical pretreatments (sodium hydroxide, ammonia and ozone) have been selected to prepare the biomass to anaerobic digestion and their impacts on wheat straw composition have been evaluated. The best methanization yield has obtained after pretreatment by sodium hydroxide heating by microwave irradiation.

Key words:

- Methanization
- Methane
- Lignocellulosique
- Deconstruction
- Van Soest
- Klason
- Phenolic compounds
- Wheat straw Pretreatment
- Cellulose
- Lignin
- Microwave
- Ultrasounds
- Sodium hydroxide
- Ozone

Sommaire

Introduction générale	23
Synthèse bibliographique.....	29
A. Contexte énergétique.....	31
1. Les besoins énergétiques actuels.....	31
2. Les ressources actuellement utilisées.....	34
3. Les objectifs de consommation-production.....	35
4. Les énergies renouvelables	36
B. La méthanisation.....	38
1. Un processus naturel contrôlable	38
2. Le développement de la méthanisation en France.....	38
3. La place de la méthanisation dans la protection de l'environnement.....	39
4. Les réactions biochimiques de la méthanisation	41
5. L'écologie de la méthanisation	44
6. Le bilan de la méthanisation	49
7. La méthanisation des résidus de cultures.....	50
C. La paille de blé	53
1. La ressource en paille de blé	54
2. Organisation structurale de la biomasse lignocellulosique	56
3. Les polymères de la matrice lignocellulosique.....	57
D. Les prétraitements	67
1. Prétraitements thermiques.....	67
2. Les traitements chimiques	68
3. Traitements mécaniques.....	69
4. Traitements biologiques.....	70
E. Objectifs de ce travail	72
Partie expérimentale	75
A. Préparation et conditionnement de la biomasse	77
B. Caractérisation et déconstruction de la paille.....	77
1. Caractérisation selon Van Soest.....	77
2. Extraction et purification des constituants de la paille de blé.....	80
C. Etude de la méthanisation d'un substrat	81

1. Test du potentiel méthanogène (TPM) mesure de la production de biogaz par la pression	81
2. Calcul de la production de biogaz d'un substrat	84
3. TPM sur une paille « théorique »	85
4. Formule de Buswell	85
D. Prétraitements	86
1. Prétraitement de la paille brute à la pile Valley	86
2. Préparations des substrats après prétraitements	86
3. Prétraitement à température ambiante ou par chauffage « traditionnel »	87
4. Prétraitement par chauffage aux micro-ondes	87
5. Prétraitement aux ultrasons	88
6. Prétraitement à la soude à température ambiante ou associé à différents prétraitements physiques	88
7. Prétraitement à l'ammoniac	88
8. Prétraitement oxydatif à l'ozone	89
E. Caractérisations post-prétraitement	90
1. Evaluation de la mouillabilité au goniomètre	90
2. Analyse de la cristallinité par diffraction aux rayons X	91
3. Demande chimique en oxygène (DCO)	92
4. Spectroscopie Infrarouge par transformée de Fourier (FT-IR)	92
5. Chromatographies liquide	92
6. Chromatographie Flash	93
7. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	94
Chapitre I : Caractérisation de la paille de blé et impact de ses différentes fractions sur la méthanisation	97
A. Introduction	99
B. Caractérisation de la paille de blé	100
1. Comparaison méthode Van Soest - méthode TAPPI	100
2. Caractérisation de la lignine de paille de blé	103
C. Calcul de la production et du rendement de méthanisation d'après la littérature	107
D. Impact de différentes fractions de la paille de blé sur la méthanisation	109
E. Potentiel méthanogène de la paille de blé « théorique »	113
F. Conclusion	115

Chapitre II : Impacts des fractions phénoliques sur la méthanisation	117
A. Introduction.....	119
B. Acide férulique et dérivés	120
1. L'acide férulique	120
2. L'isoeugénol	124
C. Vanilline et dérivés.....	126
1. L'acide vanillique	126
2. La vanilline.....	128
3. L'alcool vanillique	130
4. L'alcool vératrylique	130
5. Le créosol	132
D. Conclusion sur les molécules aromatiques	133
Chapitre III : Prétraitements physiques	137
A. Introduction.....	139
B. Prétraitement mécanique : raffinage à la pile Valley	139
1. Impact du raffinage sur les caractéristiques de la paille de blé.....	140
2. Impact du raffinage à la pile Valley sur la méthanisation de la paille de blé.....	144
C. Prétraitement aux ultrasons	146
1. Impact du prétraitement aux ultrasons sur la composition de la paille de blé (Van Soest)	146
2. Impact du prétraitement aux ultrasons sur la méthanisation de la paille de blé.....	147
D. Prétraitement thermique (chauffage par convection)	149
1. Impact du prétraitement thermique sur la composition de la paille.....	149
2. Impact du prétraitement thermique sur la méthanisation.....	150
E. Prétraitement thermique associé aux micro-ondes	152
1. Impact du prétraitement aux micro-ondes sur la composition de la paille extraite	152
2. Impact du prétraitement aux micro-ondes sur la paille	154
F. Conclusion sur les prétraitements physiques.....	155
Chapitre IV : Prétraitements physico-chimiques	157
A. Introduction.....	159
B. Prétraitements à la soude.....	160

1.	Limites fixées pour les prétraitements.....	160
2.	Prétraitement à la soude à température ambiante (24°C)	161
3.	Prétraitement à la soude associé à un chauffage « traditionnel »	164
4.	Prétraitement à la soude associé à un chauffage par micro-ondes.....	168
5.	Prétraitement à la soude associé à un traitement aux ultrasons	173
6.	Caractérisation des fractions solubilisées par chromatographie d'exclusion stérique 178	
7.	Caractérisation des fractions solubilisées par infrarouge à transformée de Fourier	180
C.	Prétraitements à l'ammoniaque	182
D.	Prétraitement oxydatif à l'ozone	186
1.	Impact de l'acide oxalique sur la méthanisation.....	187
2.	Impact de l'ozone sur la composition de la paille extraite (selon Van Soest).....	188
3.	Potentiel méthanogène de la paille prétraitée	190
4.	Analyse de la fraction liquide par RMN-H après séparation par chromatographie Flash	192
E.	Conclusion sur les prétraitements physico-chimiques.....	197
	CONCLUSION GENERALE.....	199
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	205

Table des illustrations

Figure 1 : Consommation d'électricité primaire en France et par secteur (Mtep) en 2012	33
Figure 2 : Consommation d'énergie primaire en France et par secteur (Mtep) en 2012	34
Figure 3 : Les différentes production d'énergies primaires en France depuis 1973 (Mtep) (Dron 2007 ; 2010 ; 2011).....	35
Figure 4 : Importances relatives des principales énergies renouvelables (Dron 2013).....	37
Figure 5 : Principe de la méthanisation.....	38
Figure 6 : Schéma des grandes étapes de la digestion anaérobie (Garcia 1990)	42
Figure 7 : Quantité de paille de blé disponible en France et par région pour un usage non agronomique (GIE ARVALIS/ONIDOL 2009)	55
Figure 8 : Photo au microscope électronique à balayage d'une coupe transversale de feuille ; l'épiderme, le parenchyme palissadique et le parenchyme lacunaire apparaissent de haut en bas (Microsolution 2013).	56
Figure 9 : Organisation structurale de la paroi lignocellulosique dans un tissu végétal (Xu 2010)	57
Figure 10 : Schéma d'une molécule de cellulose	59
Figure 11 : Schéma de l'organisation cristalline de deux molécules de cellulose au sein d'une microfibrille	59
Figure 12 : Schéma d'organisation de microfibrilles de cellulose associé à une image par microscopie de force atomique (AFM) (Bhattacharya, Germinario, et Winter 2008).....	60
Figure 13 : Deux exemples d'hémicelluloses : le xylane (1) et l'arabino(glucurono)xylane (2)	62
Figure 14 : Alcools phénoliques précurseurs de la lignine.....	63
Figure 15 : Liaisons majoritaires entre les unités phénoliques au sein de la lignine.....	65
Figure 16 : Modèle de la lignine de paille de blé (Xu 2010).....	66
Figure 17: Schéma du principe général de l'étude de la paille prétraitée.....	74
Figure 18 : Fibertec unités de traitement à chaud (gauche) et à froid (droite).....	78
Figure 19 : Schéma du bouchon étanche aux gaz fermant le TPM pression	82
Figure 20 : Détails du banc d'analyse TPM en pression	83
Figure 21 : Pile Valley en fonctionnement	86
Figure 22 : Prétraitement de la paille chauffée par micro-ondes.....	87

Figure 23 : Schéma du prétraitement du dispositif de prétraitement de la paille en voie sèche	90
Figure 24 : Photo du goniomètre DSA10 Mk2	91
Figure 25 : Intervalles de déblindage des groupements hydroxydes	96
Figure 26 : Synthèse des fractions récupérées selon les différentes méthodes d'analyse de la biomasse lignocellulosique	100
Figure 27 : Spectre FT-IR de la lignine dioxane	103
Figure 28 : Structure des unités syringyles et guaïacyles dans la lignine	104
Figure 29 : Réaction de phosphorylation d'un composé phénolique de la lignine	105
Figure 30 : Spectre RMN - ³¹ P de la lignine dioxane de paille de blé	105
Figure 31 : Production cumulée de biogaz totale et de méthane à partir de cellobiose et de glucose.....	109
Figure 32 : Production cumulée de biogaz à partir de paille de blé brute et de ses différentes fractions (extractibles, holocellulose, cellulose et lignine)	110
Figure 33 : Production cumulée de CH ₄ à partir de paille de blé brute et de ses différentes fractions (extractibles, holocellulose, cellulose et lignine).....	110
Figure 34 : Production de biogaz cumulée, mesurée par TPM sur de la paille de blé brute, sur de la paille synthétique et de la paille théorique.....	113
Figure 35 : Production de biogaz total, CO ₂ et CH ₄ à partir d'acide férulique (5g.MO/L d'inoculum)	120
Figure 36: Production de biogaz, CH ₄ et CO ₂ à partir d'un mélange cellulose - acide férulique (2,5g.MO/L d'inoculum - 2,5gMO/L d'inoculum).....	122
Figure 37 : Production de CH ₄ mesuré et calculé à partir d'un mélange cellulose - acide férulique (2,5g.MO/L d'inoculum - 2,5gMO/L d'inoculum) ; ainsi qu'à partir de cellulose et d'acide férulique pur (5g.MO/L d'inoculum)	123
Figure 38 : Formule développée de l'isoeugénol et de l'acide férulique.....	124
Figure 39 : Production biogaz total, CH ₄ et CO ₂ à partir du blanc et de l'isoeugénol non corrigé du blanc (5g.MO/L d'inoculum)	124
Figure 40 : Vanilline selon différents degrés d'oxydation de la fonction en para de l'hydroxyle phénolique	126
Figure 41 : Productions de biogaz, CH ₄ et CO ₂ à partir d'acide vanillique (5g.MO/L d'inoculum)	127
Figure 42 : Production du biogaz, CH ₄ et CO ₂ à partir de vanilline (5g.MO/L d'inoculum) ...	128

Figure 43 : Formules développées du syringaldéhyde et de la vanilline	129
Figure 44 : Production du biogaz total, CO ₂ et CH ₄ à partir du blanc et de l'alcool vanillique non corrigé du blanc (5g.MO/L d'inoculum)	130
Figure 45 : Formules développées de l'alcool vératrylique et du créosol	131
Figure 46 : Production de biogaz total, CH ₄ et CO ₂ du blanc et du mélange inoculum-alcool vératrylique non corrigé du blanc	131
Figure 47 : Production de biogaz total, CO ₂ et CH ₄ , du blanc et du mélange créosol-inoculum non corrigé du blanc.....	132
Figure 48 : Formules développées des 2,5- ; 2,6- ; 3,4- et 3,5-diméthylphénols	133
Figure 49 : Modification des fibres induites par le raffinage (Reynaud 2013)	139
Figure 50 : Schéma de la pile Valley (TAPPI standard 2001 T 200 sp-01)	140
Figure 51 : Taux des différentes fractions de la paille brute en fonction du traitement (pile Valley 10min ou imbibition dans l'eau).....	141
Figure 52 : Pastille de paille de blé avant (gauche) et après (droite) dépôt de la goûte d'eau	142
Figure 53 : Courbe de diffraction aux rayons X de la paille brute et de la paille raffinée à la Pille Valley	143
Figure 54 : Production de biogaz total, CO ₂ et CH ₄ à partir de paille brute et de paille traitée à la pile Valley	144
Figure 55 : Taux des différentes fractions de la paille extraite avant et après sonication dans l'eau (20kHz) pendant 1h	147
Figure 56 : Production de biogaz à partir de paille extraite et de paille traitée aux ultrasons pendant 1h (20kHz).....	148
Figure 57 : Taux des différentes fractions de la paille brute avant et après cuisson dans l'eau à 90°C pendant 1h.....	149
Figure 58 : Production de biogaz à partir de paille brute et de paille traitée à 90°C pendant 1h (chauffage « traditionnel »)	150
Figure 59 : Taux des différentes fractions de la paille extraite avant et après cuisson dans l'eau à 90°C pendant 1h par chauffage aux micro-ondes.....	153
Figure 60 : Production de biogaz à partir de paille extraite et de paille traitée à 90°C pendant 1h (chauffage aux micro-ondes)	154
Figure 61 : Taux corrigés des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à la soude (0,2mol/L) pendant 1h à 24°C	161

Figure 62 : Production de biogaz total, CH ₄ et CO ₂ pour : de la paille extraite, de la paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) à température ambiante avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.....	163
Figure 63 : Taux corrigés des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à 90°C dans l'eau ou à la soude (0,2mol/L) pendant 1h à 24°C ou 90°C avec un chauffage dit traditionnel (par convection)	165
Figure 64 : Production de biogaz total, CH ₄ et CO ₂ pour : de la paille extraite, de la paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) à 90°C (chauffage traditionnel) avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.....	166
Figure 65 : Evolution de la température lors du prétraitement aux micro-ondes pour t<5min	168
Figure 66 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à la soude (0,2mol/L) 90°C par chauffage aux micro-ondes pendant 1h, 1min ou 5min.	169
Figure 67 : Production de biogaz total, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à un chauffage par micro-ondes de 1h, 5min ou 1min ; pour chaque prétraitement les TPM sont effectués sur la fraction solide avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.	170
Figure 68 : Production de CH ₄ , des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à un chauffage aux micro-ondes de 1h, 5min ou 1min ; pour chaque prétraitements les TPM sont effectués sur la fraction solide avec ou sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.....	171
Figure 69 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à la soude (0,2mol/L) associée à un prétraitement aux ultrasons pendant 1h ou 5min.	174
Figure 70 : Production de biogaz total, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à de la sonication aux ultrasons (20kHz) pendant 1h ou 5min ; pour chaque prétraitements les TPM sont effectués sur la fraction solide avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.....	176
Figure 71 : Production de CH ₄ , des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à de la sonication aux ultrasons (20kHz) pendant 1h ou 5min ; pour chaque prétraitements les TPM sont effectués sur la fraction solide avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.....	177

Figure 72 : Chromatogramme d'exclusion stérique (détection UV) des fractions solubilisées par les prétraitements à la soude (0,2mol/L) à température ambiante ou associé à un chauffage traditionnel ou par micro-ondes	179
Figure 73 : Spectre FT-IR des fractions solubilisées suite aux traitements à la soude à 90°C ou à température ambiante	180
Figure 74 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraitée à l'ammoniaque (0,2mol/L) pendant 1h, à température ambiante, ou associé à un chauffage par micro-ondes pendant 1min, ou à de la sonication pendant 1h.....	183
Figure 75 : Production de biogaz total et CH ₄ , des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée avec NH ₄ OH (0,2mol/L) à température ambiante ou associé à un chauffage par micro-ondes (90°C) pendant 1h ou à de la sonication pendant 1h.	184
Figure 76 : Mécanisme d'ozonolyse d'un noyau aromatique au sein de la lignine	186
Figure 77 : Production de biogaz, CH ₄ et CO ₂ à partir d'acide oxalique (5g.MO/L d'inoculum)	187
Figure 78 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraitée à l'ozone pendant 30min, en voie liquide ou solide suivi d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude.	189
Figure 79 : Production de biogaz total, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée avec O ₃ pendant 30min en voie liquide ou solide suivi ou non d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude.....	190
Figure 80 : Production de CH ₄ , des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée avec O ₃ pendant 30min en voie liquide ou solide suivi ou non d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude.	191
Figure 81 : Chromatogramme lié à l'analyse par HPLC de la fraction solubilisée par le prétraitement à l'ozone suivie d'un lavage à la soude.	192
Figure 82 : Chromatogramme de la première séparation par chromatographie Flash.....	193
Figure 83 : Chromatogramme de la seconde séparation par chromatographie Flash	193
Figure 84 : Spectre de l'analyse RMN-H de la fraction n°4	194
Figure 85 : Spectre de RMN-H Dosy de la fraction n°2	195
Figure 86 : Spectre de RMN HSQC effectué sur la fraction n°2	196
Tableau 1 : Consommation d'énergie primaire en France depuis 1973 (Mtep) source (Dron 2010 ; 2011 ; 2013).....	31

Tableau 2 : Structure de la consommation d'énergie primaire, corrigée des variations climatiques (en %) (Dron 2010).....	32
Tableau 3 : Bactéries hydrolytiques de la méthanisation selon (Godon 2011)	45
Tableau 4 : Bactéries acidogènes de la méthanisation en conditions mésophiles (Godon 2011)	46
Tableau 5 : Bactéries syntrophiques OHPA (Godon 2011)	47
Tableau 6 : Bactéries homoacétogènes de la méthanisation (Godon 2011).....	48
Tableau 7 : Potentiel méthanogènes, matière sèche (MS) et matière sèche volatile (MSV) de différentes biomasses agricoles (Berger et Couturier 2011)	51
Tableau 8 : Potentiel énergétique (obtenu par méthanisation) et production de matière organique (MO) lié à la biomasse agricole française (Berger et Couturier 2011)	52
Tableau 9 : Production française en résidus de culture (Berger & Couturier 2011)	53
Tableau 10 : Production de méthane de la paille de blé selon différentes sources.....	54
Tableau 11 : Composition de différente paille de blé selon la méthode Van Soest.....	58
Tableau 12 : Taux des différents sucres (% relatifs) et acide uronique (%) constitutifs des hémicelluloses de paille de blé (Runcang Sun, Mark Lawther, et Banks 1998).....	62
Tableau 13 : Production de méthane au bout de 21 jours de digestion anaérobie, à partir de copaux de cèdre traité pendant 20 jours avec une souche de champignon (Take et al. 2006).....	71
Tableau 14 : Gradient de concentration eau - acétonitrile pour l'analyse HPLC.....	93
Tableau 15 : Gradients en eau pour la première et la deuxième séparation par chromatographie Flash	93
Tableau 16 : Caractérisation de la paille de blé selon la méthode Van Soest (VS) et la méthode TAPPI pour de la paille brute et de la paille extraite (acétone/éthanol, éthanol, eau). 101	
Tableau 17: Analyses de la paille de blé brute selon TAPPI ou Van Soest avec ou sans correction de la méthode : correction 1 = Hydrolyse de la cellulose selon la procédure Klason sur la fraction ADF ; correction 2 = porosité des fritté plus faible (n° 3).....	102
Tableau 18 : Quantification des groupes hydroxyles par RMN 31P (mmol/g de lignine) de la lignine dioxane de paille de blé.....	106
Tableau 19 : Production de méthane de la paille de blé selon différentes sources.....	107
Tableau 20 : Analyses élémentaires et production de biogaz et de méthane calculées (formule de Buswell) de différentes fractions pures de la paille de blé	111

Tableau 21 : Impact de différentes molécules aromatiques sur le rendement en biogaz par méthanisation	133
Tableau 22: Indice de cristallinité de la paille brute et de la paille raffinée à la Pile Valley, mesurée par diffraction aux rayons X.	143
Tableau 23 : Récapitulatif des masses moléculaires (M_w) mesurées par SEC sur les fractions solubilisées de trois prétraitements à la soude (étalonnage par polystyrènes sulfonés)	179

Liste des abréviations

ACV : Analyse de Cycle de Vie

ADF : Acid Detergent Fiber

ADL : Acid Detergent Lignin

ADS : Acid Detergent Solution

DCO : Demande Chimique en Oxygène

DOSY : Diffusion Ordered Spectroscopy

FT-IR : spectroscopie InfraRouge couplé à un calcul de Transformée de Fourier

G : unité Guaïacyles

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

H : unité Hydroxyphénol

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

MO : Matière Organique

MS : Matière Sèche

MSV : Matière Sèche Volatile

NDF : Neutral Detergent Fiber

NDS : Neutral Detergent Solution

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SEC : Steric Exclusion Chromatography

S : unité Syringyle

STEP : STation d'EPuration

TPM : Test du Potentiel Méthanogène

Introduction générale

Au milieu des années 1970, l’empreinte écologique mondiale semble avoir rattrapé la capacité biologique de la Terre, pour la dépasser de 50% en 2007. Actuellement, il faut donc à la Terre un an et demi pour absorber les effets de l’activité de l’homme produits pendant une année. Entre les années 1970 et 2000, un tiers des ressources de la Terre a été consommé (Hawken et Lovins 2000), et la pollution due à l’activité anthropique s’est fortement accélérée. En 2006, ce sont entre 3,4 et 4 milliards de tonnes de déchets qui sont produites à l’échelle mondiale. En France la production de déchets ménagers ou assimilés atteint une valeur de 356 kg.habitant⁻¹.an⁻¹. Une partie de ces déchets est recyclée tandis que la majorité est, soit incinérée, soit enterrée dans des centres d’enfouissement. Pourtant une partie de ces déchets, constituée de matière organique biodégradable pourrait faire l’objet d’une autre forme de valorisation (ADEME 2012).

En parallèle de l’augmentation des pollutions liées à l’homme, l’augmentation des besoins énergétiques, associée à une raréfaction des ressources, apparaît. La majeure partie de cette dernière est d’origine fossile (pétrole, gaz, minerais radioactif) et présente donc un caractère fini à l’échelle de temps humaine. De plus, l’utilisation de ces ressources est associée à la libération dans l’atmosphère, de gaz favorisant le réchauffement climatique, en particulier sous forme de dioxyde de carbone (CO₂). Pourtant, dès les années 1970, des signaux ont été lancés à l’échelle mondiale mettant en garde contre l’utilisation de pétrole et de gaz et contre les émissions de gaz polluants (rapport de Meadows de 1972). Plus récemment, des preuves ont été apportées de l’impact des gaz à effet de serre, sur le réchauffement climatique (rapport du GIEC de 1990, 1995, 2007 et 2013), liés pour partie à la production d’énergie à partir de ressources d’origine fossile.

La gestion des pollutions d’origine anthropique et la production d’une énergie plus respectueuse de l’environnement, sont donc des enjeux majeurs du XXI^{ème} siècle. Cette dernière doit être, autant que possible, d’origine renouvelable ; de plus, l’utilisation de déchets pour la produire, permettrait de transformer une source de problèmes en solution.

La méthanisation ou digestion en milieu anaérobie est un processus biologique de dégradation des matières organiques, en un mélange gazeux composé essentiellement de méthane (CH₄) et de dioxyde de carbone (CO₂). Utilisée depuis longtemps en dépollution carbonée des effluents agroindustriels du fait de la faible production de boue résiduelle (René Moletta et Verstraete 2011), la méthanisation connaît aujourd’hui un essor important pour la production d’énergie renouvelable via l’utilisation énergétique du biométhane. Cette voie

biotechnologique présente cependant des étapes limitantes et des rendements de biodégradation faibles lorsque la biomasse lignocellulosique (coproduit de l'industrie agro-alimentaire et source de déchet) est utilisée comme seule matière première.

La méthanisation se déroule en quatre étapes (Garcia 1990) : L'hydrolyse qui permet la transformation de molécules complexes (polysaccharides, lipides, protéines,...) en monomères qui sont ensuite transformés en acides gras volatils, alcools et acides organiques lors de l'acidogénèse (R. Moletta 1993; Guillou et Moletta 2011). Au cours des étapes d'acétogénèse et de méthanogénèse, ces molécules sont transformées en gaz carbonique, acétate, hydrogène puis méthane (Zeikus 1982; Tholen et Brune 1999). Dans le cas de la méthanisation de la biomasse lignocellulosique, l'étape d'hydrolyse est limitante (R. Moletta 1993).

La biomasse lignocellulosique a une structure complexe, composée en majorité de trois fractions polymériques : la cellulose, les hémicelluloses (l'holocellulose étant l'association de ces deux polymères) et la lignine (Xu 2010). L'hydrolyse de l'holocellulose permet la libération de différents sucres : en majorité du glucose (provenant de la cellulose) et du xylose (provenant des hémicelluloses) (Y. Peng et Wu 2010; Ren et Sun 2010; R. Sun, Lawther, et Banks 1996). Ces sucres sont des substrats facilement biodégradables lors de la méthanisation, mais la structure cristalline de la cellulose, et les interactions cellulose-hémicelluloses, peuvent diminuer la cinétique d'hydrolyse de l'holocellulose. La présence de lignine dans la biomasse lignocellulosique peut être responsable d'une diminution du rendement et de la cinétique de méthanisation, même si son action n'est pas encore bien définie.

Pour faciliter la déconstruction des biomasses lignocellulosiques et favoriser sa transformation en méthane en milieu anaérobie, différents types de prétraitements ont été testés, ils peuvent favoriser l'accessibilité à l'holocellulose ou la pré-hydrolyser. Ils peuvent être : physiques (mécaniques, thermiques), chimiques (oxydation, hydrolyse acide, prétraitements alcalins) ou biologiques (fongiques, enzymatiques) (Mosier et al. 2005; Ward et al. 2008; Y. Sun et Cheng 2002; Fernandes et al. 2009). Le but de cette thèse est d'apporter une aide au choix du prétraitement le plus adapté, et d'améliorer les prétraitements, pour qu'ils soient plus en adéquation avec la production raisonnée d'énergie à partir de biomasses lignocellulosiques.

Dans ce contexte, l'APESA (association pour l'environnement et la sécurité en aquitaine) porteur industriel du projet BIOREM, s'est associé au LCPO pour étudier des prétraitements à mettre en œuvre sur une biomasse lignocellulosique actuellement disponible comme : la paille de blé. La complémentarité des partenaires, l'APESA pour ses compétences en méthanisation et le LCPO qui développe des recherches reconnues sur les macromolécules d'origine végétale, a été un atout pour mener à bien cette thèse.

Ce travail s'inscrit dans un cadre plus vaste qui consistera à associer, dans un deuxième temps, d'autres partenaires industriels comme SAFISYS du groupe SAFRE et le CENER (Centre National des Energies Renouvelables, Navarre, Espagne) autour d'un programme de recherche plus globale sur le prétraitement de la biomasse lignocellulosique pour l'obtention de biométhane.

Synthèse bibliographique

A. Contexte énergétique

1. Les besoins énergétiques actuels

a) Les besoins en énergie primaire en augmentation depuis 1970

Depuis la révolution industrielle, l'énergie est au cœur de notre société. D'une énergie réduite au chauffage des habitations et à la cuisson des aliments, nos besoins en énergie se sont diversifiés. Actuellement, l'énergie est aussi bien utilisée pour le transport des personnes et des marchandises, que pour l'industrie sous forme d'énergie motrice ou de chaleur.

La première crise pétrolière en 1973 a entraîné un changement de perception de l'énergie. Perçue comme abondante et à faible coût, l'énergie devient une ressource qu'il faut économiser. Paradoxalement les besoins en énergie primaire n'ont pas cessé d'augmenter depuis les années 1973, que ce soit pour les pays émergents ou industrialisés.

Depuis les années 2000 la consommation d'énergie a atteint un plateau (Tableau 1), qui peut être dû à la crise financière ou à une prise de conscience de la nature finie des ressources fossiles, et de la nécessité de les économiser. En effet, le pétrole, le charbon et le gaz naturel se forment très lentement par rapport à leur consommation.

Tableau 1 : Consommation d'énergie primaire en France depuis 1973 (Mtep) source (Dron 2010 ; 2011 ; 2013)

	1973	1990	2002	2008	2009	2010	2012
Consommation réelle	182,4	224,6	265,6	271,5	257,8	268,0	258,5
Corrigée des variations climatiques	179,7	228,3	271,7	273,6	259,2	263,5	259,4
dont transformation énergie	35,1	75,2	95,8	98,2	90,5	96,4	93
dont énergie finale	133,6	140,7	160,8	160,8	155,9	154,9	154,4
dont non énergétique	10,9	12,4	15,1	14,6	12,8	12,2	12

Cet état de fait favorise l'intérêt grandissant, pour les énergies renouvelables, des pays non producteurs d'énergies fossiles et recherchant une indépendance énergétique. Cette indépendance est nécessaire pour prétendre à une indépendance politique et économique. En effet, la consommation d'énergie représente un poste de dépense important sur le plan économique. Environ 8% du budget des ménages est alloué à l'énergie, 23 milliards d'euros sont nécessaires à l'importation de l'énergie en France et 230 000 emplois en dépendent (Fontaine 2003).

Enfin, il est désormais admis, que la consommation d'énergies fossiles favorise le réchauffement climatique en relarguant principalement du dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère. Or l'utilisation d'énergie renouvelable permet de limiter l'augmentation de CO₂ atmosphérique et autres gaz à effet de serre.

b) La consommation totale en France

Dans les années 70, la consommation d'électricité en France était presque anecdotique (environ 4% d'énergie primaire) par rapport à la consommation de pétrole (environ 68% d'énergie primaire) (Dron 2013) (Tableau 2). Suite à la crise pétrolière de 1973, la politique française a favorisé l'électricité d'origine nucléaire. Ainsi, la consommation actuelle d'énergie primaire sous forme d'électricité (43%) a dépassé celle sous forme de pétrole (31%) (Dron 2011).

Tableau 2 : Structure de la consommation d'énergie primaire, corrigée des variations climatiques (en %) (Dron 2010)

	1973	1990	2000	2007	2008	2009
Electricité primaires	4,3	36,4	41,8	42,4	42,8	42,7
Pétrole	67,6	38,7	34,3	32,9	32,3	31,9
Gaz	7,4	11,5	14,8	14,8	14,9	15,0
Energies renouvelables	5,2	5,0	4,3	5,1	5,6	6,2
Charbon	15,5	8,4	4,7	4,7	4,7	4,2

L'électricité produite est utilisée majoritairement pour la production d'énergie, puis par le secteur résidentiel et le tertiaire, enfin dans l'industrie. L'agriculture, la sidérurgie et les transports ne consommant que très peu d'électricité (Figure 1). Ce dernier poste devrait voir ses dépenses augmenter en raison du développement des transports en commun urbains et des véhicules électriques.

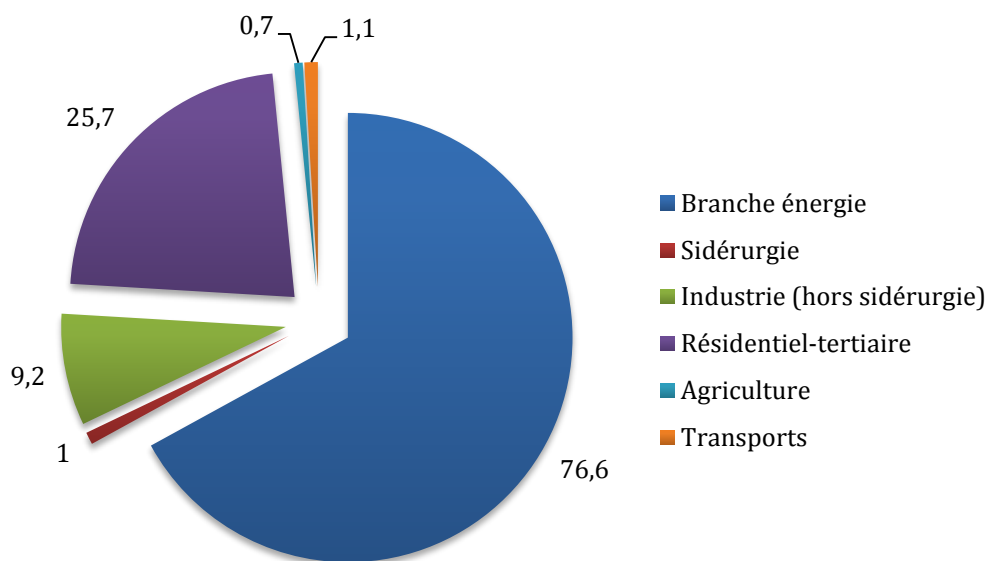


Figure 1 : Consommation d'électricité primaire en France et par secteur (Mtep) en 2012

Entre les sources d'énergie primaire extraites du sous-sol et le consommateur final, il y a l'activité de la branche énergie, qui intervient pour fabriquer et livrer à l'utilisateur l'énergie qui correspond à sa demande. Ceci inclut le raffinage du pétrole, la cokéfaction du charbon, l'activité des centrales thermiques qui utilisent l'énergie primaire fossile (gaz, charbon, pétrole), renouvelable ou nucléaire pour la transformer en électricité. Ceci inclut aussi le transport et la distribution de l'énergie jusqu'à l'utilisateur final. Ces opérations indispensables comportent inévitablement des consommations intermédiaires et des pertes, proportionnelles à l'activité. Les pertes de loin les plus importantes en volume sont celles du nucléaire, il est admis que l'énergie restituée sous forme d'électricité est égale à un tiers de l'énergie totale dégagée par la fission des noyaux des atomes de combustibles nucléaires. Les deux autres tiers sont comptabilisés comme des pertes. Il s'agit par exemple de la chaleur que libère le panache de vapeur d'eau au-dessus des centrales. Cette convention explique le très gros écart entre l'électricité primaire d'origine nucléaire et l'électricité finale d'origine nucléaire. Les centrales thermiques classiques ont également des pertes de rendement du même ordre, mais qui, en France, représentent des volumes beaucoup moins importants (Dron 2013).

Au final ce sont 114,2 Mtep d'électricité qui sont consommées en 2012 en France (Dron 2013). Bien que moins importante que la consommation électrique, la consommation de gaz naturel (méthane) représente tout de même 32 Mtep en 2012.

Trois grands postes de consommation se distinguent en France, ils consomment à eux seuls 95% de l'énergie finale, soit 57% de l'énergie primaire (Figure 2). Ces grands secteurs de consommation sont :

- Le secteur résidentiel et l'industrie tertiaire qui consomment 44% de l'énergie finale.
- Le secteur du transport utilise 32% de l'énergie finale.
- Le secteur de l'industrie (hors sidérurgie et tertiaire) utilise 19% de l'énergie finale.

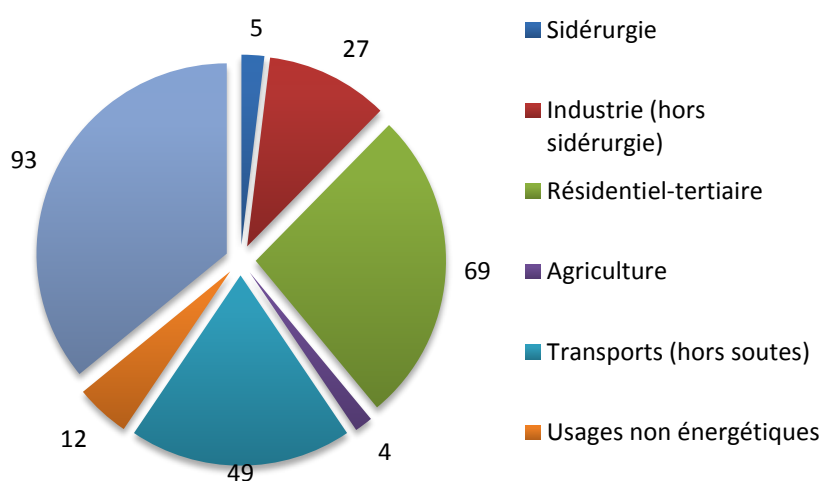


Figure 2 : Consommation d'énergie primaire en France et par secteur (Mtep) en 2012

2. Les ressources actuellement utilisées

En 1973 la production de charbon en France était majoritaire, tandis que la production d'électricité (à partir de charbon et de pétrole) était très faible (Figure 3). Dans un même temps, la part d'énergie renouvelable (hors électricité) était importante du fait de l'utilisation du bois pour le chauffage (Fontaine 2003).

Actuellement en France, les ressources en charbon sont épuisées, ou trop chères à exploiter. D'autre part, le parc nucléaire français est important, conduisant à une production d'électricité nucléaire très élevée, voire excédentaire (Observ'ER (France) 2010). Depuis les années 2000, le début d'une croissance de production d'énergies renouvelables est observée (Figure 3) et va en s'accroissant.

En comparant ces données aux chapitres précédents, la France a une production d'électricité légèrement excédentaire, mais qui reste déficitaire pour la production globale d'énergie (consommation totale en 2012 : 259 Mtep). Ainsi l'importation d'énergie, en particulier sous forme de pétrole et gaz, est nécessaire. A titre d'exemple la production de gaz naturel en France n'est que de 0,4 Mtep quand sa consommation est de l'ordre de 32 Mtep en 2012 (Dron 2013).

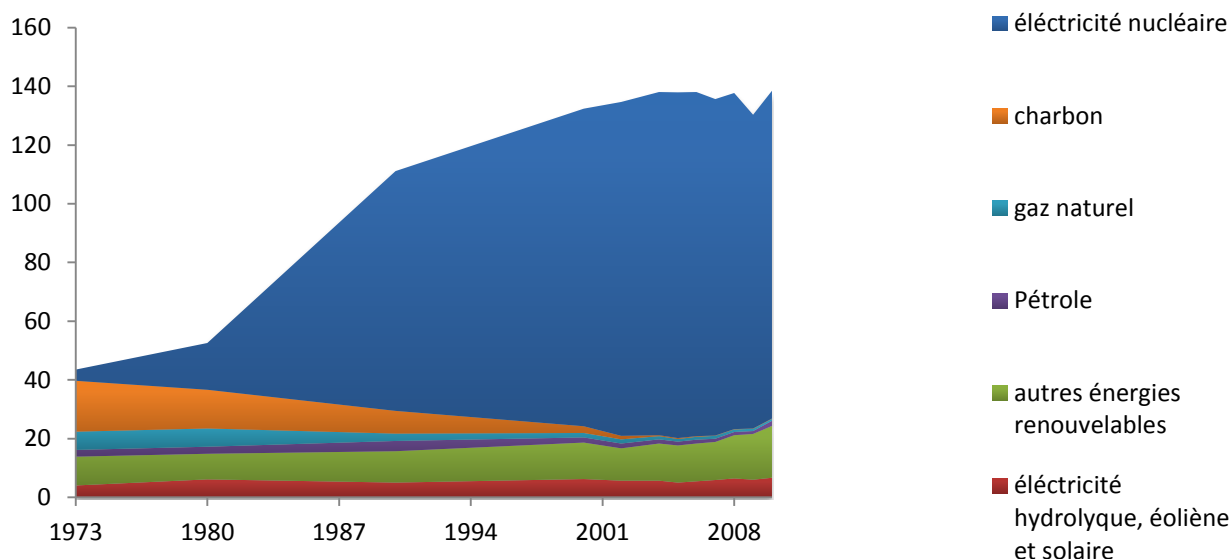


Figure 3 : Les différentes production d'énergies primaires en France depuis 1973 (Mtep) (Dron 2007 ; 2010 ; 2011)

3. Les objectifs de consommation-production

a) Les besoins énergétiques à l'horizon 2020

Selon le scénario tendanciel de la direction générale de l'énergie et des matières premières (DGEMP) et l'observatoire de l'énergie, d'ici à 2020 la consommation finale d'énergie totale pourrait, en l'absence de toutes mesures nouvelles, s'accroître encore de 45,6 Mtep en France (Fontaine 2003) soit une augmentation de 28% par rapport à la situation de 2002. Ce phénomène étant majoritairement dû au poste résidentiel-tertiaire.

A l'échelle mondiale, différentes études envisagent une augmentation de la part de la consommation de gaz d'ici à 2050 (Syrota 2008). Actuellement celle-ci représente 21% de la consommation primaire, mais elle pourrait atteindre jusqu'à 35% selon le scénario du GIEC (Groupe d'expert Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat). Même si le gaz évoqué est d'origine fossile, il n'est pas exclu qu'une fraction de plus en plus importante vienne de la transformation de la biomasse par méthanisation.

4. Les énergies renouvelables

La diversité des formes d'énergie renouvelable conduit à distinguer trois grandes familles :

- EnRt : énergies renouvelables thermiques, c'est-à-dire : bois-énergie (bois et sous-produits du bois), résidus de récolte, solaire thermique, géothermie, pompes à chaleur (PAC), déchets urbains renouvelables, biogaz, biocarburants.
- EnRé : électricité hydraulique, éolienne et photovoltaïque.
- EnRt et déchets : énergies renouvelables thermiques et déchets urbains non renouvelables valorisés sous forme d'énergie thermique. Il regroupe toutes les énergies non fossiles excepté l'électricité (Fontaine 2003).

La plus grosse part d'énergie renouvelable en 2010 en France est due au bois énergie, que ce soit dans des chaudières industrielles ou individuelles. Cette source d'énergie est utilisée en remplacement du charbon ou du fioul (Figure 4).

Grâce à l'important dispositif d'aides publiques mis en place récemment (fonds chaleur et déchets, revalorisation du tarif d'achat de l'électricité, réglementation et création d'un tarif d'achat pour l'injection de biogaz dans les réseaux de gaz naturel), la filière biogaz connaît une forte augmentation dans ses diverses composantes (méthanisation de résidus agricoles, industriels ou ménagers notamment mais aussi centres de stockage de déchets et stations d'épuration). Elle se traduit par la poursuite d'un nombre toujours plus important de mises en service de nouvelles installations : 67 installations auraient été raccordées au réseau en 2012 pour une puissance de 35 MW, après 38 unités en 2011 pour une puissance de 22 MW. Fin 2012, on dénombrait 232 installations raccordées pour une puissance totale de 267 MW et 8 installations bénéficiant du fonds chaleur pour une production prévue de 11 ktep (Observ'ER (France) 2013; Dron 2013). L'année 2012 aura été par ailleurs la première année effective de l'injection de biogaz dans les réseaux de gaz naturel en France ; cette quantité encore marginale en 2012 devrait augmenter en 2013 avec la signature de nouveaux contrats.

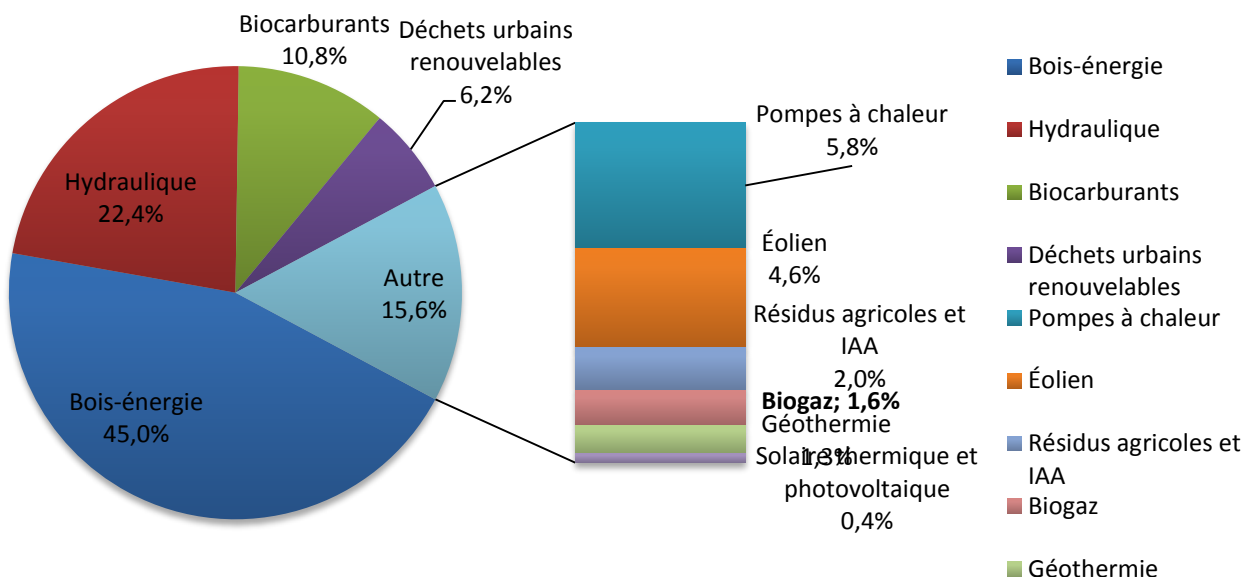


Figure 4 : Importances relatives des principales énergies renouvelables (Dron 2013)

En 2012 la production d'énergie renouvelable « EnRt et déchets » a représenté 22,4 Mtep, et une progression de 19% par rapport à 2011 a été observée, elle a été entamée depuis 5 ans.

Grâce à la montée en puissance des unités mises en service récemment, la valorisation électrique croît à un rythme soutenu et dépasse désormais largement le térawatt-heure. La valorisation thermique progresse également à la faveur des cogénérations, dont s'équipent beaucoup de nouvelles installations de stockage de déchets et de méthanisation. Elle consiste à associer à la production d'électricité une récupération de chaleur. Forte du potentiel évalué et de l'arrivée à terme des nombreux chantiers en cours, la quantité de biogaz produite et sa valorisation sous ses diverses formes (électrique, thermique, biogaz carburant) devraient encore considérablement s'accroître dans les prochaines années (Dron 2013).

B. La méthanisation

1. Un processus naturel contrôlable

La méthanisation, ou digestion anaérobie, est la transformation de la matière organique en un biogaz, composé principalement de méthane et de dioxyde de carbone (Figure 5). Cette transformation est effectuée par un consortium de bactéries et d'archées fonctionnant en anaérobiose qui se développe en consommant la matière organique. On considère que 5 à 10% de la matière organique dégradée est transformée en biomasse bactérienne (René Moletta et Verstraete 2011).

La méthanisation est un processus qui a lieu naturellement dans les marais, les rizières, le fond des lacs, mais aussi dans l'intestin des animaux. Il a été contrôlé et appliqué industriellement en France à partir des années 1940 sur des déchets agricoles et des résidus d'élevage.

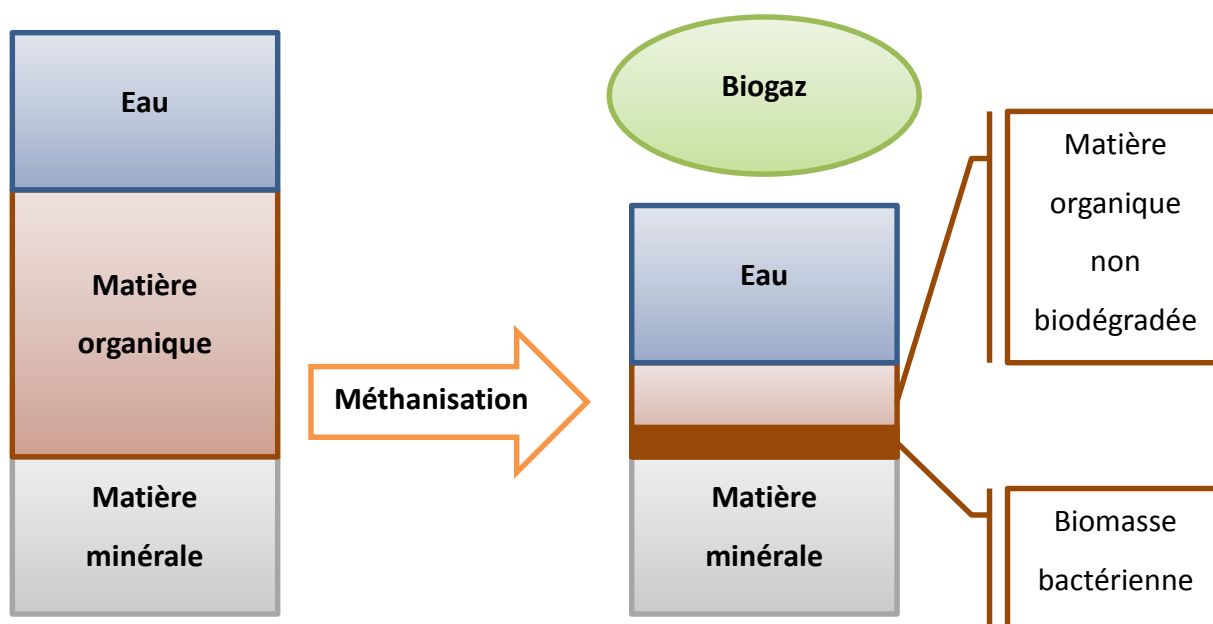


Figure 5 : Principe de la méthanisation

2. Le développement de la méthanisation en France

C'est à la suite de la première crise pétrolière (durant les années 1970) que la méthanisation connaît son premier développement important, en raison de son intérêt financier. Puis, cette méthode a été jugée trop coûteuse pour la production d'énergie, mais est conservée pour le traitement des eaux usées résiduaires, urbaines et industrielles car elle permet un meilleur rendement de traitement que le traitement par boue activée.

Initialement, le biogaz produit dans les unités de traitement des eaux usées était simplement brûlé comme un déchet. Dans le contexte de crise énergétique actuel et de

protection de l'environnement, ce biogaz est valorisé sous forme d'énergie. Des unités dont le but premier est la production d'énergie commencent à se développer en France (5 unités en 2008) et à l'étranger (Allemagne : plus de 4000 unités en 2008 avec une puissance moyenne de 500kW/unité) (Observ'ER (France) 2010).

3. La place de la méthanisation dans la protection de l'environnement

a) Les débouchés énergétiques de la méthanisation

Dans un contexte de réchauffement climatique et d'épuisement des ressources fossiles, il est doublement intéressant de produire des énergies renouvelables. Cela permet de diminuer le déstockage du carbone fossile majoritairement sous forme de CO₂ tout en continuant à disposer de l'énergie nécessaire à notre mode de vie actuel.

La valorisation principale du biogaz se fait sous forme d'électricité et de chaleur (en chaudière pour la production d'eau chaude et de vapeur, ou en cogénération avec la production d'électricité). Mais d'autres voies de valorisation sont possibles : la production de biocarburant et l'injection du biogaz dans le réseau de gaz de ville après épuration (Observ'ER (France) 2010).

De manière générale, la valorisation thermique du biogaz nécessite des débouchés de proximité, afin d'éviter les pertes par diffusion thermique pendant son acheminement dans les canalisations :

- usage interne : chauffage des bâtiments, déshydratation du digestat, stérilisation du compost...
- consommateurs externes au site de production : industries, réseaux de chaleur...

En générale, une partie du biogaz produit est utilisée pour maintenir les réacteurs anaérobies à la température nécessaire à la méthanisation (35-39°C ou 55-58°C) ce qui représente 15 à 30% de la production (Solagro méthanisation 2011).

Quand il n'y a pas de débouché de proximité pour la chaleur, la valorisation du biogaz nécessite l'exportation de l'énergie sur le réseau de distribution : électricité ou gaz naturel, voire la production de biocarburant.

La production d'électricité à partir de ressources renouvelables est soutenue par la loi n°2005-781 du 13 juillet 2005 qui détermine les orientations de la politique énergétique de la France. Cette loi fixe un objectif de production intérieure d'électricité d'origine renouvelable à hauteur de 21% de la consommation intérieure d'électricité totale en 2010. D'autre part,

elle a conduit à la mise en place de tarifs spécifiques pour le rachat de l'électricité d'origine renouvelable en fonction de la filière de production. Parallèlement, les premières unités d'injection de biogaz liées à la méthanisation ont été mises en service en France en 2012.

b) La méthanisation comme traitement des déchets

Les déchets qu'ils soient urbains, industriels ou agricoles peuvent être injectés dans un digesteur anaérobie à partir du moment où ils présentent une fraction importante de matière organique rapidement biodégradable. Ce choix peut être motivé par deux raisons : l'élimination d'un produit pouvant créer une pollution et la production d'énergie complémentaire à partir d'un déchet.

Outre la production d'énergie, cette solution présente les intérêts suivants :

- Produire un digestat épandable ou compostable à partir d'un déchet organique, pour l'amendement et la fertilisation des terres agricoles.
- Diminuer la masse et le volume du déchet, ce qui est intéressant s'il doit être mis en décharge ou incinéré (digestat non conforme pour épandage ou compostage).

D'autre part, le phénomène de méthanisation se produit naturellement dans les décharges. Dans ce cas, c'est un phénomène indésirable qu'il faut contrôler pour éviter la libération de méthane dans l'atmosphère : outre les risques de proximité, c'est un gaz à effet de serre ayant un potentiel de réchauffement global (PRG) de 72 au bout de 20 ans (Femenias, Gazeau, et Palat 2010). Son impact sur le réchauffement climatique est donc 72 fois supérieur à celui du CO₂.

c) La méthanisation comme traitement des eaux usées

La digestion anaérobie permet de traiter efficacement les eaux usées industrielles présentant une charge organique importante. En effet, pour un même volume et un temps de contact identique, un digesteur anaérobie permet d'éliminer dix fois plus de pollution qu'un système à boues activées (René Moletta et Verstraete 2011). Cela s'explique par la charge bactérienne plus importante dans un digesteur, mais aussi par le fait que produire un métabolite, le méthane, est moins complexe que de produire une biomasse qui doit comporter un grand nombre de molécules différentes.

D'autre part, la méthanisation présente l'intérêt de produire moins de boue que les traitements aérobies (type boues activées). On considère que lors d'un traitement aérobie,

50% de la matière organique dégradée est transformée en biomasse bactérienne, tandis que dans le cas de la méthanisation ce n'est que 5 à 10% (Bernet et Buffière 2011).

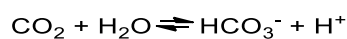
4. Les réactions biochimiques de la méthanisation

Au cours de la digestion anaérobie, les réactions enzymatiques permettent une minéralisation des molécules complexes ce qui, dans le domaine de la méthanisation, correspond à la transformation en CO_2 mais aussi en CH_4 (bien que cette molécule soit organique).

En considérant que la composition élémentaire moyenne de la biomasse est celle d'un glucide, la réaction totale peut s'écrire (Godon 2011) :



La méthanisation est associée à la libération de CO_2 qui s'explique par l'équilibre suivant :



Le bilan de la méthanisation peut donc s'écrire de la manière suivante :



Cette réaction est classiquement divisée en 4 étapes : hydrolyse, acidogénèse, acétogénèse et méthanogénèse (Garcia 1990).

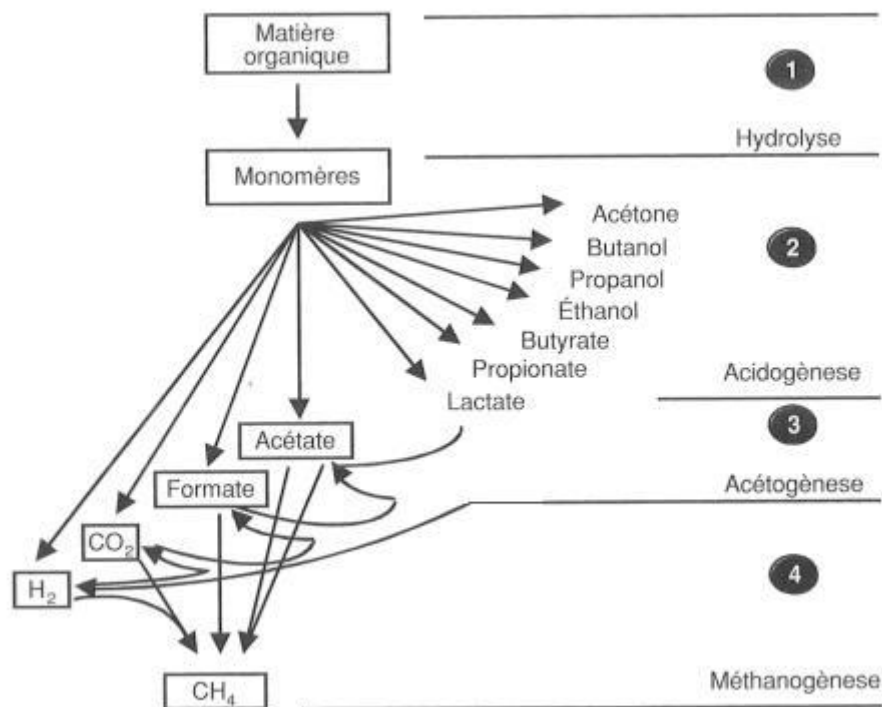


Figure 6 : Schéma des grandes étapes de la digestion anaérobie (Garcia 1990)

Durant la méthanisation, la production de CO₂ est donc inévitable. La qualité du biogaz (concentration en CH₄, CO₂ et autres gaz en faible quantité tel que H₂S) sera dépendante de la composition élémentaire de la biomasse transformée, mais aussi de l'activité des archées participant à la méthanogénèse.

a) L'hydrolyse

Les polymères de poids moléculaire élevé (polysaccharides, lipides, protéines, acides nucléiques, ...) sont hydrolysés en monomères (monosaccharides, acides gras, acides aminés et bases azotées). Cette étape est généralement lente, par rapport à l'acidogénèse qui est 30 à 40 fois plus rapide (R. Moletta 1993).

b) L'acidogénèse

Les monomères sont transformés en acides gras volatils (les plus courants sont les acides acétique, propionique, butyrique et valérique), en alcool, en acide organique (ex : acide lactique) et en H₂ et CO₂ (Guillou et Moletta 2011).

c) L'acétogénèse

Les composés issus de l'acidogénèse sont transformés en précurseurs directs du méthane durant cette étape. Ces précurseurs sont : l'acétate, le dihydrogène et le dioxyde de carbone.

Deux voies sont connues pour l'acétogénèse :

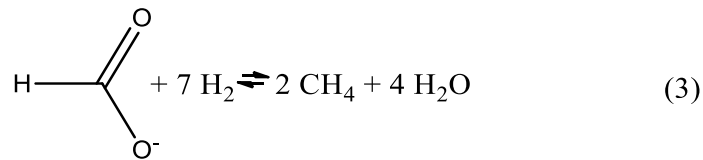
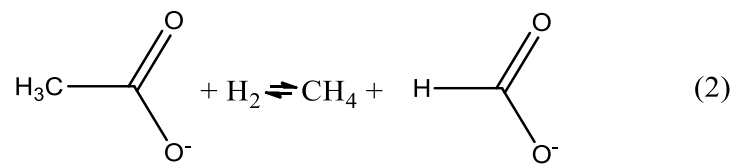
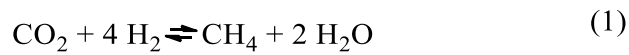
- la voie hétérofermentaire conduit à la production d'H₂, de CO₂ et d'acides tels que le pyruvate, le butyrate et le propionate (Zeikus 1982).
- la voie homoacétogène produit exclusivement de l'acétate à partir de molécules organiques ou à partir des produits finaux de fermentation (formate et H₂) pour réduire le CO₂ en acétate (Tholen et Brune 1999).

Dans les deux cas, la thermodynamique des réactions est défavorable à l'acétogénèse, dans les conditions standards de pression et concentration (concentration des réactifs = 1 mol/L et pression des gaz = 1 atm). Les réactions ne deviennent possible qu'avec une pression partielle en H₂ très faible (de l'ordre de 10⁻⁴ à 10⁻⁶ atm) (W. M. Wu, Hickey, et Zeikus 1991)(Peinemann et al. 1988). Il faut donc qu'il y ait une élimination constante de l'hydrogène. Cette élimination a lieu durant l'étape de méthanogénèse permettant ainsi de déplacer tous les équilibres dans le sens direct.

d) La méthanogénèse

Lors de cette dernière étape, les produits de l'acétogénèse (en majorité acétate, formate, H₂ et CO₂) sont transformés en méthane (Godon 2011). Trois réactions sont majoritaires :

- la transformation du dioxyde de carbone et de l'hydrogène en méthane et eau (1)
- la transformation de l'acétate et de l'hydrogène en méthane et formate (2)
- la transformation du formate et de l'hydrogène en méthane et eau (3)



La méthanogenèse peut également se faire à partir d'autres métabolites tels que le méthanol ou les méthylamines.

5. L'écologie de la méthanisation

Dans l'approche classique, d'après les travaux de Pasteur et de Koch, les micro-organismes sont mis en culture puis isolés. Les capacités métaboliques de chaque micro-organisme sont ensuite mises en évidence.

Les difficultés de cette méthode sont l'identification des micro-organismes et la faible fraction de micro-organisme cultivable (environ 1%) (Amann, Ludwig, et Schleifer 1995). Un ensemble de bactéries et archées est quand même associable à chaque étape de la méthanisation.

a) L'hydrolyse et l'acidogénèse

Les bactéries participant à l'étape d'hydrolyse sont anaérobies strictes ou facultatives. Elles forment un ensemble phylogénique hétérogène (J. O. McInerney et al. 1995).

Tableau 3 : Bactéries hydrolytiques de la méthanisation selon (Godon 2011)

Substrat	Espèce	
Conditions mésophiles		
Cellulose	Acetivibrio cellulolyticus Bacteroides succinogenes Butyrivibrio fibrisolvens Ruminococcus albus Clostridium aldrichii Clostridium cellulobioparum Clostridium cellulolyticum Clostridium chartatabidum Clostridium lochheadii Clostridium longisporum Clostridium paradoxum Clostridium populefi	Acetivibrio cellulosolvens Bacteroides cellulosolvens Cillobacterium cellulosolvens Ruminococcus flavifaciens Clostridium celerecerscens Clostridium cellulofementens Clostridium cellulovorans Clostridium josui Clostridium lernyocellum Clostridium papyrosolvens Clostridium polysaccharolyticum Clostridium termitidis
Hémicelluloses	Bacteroides ruminicola	
Pectines	Clostridium butyricum Clostridium multifermentans	Clostridium felsineum Lachnospira multiparus
Amidon	Bacillus spp. Clostridium butyricum Lactobacillus spp. Pseudomonas spp,	Bacteroides spp, Clostridium spp. Micrococcus spp. Succinamonas amyolytica
Lipides	Anaerovibrio lipolytica Syntrophomonas spp.	Bacillus spp.
Protéines	Bacillus spp. Clostridium spp. Staphylococcus spp,	Bifidobacterium spp. Peptococcus anaerobius
Composés azotés	Clostridium acidurici Micrococcus aerogenes	Clostridium cylindrospermum Micrococcus lactilyticus
Conditions thermophiles		
Cellulose	Anaerocellum thermophilum Clostridium stercorarium Clostridium thermocopriae	Clostridium cellulosi Clostridium thermocellum Clostridium thermopapyrolyticum
Hémicelluloses	Clostridium thermobutyricum Clostridium thermocopriae	Clostridium thermocellum
Pectines	Acetomicrobium faecalis Clostridium thermohydrosulfuricum Clostridium thermosaccharolyticum	Clostridium thermocellum Clostridium thermolacticum Clostridium thermosulfurogenes
Amidon	Acetomicrobium flavidum Clostridium stercorarium Clostridium thermocopriae Clostridium thermolacticum Clostridium thermosaccharolyticum Thermoanaerobacter finnii Thermoanaerobacter acetoethylicus	Clostridium fervidus Clostridium thermobutyricum Clostridium thermohydrosulfuricum Clostridium thermopalmarium Thermoanaerobacter ethanolicus Thermoanaerobacter brockii
Protéines	Coprothermobacter proteolyticus	

Comme on peut le voir dans ce tableau (Tableau 3), les bactéries impliquées sont très nombreuses et peuvent se développer à des températures variées (thermophiles ou mésophiles). D'autre part la liste des substrats hydrolysables n'est pas exhaustive.

La vitesse de croissance de ces bactéries est assez rapide avec un temps de doublement des micro-organismes de quelques heures. Par contre, l'hydrolyse de la matière solide, comme la lignocellulose, est souvent l'étape limitante de la méthanisation (Godon 2011).

Les bactéries du genre *Clostridium* constituent la plupart du temps une fraction importante des bactéries acidogène, fonctionnant en symbiose avec d'autres genres bactériens (Tableau 4). La cinétique de l'acidogénèse est généralement plus élevée que celle des autres étapes où les micro-organismes ont un temps de régénération plus long. En cas de surcharge de substrat facilement hydrolysable, il y a donc une accumulation d'intermédiaires de réaction (en particulier hydrogène et acétate). Or ces métabolites ont une action inhibitrice sur les micro-organismes acétogènes et méthanogènes ce qui peut entraîner l'arrêt de la digestion anaérobie (Thiele et al. 1990).

Tableau 4 : Bactéries acidogènes de la méthanisation en conditions mésophiles (Godon 2011)

Métabolites	Espèces	
Acétate	Acetivibrio spp. Acetoanaerobium noterae Acetofilamentum rigidum Aacidaminobacter hydrogenoformans Clostridium aciidiurici Clostridium formicoaceticum Clostridium magnum Eubacterium limosum Peptococcus glycinophilus Syntrophococcus sucormutans	Acetobacterium spp. Acetobacterium flavidum Acetobacterium ruminis Clostridium aceticum Clostridium Ijungdahlii Clostridium mayombei Pelobacter spp. Sporomusa spp.
Acétate, butyrate	Acidaminococcus fermentans Butyribacterium methylotrophicum	Eubacterium spp.
Acétate, butyrate, éthanol	Clostridium spp.	
Acétate, propionate	Anaerovibrio lypolytica Propionibacterium spp. Selenomonas ruminantium	Anaerovibrio glycerini Propionispira arboris Veillonella spp.
Acétate, éthanol, lactate	Lachnospira multiparus	Lactobacillus spp,
Acétate, lactate	Bifidobacterium spp.	
Acétate, lactate, formate	Ruminococcus spp.	
Lactate	Lactobacillus spp. Streptococcus spp.	Leptotrichfa buccalis
Succinate	Anaerobiospirillum succiniciproducens Succinivibrio dextrinosolvans	Succinomonas amylolyrica
Butyrate	Butyrvibrio spp. Roseburia cecicola	Fusobacterium spp.
Acétate, propionate, butyrate, ibut., valérate, ival., caproate		Megasphaera elsdenii

b) L'acétogénèse

Dans l'étape d'acétogénèse, les intermédiaires sont transformés en acétate, H₂ et CO₂ grâce à trois groupes de bactéries. Il y a les acétogènes productrices obligées d'hydrogène (ou OHPA pour Obligate Hydrogen Producing Acetogenic bacteria), les bactéries homoacétogènes et des bactéries sulfato-réductrices.

Les OHPA (Tableau 5) sont des bactéries syntrophiques obligées. En effet, leur croissance n'est possible qu'avec une très faible pression partielle en H₂, cela implique donc la présence d'autres bactéries le consommant (Godon 2011), les méthanogènes et les sulfato-réductrices jouent ce rôle. D'autre part, les OHPA ont un temps de croissance assez lent. En effet le doublement de la population bactérienne nécessite 1 à 7,5j (M. J. McInerney, Mackie, et Bryant 1981).

Tableau 5 : Bactéries syntrophiques OHPA (Godon 2011)

Bactéries	Réactions	$\Delta G'^0$ (KJ par réaction)
Organisme « S » (Pelobacter sp.)	Ethanol + H ₂ O → acétate + 2H ₂	+ 9,6
Syntrophobacter - wolinii - pfennigii	Propionate + 3H ₂ O → acétate + 3 H ₂ + CO ₂	+ 76,1
Syntrophomonas - sapovorans - wolfei sub.sp. saponavida - wolfei sub.sp. wolfei	du butyrate (C4) au Laurate (C12) du butyrate (C4) au Laurate (C12) du butyrate (C4) au Caprylate (C8)	
Syntrophospora bryantii	du butyrate (C4) au Caprate (C10) Butyrate + 2H ₂ O → 2 acétate + 2H ₂	+ 48,1
Syntrophococcus sucromutans	Fructose + H ₂ O → H ₂ + CO ₂	
Syntrophus - buswelli - gentianae	Benzoate + 7H ₂ O → 3 acétate + 3H ₂ + CO ₂	+ 53,0
Syntrophobotulus glycolicus	Glycolate → glyoxylate + H ₂	+ 38,0
Thermosyntropha lipolytica	du Butyrate (C4) aux Oléate, Linoléate, Stéarate (C18)	
Clostridium ultunense Eubacterium sp.	Acétate + H ₂ O → H ₂ + CO ₂	

Les bactéries homoacétogènes (Tableau 6) productrices d'acétate peuvent synthétiser l'acétate à partir de deux sources. L'acétate peut provenir soit de la fermentation d'un substrat carboné, soit de la réduction du CO₂ par le H₂. En consommant l'hydrogène, les bactéries homoacétogènes contribuent au maintien de la pression partielle en hydrogène basse (Godon 2011).

Tableau 6 : Bactéries homoacétogènes de la méthanisation (Godon 2011)

Réactions	Bactéries	
Fermentation du substrat → acétate	<i>Butyribacterium rettgeri</i> <i>Butyribacterium acidurici</i> <i>Butyribacterium cylindrospermum</i> <i>Butyribacterium formicoaceticum</i>	<i>Butyribacterium magnum</i> <i>Butyribacterium thermoaceticum</i> <i>Peptococcus glycinophilus</i>
H ₂ + CO ₂ ou H ⁺ + CO ₂ → acétate	<i>Acetoanaerobium noterae</i> <i>Acetobacterium carbinolicum</i> <i>Acetobacterium malicum</i> <i>Acetobacterium termitida</i> <i>Acetobacterium wieringae</i> <i>Acetobacterium woodi</i> <i>Acetofilamentum rigidum</i> <i>Acetohalobium arabaticum</i> <i>Acetomicrobium flavidum</i> <i>Acetothermus paucivorans</i> <i>Acetitomaculum ruminis</i>	<i>Clostridium aceticum</i> <i>Clostridium ljungdahlii</i> <i>Clostridium mayombei</i> <i>Clostridium thermoautotrophicum</i> <i>Eubacterium limosum</i> <i>Sporomusa acidovorans</i> <i>Sporomusa malonica</i> <i>Sporomusa ovata</i> <i>Sporomusa paucivorans</i> <i>Sporomusa sphaeroides</i> <i>Sporomusa termitida</i> <i>Thermoanaerobacter kivui</i>

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) utilisent comme accepteur final d'électrons le sulfate qu'elles réduisent en sulfure (S²⁻), ainsi que le sulfite (SO₃²⁻) et le thiosulfate (S₂O₃²⁻) également réduits en sulfure. Les BSR peuvent utiliser les mêmes substrats que les méthanogènes et entrent en concurrence avec ces derniers. Le sulfure d'hydrogène (H₂S) produit au cours du métabolisme des BSR, a de plus un effet inhibiteur sur les organismes méthanogènes. Enfin l'H₂S peut entraîner la précipitation des métaux nécessaire au bon fonctionnement des bactéries méthanogènes (Gujer et Zehnder 1983).

c) La méthanogénèse

Au cours de cette dernière étape, les produits de l'acétogénèse sont transformés en méthane par des micro-organismes anaérobies stricts du domaine des *Archaea*. Ils utilisent en majorité l'acétate, le formate, le CO₂ et l'hydrogène comme substrat pour produire du

méthane. Ainsi ils dépendent entièrement des autres groupes microbiens qui le leur fournissent.

La production de méthane dans un digesteur est classiquement décrite comme le résultat de deux grandes catégories d'archées méthanogènes : les méthanogènes hydrogénotrophes et les méthanogènes acétoclastoclastiques. Ces dernières produisent en moyenne 60% du méthane dans les digesteurs anaérobies.

La croissance des méthanogènes se situe entre celle des acidogènes et celle des acétogènes. Leur temps de doublement est effectivement compris entre 3,4 et 7 jours (Gujer et Zehnder 1983).

La grande variété des microorganismes présents au cours des différentes étapes de la méthanisation, permet une adaptabilité accrue du digestat aux différents substrats qui pourraient l'alimenter. Cependant, un temps d'adaptation important peut être nécessaire, si l'alimentation du digesteur anaérobie change trop brutalement.

6. Le bilan de la méthanisation

a) Les substrats méthanisables

La méthanisation permet de transformer la matière organique solide ou soluble en biogaz. Cependant, tous les types de biomasse ne sont pas méthanisables de la même façon. En début de méthanisation, la matière organique fait partie d'une matrice dont les autres composants sont l'eau et les matières minérales. La quantité de matière organique présente dans la biomasse a donc une influence sur la méthanisation. D'autre part, certains polymères organiques sont plus lentement hydrolysés que d'autres ce qui entraîne un rendement de méthanisation moins important. Enfin en fonction des molécules organiques présentes dans la biomasse, la qualité du biogaz (taux respectifs de CH₄ et CO₂) peut varier.

Il existe actuellement trois grands gisements de production pour les substances méthanisables :

- Les décharges qui représentent 36% de la production en biogaz en Europe et 84% de la production française.
- Les stations d'épuration des eaux usées urbaines ou industrielles (13% de la production européenne et 9% de la production française)

- Les unités de méthanisation spécifiques conçues pour la valorisation énergétique (52% de la production européenne et 7% de la production française) (Observ'ER France 2010)

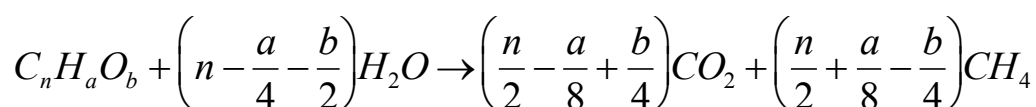
Les unités de méthanisation spécifiques comprennent les unités de méthanisation agricoles qui valorisent le plus souvent les lisiers, les résidus agricoles et les cultures énergétiques ; les unités de méthanisation des déchets de l'industrie agro-alimentaire ainsi que les unités de méthanisation des déchets solides spécialisées dans le traitement des déchets ménagers et des déchets verts. Ces limites ne sont pas strictes, certaines unités de méthanisation spécifiques traitant différents types de déchets.

b) Prévion de la qualité du biogaz

Au cours de la méthanisation toute la matière organique n'est pas forcément convertie en biogaz et le rendement d'un substrat vis à vis de la méthanisation doit être mesuré. Un rendement de 100% correspond à une biomasse totalement transformée en biogaz.

Pour évaluer le rendement il faut donc évaluer la quantité de biogaz qui peut être théoriquement produite. Pour cela la formule empirique de Buswell est classiquement utilisée :

Équation 1 : formule de Buswell (René Moletta et Verstraete 2011)



Pendant, cette formule ne prend pas en compte le caractère méthanisable de la biomasse ni sa cinétique de méthanisation. Par conséquent il est nécessaire d'associer à ce calcul une mesure de production réelle de biogaz et méthane ou test de potentiel méthanogène (TPM). Cette mesure permet d'approcher la cinétique et la production de biogaz au bout d'un temps donné, dans les conditions physico-chimiques optimales à la méthanisation. Le potentiel méthanogène réel et le rendement réel de la méthanisation d'un substrat peuvent alors être calculés.

7. La méthanisation des résidus de cultures

Les résidus de cultures représentent la partie non utilisée des plantes après leur récolte : les pailles de céréales et autres cultures (tournesols, colza) des tiges de maïs, des feuilles etc. Ces résidus sont souvent laissés au champ en temps qu'amendement organique, mais cette tendance tend à s'inverser. En effet ces résidus ont souvent une forte teneur en

polysaccharides (voir paragraphe C.3) qui sont des substances méthanisables. Généralement les résidus de cultures sont mélangés à du lisier pour favoriser la méthanisation. Même si le lisier a un potentiel méthanogène assez faible (Tableau 7), il permet un pré-ensemencement bactérien et l’humidification des résidus de culture (Tableau 8).

En plus de l’intérêt lié à la production d’énergie à partir d’un coproduit agricole peu valorisé, la méthanisation des résidus de culture permet d’éviter le développement de mycotoxines liées à leur enfouissement. D’autre part, si le digestat sortant du réacteur anaérobie est de nouveau épandu aux champs, l’amendement organique est conservé, voire de meilleure qualité que lors de l’enfouissement des résidus de culture. L’hygiénisation du substrat liée à la méthanisation, ainsi que la minéralisation de la matière organique au cours du processus (le taux d’ammoniaque augmente) (Berger et Couturier 2011) sont les causes de l’amélioration du digestat.

Tableau 7 : Potentiel méthanogènes, matière sèche (MS) et matière sèche volatile (MSV) de différentes biomasses agricoles (Berger et Couturier 2011)

		MS (%)	MSV (%)	m ³ CH ₄ /m ³ substrat
Déjections animales	Lisier Bovin	8	81	20
	Fumier Bovin	16	88	38
	Fumier Taurillon	22	88	52
	Lisier Porcin	4	80	8
	Fientes Volailles	65	79	138
	Fumiers Caprin/Ovin	50	78	86
Cultures	Paille	85	80	131
	Ensilage maïs, triticales)	30	80	65
Biodéchets	Céréales grains	46	95	136
	Déchets	40	75	59
	Boues	15	75	25
	Graisses	50	100	190
	Marc de raisin	20	75	40
	Déchets de conserverie	8	90	22

Une autre forme de biomasse semblable aux résidus de culture est celle venant des cultures à but énergétique (maïs, betterave, sorgho, ...). Même si la politique d'aide ne les favorise pas en France, d'autres pays comme l'Allemagne ont décidé de les soutenir financièrement. Enfin il faut noter la disponibilité d'une forme de biomasse semblable aux résidus de culture dans les litières animales, elle est généralement constituée de paille souillée par les déjections animales.

Tableau 8 : Potentiel énergétique (obtenu par méthanisation) et production de matière organique (MO) lié à la biomasse agricole française (Berger et Couturier 2011)

Substrat	Mt.MO/an	Mtep/an
Déjections animales + paille litière	22	6
Résidus de culture	36	9
Total gisement agricole	58	15

Par contre les déchets ligneux (présentant cependant une fraction cellulosique et hémicellulosique non négligeable), type bois et branchage, sont très difficilement méthanisables en l'état du fait de leur taux de lignine important (Nakamura et Mtui 2003; Mohsenzadeh et al. 2012).

C. La paille de blé

La paille de blé est une biomasse représentative des résidus de culture méthanisables de type paille. Le blé (*Triticum aestivum*) cultivé dans plus de 115 pays sous des conditions très variables, est l'une des cultures mondiales la plus importante. En effet en 2011 la surface mondiale cultivée s'élevait à 225 millions d'hectares, pour une production de 702 Mt de blé (Food and Agricultural Organisation 2013).

En considérant qu'environ 1,3 tonnes de paille sont produites par tonne de blé récoltée, ce sont environ 890 millions de tonnes de pailles de blé qui sont produites tous les ans dans le monde (Talebna, Karakashev, et Angelidaki 2010). Cette paille, souvent laissée au champ ou ramassée et utilisée comme litière animale, peut aussi être valorisée sous forme de biocarburant par des usages énergétiques (brûlée comme biomasse énergie, pyrolysée pour la production d'huile de pyrolyse, transformée en bioéthanol ou en biogaz ...).

En France, sa production représente environ un tiers des biomasses agricoles résiduelles (tableau de la Figure 7) et plus de la moitié des productions de paille (Tableau 9). De plus la paille se présente comme un des substrats ayant un fort potentiel de méthanisation (Tableau 7) parmi les substrats d'origine agricole.

Tableau 9 : Production française en résidus de culture (Berger & Couturier 2011)

Résidus (paille, tige, ...)	Mt.MO
Blé	20
Seigle, orge, triticale, avoine	7
Maïs	5
Colza, tournesol	4
Sorgho, soja	0
Total	36

En se basant sur différentes mesures (Tableau 10), une variation du rendement de méthanisation de la paille de blé, en fonction de la température de méthanisation, est observée. La production de méthane à partir de paille est située entre 180 et 250 Nm³CH₄/t MSV et sa cinétique est relativement lente puisqu'il faut 13 jours pour atteindre 80% de la production finale mesurée.

Tableau 10 : Production de méthane de la paille de blé selon différentes sources

Source	T° du milieu	Résultats
(Wang et al. 2009)	55°C	250 Nm ³ CH ₄ /t MS
(Amon et al. 2007)	39°C	189 Nm ³ CH ₄ /t MSV
TPM à l'APESA	39°C	197 Nm ³ CH ₄ /t MSV

1. La ressource en paille de blé

Vis à vis du gisement de paille, il faut distinguer la quantité de paille brute, située sous l'épi de céréale, de la quantité de paille nette, utilisable pour l'industrie. En effet, lors de la récolte, il faut laisser une partie de la paille à la terre afin de conserver la qualité agronomique des sols. D'autre part, une partie de la paille n'est pas récoltable du fait de la géomorphologie des sols et du système de récolte (ADEME 1998).

L'étude REGIX a mesuré la production des pailles de différentes céréales en France entre 2005 et 2009, elle atteint un total de 28,58 millions de tonnes par an. A cela il faut retrancher la paille restituée au sol (12,48 Mt/an) et la consommation pour l'élevage (12,45 Mt/an). Le gisement potentiel en paille, pour une utilisation non agronomique (Figure 7) s'établit donc à 3,35 Mt/an (GIE ARVALIS/ONIDOL 2009).

En considérant les productions de méthane potentielles, mesurées par TPM sur la paille, et le gisement de paille pour une utilisation non agronomique, une première approximation du potentiel français de la méthanisation est possible. En tenant compte du pouvoir calorifique inférieur (PCI) du méthane, c'est 0,5 à 0,7 Mtep qui pourrait être produit tous les ans. Ce chiffre n'est bien sûr qu'une première approximation, puisqu'il ne tient pas compte du transport de la biomasse ni de l'énergie dépensée pour le fonctionnement des digesteurs anaérobies. Ils prouvent cependant que le potentiel de la paille non utilisée, en termes de production de méthane, est supérieur à la production de gaz d'origine fossile en France en 2012 (0,4 Mtep). Par contre, ce chiffre ne correspond qu'à 2% de la consommation française, l'association de différents substrats sera donc nécessaire pour prétendre à une indépendance énergétique pour le méthane.

Dans une optique d'utilisation de la paille à des fins énergétiques, il faut aussi s'intéresser à la répartition de la ressource en France. En effet, pour que le bilan énergétique soit positif, il faut diminuer au maximum le transport de la biomasse. Ce qui conduit à une répartition très inégale de la ressource.

Si ce phénomène s'explique par une répartition inégale des bassins céréaliers, il est amplifié par une répartition différente des zones d'élevage. Ainsi, dans certaines zones (en particulier le bassin parisien) où la production céréalière est intense et où l'élevage est faible, la paille non utilisée est abandonnée sur les champs sans véritable but agricole. La paille exportable, n'étant pas réellement exploitée sur le plan agricole, est donc disponible pour une utilisation industrielle et en particulier pour la production de biogaz.

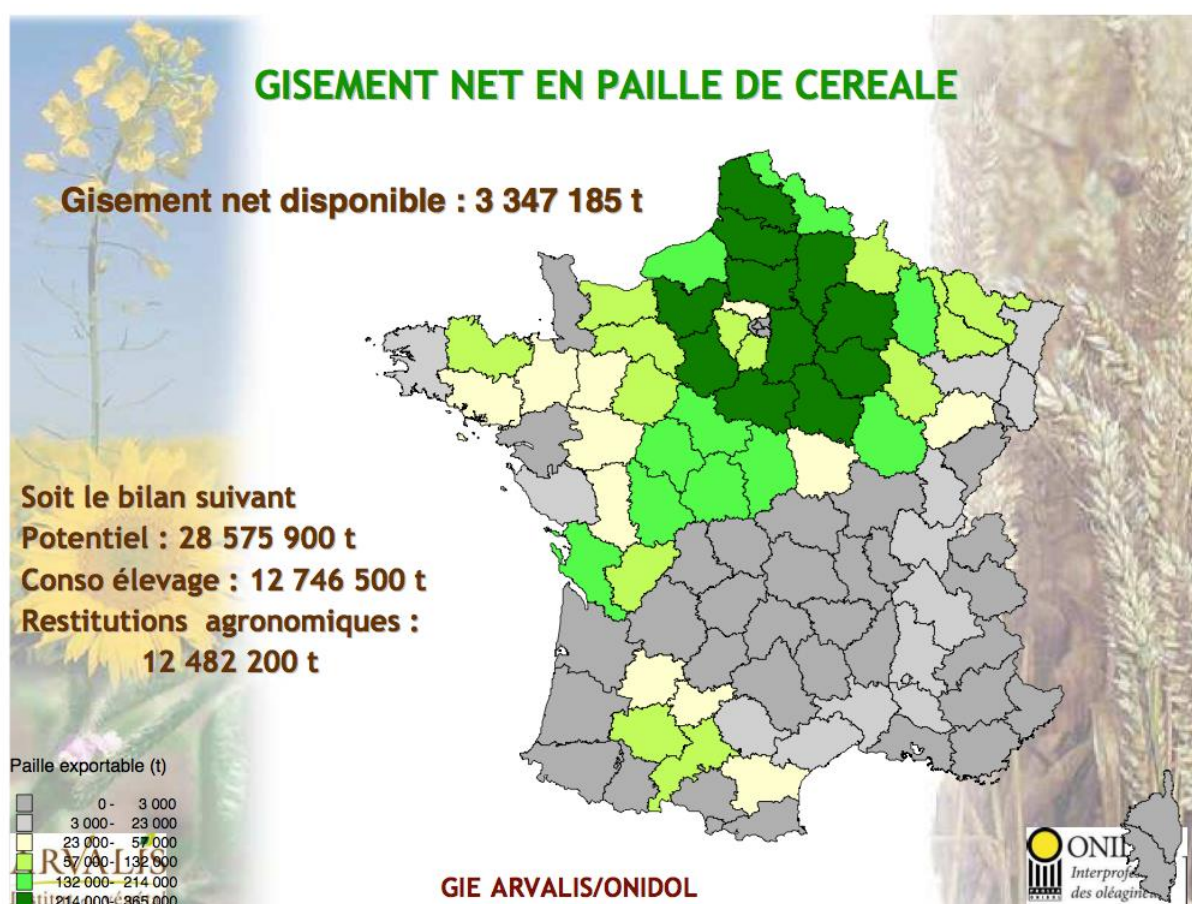


Figure 7 : Quantité de paille de blé disponible en France et par région pour un usage non agricole (GIE ARVALIS/ONIDOL 2009)

2. Organisation structurale de la biomasse lignocellulosique

Les plantes, comme tout organisme pluricellulaire, sont constituées de tissus structurés ayant des fonctions plus ou moins spécifiques (feuilles, tige, racines, organes de réserve, ...). Nous ne développerons pas l'organisation fonctionnelle de la plante dans ce texte. Par contre une description de la structure propre des tissus composant les organismes lignocellulosiques est nécessaire pour comprendre les freins à leur méthanisation.

Les tissus végétaux « vivants » sont constitués de cellules délimitées par des membranes cellulaires liées entre elles par des parois lignocellulosiques (ces dernières étant absentes dans les tissus d'origine animale). Ce sont ces parois qui constituent le squelette de la plante tandis que les réactions métaboliques se produiront majoritairement au sein des cellules. Il faut noter que les tissus végétaux peuvent aussi présenter des zones de « vide » dans lesquelles circulent des fluides (liquides ou gazeux) comme dans les vaisseaux ou le parenchyme lacuneux (Reece et Campbell 2012) (Figure 8).

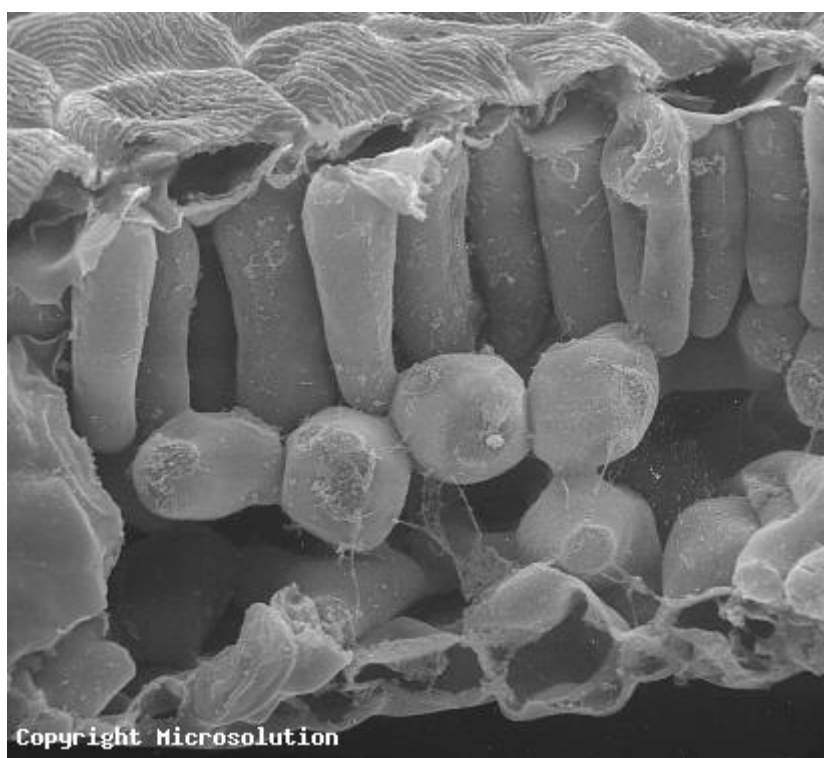


Figure 8 : Photo au microscope électronique à balayage d'une coupe transversale de feuille ; l'épiderme, le parenchyme palissadique et le parenchyme lacunaire apparaissent de haut en bas (Microsolution 2013).

Ces parois sont elles-mêmes des milieux organisés en différentes zones. La lamelle moyenne, mise en place en premier par les cellules correspond au centre de la paroi cellulaire entre deux cellules (Figure 9). La paroi primaire, assez souple, permet la croissance des

cellules. Dans un second temps, la paroi secondaire apparaît, celle ci est plus épaisse et rigide et assure la cohésion et le port du végétal.

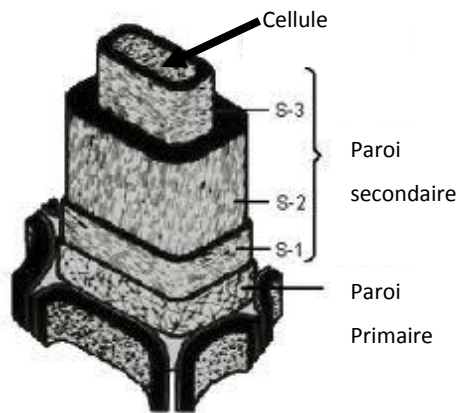


Figure 9 : Organisation structurale de la paroi lignocellulosique dans un tissu végétal (Xu 2010)

3. Les polymères de la matrice lignocellulosique

Les parois cellulaires de la paille sont des milieux fibreux fortement structurés. Elles sont constituées d'un assemblage de fibres de cellulose dont la cohésion est assurée par un ciment organique : la lignine. Le troisième constituant principal de la paroi est un polysaccharide ramifié : les hémicelluloses. Elles présentent des interactions avec la cellulose et la lignine (type liaisons hydrogène et forces de Van der Waals) ainsi que des liaisons covalentes avec la lignine (Ren et Sun 2010) et sont souvent considérées comme agent comptabilisant entre la cellulose et la lignine.

Enfin les composants non structuraux de la paille sont nommés extractibles. Ils correspondent aux contenus cellulaires et membranaires ainsi qu'à des composés organiques de faible masse moléculaire comme les cires et les résines (P. Peng, Bian, et Sun 2010). D'autre part, une portion non négligeable de composés non organiques tels que la silice, est présente dans la paille.

Tableau 11 : Composition de différente paille de blé selon la méthode Van Soest

Source	(Klinke et al. 2002)	(Jackson 1977)	(Sarwar et al. 2006)	(Chaudhry et Miller 1996)	Taux moyens
Cendres (% /MS)	7,8	Silice = 6	9,15	4,4	6,8 ± 2,4
Extractibles (% /MS)	17,9	Contenu cellulaire = 20%	14,9 (NDF = 85,1%)	20,5	18,3 ± 3,4
Cellulose (% /MS)	36,3	39		44,1	39,8 ± 4,3
Hémicelluloses (% /MS)	30,9	36	33,9 (ADF = 51,21%)	29,6	32,6 ± 3,4
Lignine (% /MS)	7,1	10		8,5	8,5 ± 1,5
Méthode	Van Soest modifiée *	Van Soest modifiée *	ADF NDF	Van Soest	

* : Oxydation de la lignine par $KMnO_4$ remplaçant l'hydrolyse de la cellulose par H_2SO_4

Il faut noter que la composition de la paille varie en fonction de l'espèce mais aussi de la période de récolte, ce qui explique de fortes variations sur les teneurs de chaque fraction (Tableau 11).

a) La cellulose

La cellulose est le polymère naturel le plus abondant sur terre, en effet elle représente 50% de la biomasse. La quantité de cellulose produite par la biomasse par an est de l'ordre de 1500 milliards de tonnes (Liu et Sun 2010).

Elle se trouve en majorité dans les parois cellulaires de végétaux supérieurs et des algues et forme des fibres qui constituent le squelette des parois primaires et secondaires des cellules végétales. De manière plus anecdotique, on la trouve dans la paroi de certaines bactéries et même dans la carapace de certains animaux (Reece et Campbell 2012).

La cellulose présente un degré de polymérisation de 10 000 à 14 000 monomères, mais certaines chaînes peuvent dépasser les 15 000 unités de glucose (Xu 2010). Cependant la longueur du polymère n'est pas le seul facteur jouant sur la stabilité du polymère.

(1) Aspect chimique du polymère

La cellulose est un homopolymère de D-glucopyranose. C'est à dire que c'est un polymère constitué uniquement de molécules de glucose, ou plus précisément de D-anhydroglucopyranose reliés entre eux par des liaisons β -1,4 (Ren et Sun 2010). La cellulose peut aussi être considérée comme un homopolymère de cellobiose (Figure 10).

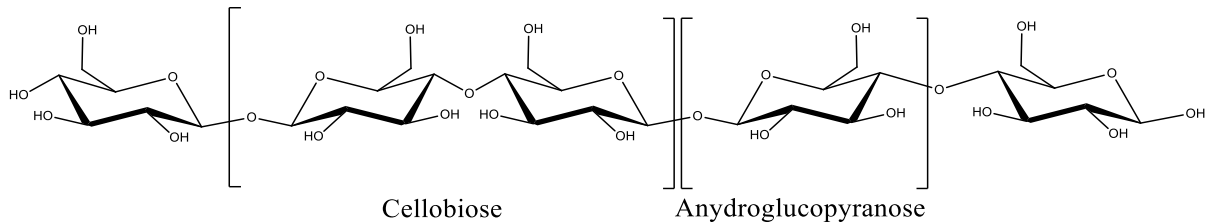


Figure 10 : Schéma d'une molécule de cellulose

Les liaisons β -1,4 associées à la conformation chaise du glucose, entraînent une organisation des groupements hydroxyle en position radiale et des hydrogènes aliphatiques en position axiale. Ainsi cette conformation favorise la formation de nombreuses liaisons hydrogène intra et intermoléculaires (Figure 11). Ces interactions au sein de la molécule (liaison intra) et entre les différentes molécules de cellulose (liaisons inter) conduisent à une grande stabilité du polymère. (Zhbankov 1992).

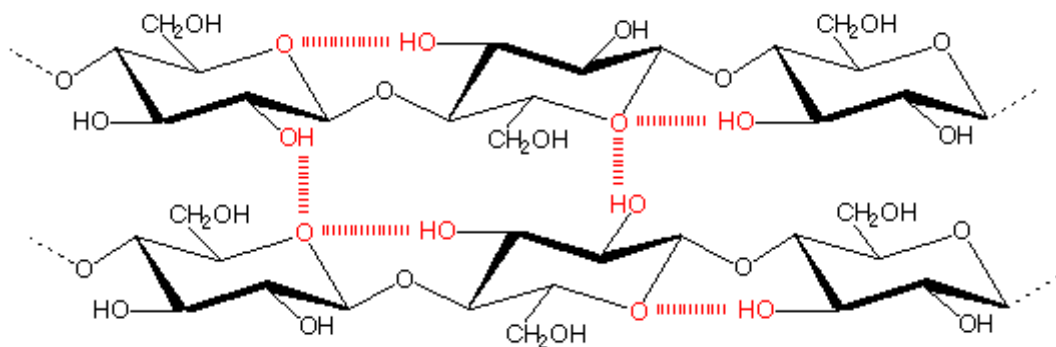


Figure 11 : Schéma de l'organisation cristalline de deux molécules de cellulose au sein d'une microfibrille

(2) Aspect cristallographique de la cellulose

Au sein d'une microfibrille, qui est l'élément constitutif de la « fibre de cellulose », les polymères sont plus ou moins organisés en zones cristallines (polymères fortement ordonnés par des liaisons hydrogène), et en zones amorphes quand les liaisons intermoléculaires ont

moins d'importance (Liu et Sun 2010). La détermination de l'indice de cristallinité qui correspond au ratio zones cristallines/zones amorphes dans la cellulose, peut se faire grâce à la diffraction aux rayons X ou la RMN ^{13}C du solide.

La forme cristalline augmente fortement la stabilité de la cellulose en augmentant sa résistance aux hydrolyses acides ou enzymatiques (Kuhad, Singh, et Eriksson 1997). La mesure de l'indice de cristallinité est donc importante pour appréhender la vitesse de dégradation anaérobie du substrat lignocellulosique.

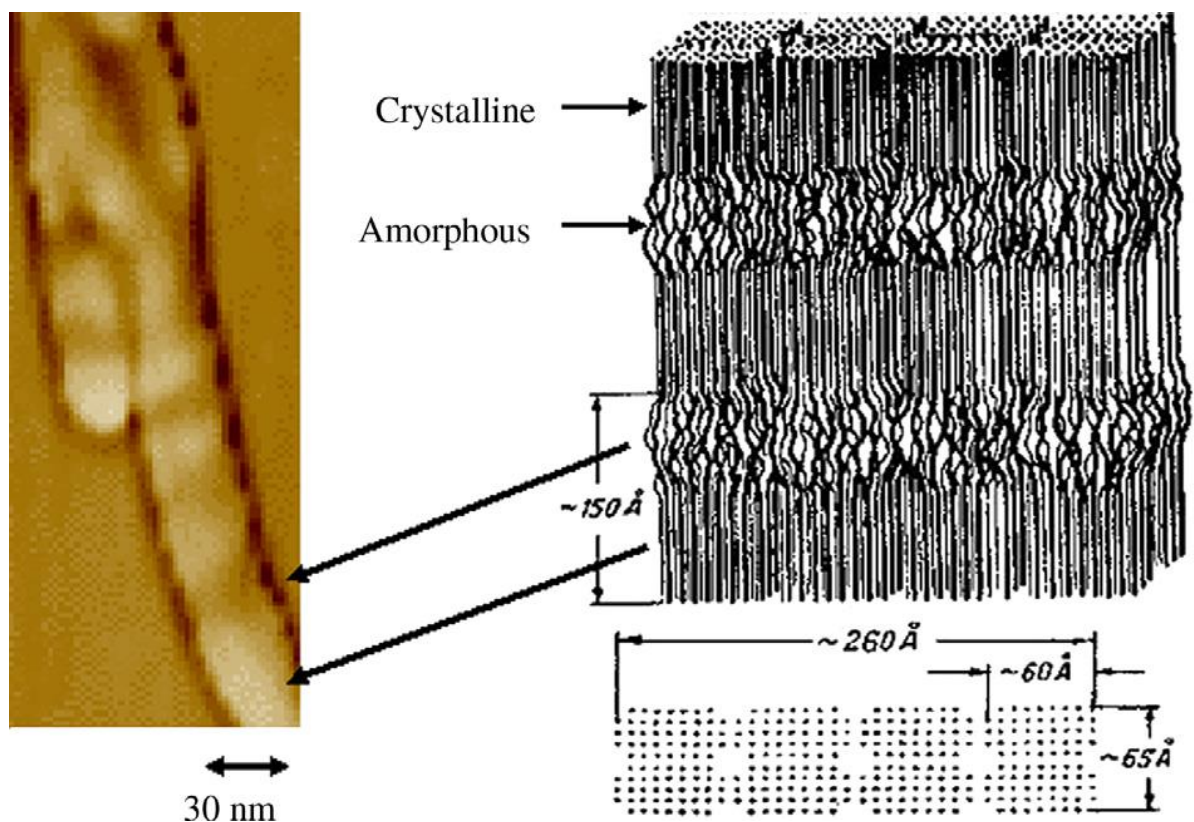


Figure 12 : Schéma d'organisation de microfibrilles de cellulose associé à une image par microscopie de force atomique (AFM) (Bhattacharya, Germinario, et Winter 2008)

(3) Un polymère difficilement hydrolysable

Pour les raisons évoquées dans le paragraphe précédent, la cellulose est un polymère difficilement attaquant. Les conditions chimiques nécessaires à sa dépolymérisation sont généralement sévères : solvant fortement protique, acides et bases fortes (Xu 2010). Néanmoins, dans la nature certains êtres vivants sont capables d'hydrolyser la cellulose grâce à un cocktail d'enzymes spécifiques. Cette hydrolyse est toutefois lente.

b) Les hémicelluloses

La famille des hémicelluloses représente le second composé en termes d'abondance dans la paille de blé (Xu 2010), et correspond à un tiers de la masse totale de la paille de blé. Les hémicelluloses ont un rôle structural dans les végétaux lignocellulosiques en tant que lien entre les différentes microfibrilles de la paroi pectocellulosique et lignocellulosique. Enfin, elles permettent de faire la liaison entre la cellulose et la lignine. Pour cela, les hémicelluloses sont capables de développer des liaisons hydrogène avec la cellulose et peuvent être liées de manière covalente à la lignine (liaisons α benzyle éther) (Fang et al. 2000; zu-shan et Paszner 1988).

(1) La chimie des hémicelluloses

Les hémicelluloses sont souvent définies comme la fraction de l'holocellulose (hémicellulose et cellulose) soluble dans la soude après en avoir enlevé les pectines (Aspinall 1959). Comme la cellulose, les hémicelluloses sont des polysaccharides, mais à la différence de celle-ci, leur hydrolyse ne libère pas uniquement du glucose mais aussi d'autres sucres : xylose, mannose, galactose, arabinose, fucose et acide glucuronique (Ren et Sun 2010). D'autre part, ce sont des polymères ramifiés à masse moléculaire plus faible que la cellulose : 80 à 200 monomères (zu-shan et Paszner 1988; Fang et al. 2000).

Les hémicelluloses sont classées en fonction du composant de leur chaîne principale :

- Xyloglycanes (ou xylanes) dont la chaîne principale est constituée de xyloses
- Mannoglycanes (ou mannanes) dont la chaîne principale est constituée de mannoses

Les ramifications peuvent être composées du même sucre que celui de la chaîne principale (homopolymère) comme dans le cas du xylane, ou d'autres sucres (hétéropolymère) comme pour le arabino(glucurono)xylane (Figure 13).

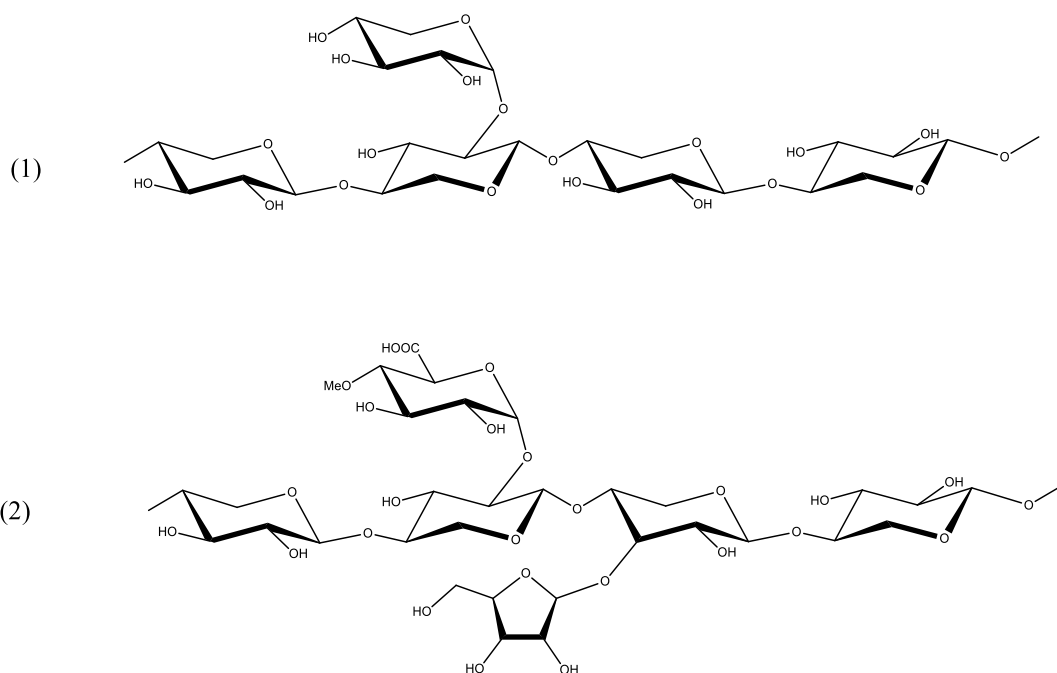


Figure 13 : Deux exemples d'hémicelluloses : le xylane (1) et l'arabino(glucurono)xylane (2)

A la différence de la cellulose, dont seul le degré de polymérisation varie d'une espèce à l'autre, les hémicelluloses ont une composition variable en fonction des espèces et type de plantes. Ainsi les hémicelluloses de feuillus sont majoritairement considérées comme des xylanes et celles de plantes annuelles comme des arabinoxylanes (Ren et Sun 2010).

(2) Les sucres constitutifs des hémicelluloses de la paille de blé

Les hémicelluloses variant d'un tissu à l'autre dans la plante, il est difficile de parler de l'hémicellulose de paille de blé. Par contre, il est possible d'hydrolyser complètement les hémicelluloses et d'analyser les sucres résultants de cette hydrolyse. Les hémicelluloses de paille de blé sont constituées majoritairement de xylose et d'arabinose (Tableau 12).

Tableau 12 : Taux des différents sucres (% relatifs) et acide uronique (%) constitutifs des hémicelluloses de paille de blé (Runcang Sun, Mark Lawther, et Banks 1998).

Sugars/uronic acid	Hemicellulose B		Cellulose	
	>300 μm TMP fiber	\leq 300 μm TMP fiber	>300 μm TMP fiber	\leq 300 μm TMP fiber
Arabinose	10.0	10.8	1.6	4.2
Xylose	83.1	82.6	1.1	1.7
Mannose	0.5	0.5	Tr ^a	Tr
Galactose	4.0	3.8	3.6	3.0
Glucose	2.4	2.3	93.7	91.0
Uronic acid	4.2	5.3	—	—

^a Traces.

(3) Aspect cristallographique des hémicelluloses

La présence de chaînes latérales sur les hémicelluloses (disposées de façon aléatoire), leur confère un caractère amorphe. Ainsi les hémicelluloses sont plus facilement hydrolysables par les réactifs chimiques et les enzymes.

Cependant, leur hydrolyse en catalyse acide peut entraîner la formation de dérivés du furfural qui sont des inhibiteurs de l'activité microbienne notamment lors de la production de bioéthanol (E Palmqvist et al. 1999). Néanmoins, il a été montré récemment par Barakat et al. (2012) que le furfural n'était pas inhibiteur de la méthanisation.

c) La lignine

(1) Aspect chimique de la lignine

La lignine est un polymère tridimensionnel, non glucidique, hydrophobe et difficilement biodégradable. De manière encore plus marquée que pour les hémicelluloses, la lignine n'a pas de structure unique chez les végétaux. De plus, sa composition varie en fonction des végétaux et de leurs familles (plantes annuelles, feuillus, résineux) mais aussi avec les conditions climatiques (température, humidité). La lignine est composée des trois unités phénoliques (Figure 14), dérivées de l'alcool cinnamique, assemblées par couplage radicalaire catalysé par des enzymes comme les laccases ou les peroxydases (Lu et Ralph 2010).

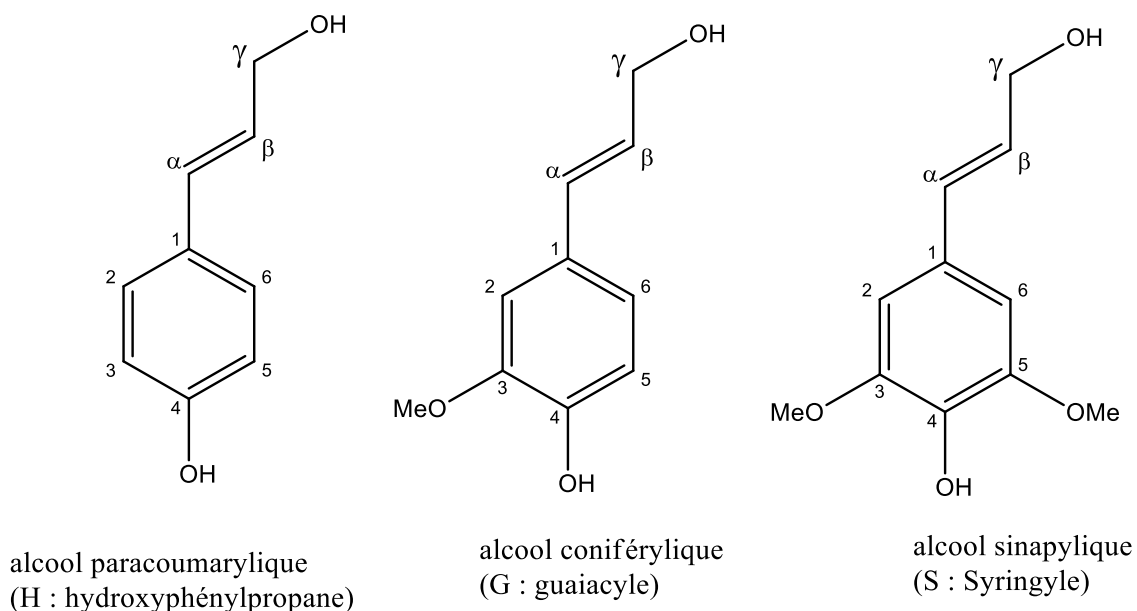


Figure 14 : Alcools phénoliques précurseurs de la lignine

Les proportions de ces trois monomères permettent de différencier la lignine de plante annuelle (GSH-lignine), de la lignine d'angiosperme (GS-lignine) et de la lignine de gymnosperme (G-lignine) (Nimz et al. 1981).

Dans la lignine de paille de blé, le taux de chaque unité phénolique, mesuré après thioacidolyse de la lignine, est le suivant (Lu et Ralph 2010) :

- H = 5%
- G = 49%
- S = 46%

La détermination des liaisons les plus courantes dans la lignine (Figure 15) a permis à Xu (2010) de proposer un modèle de lignine de paille de blé (Figure 16).

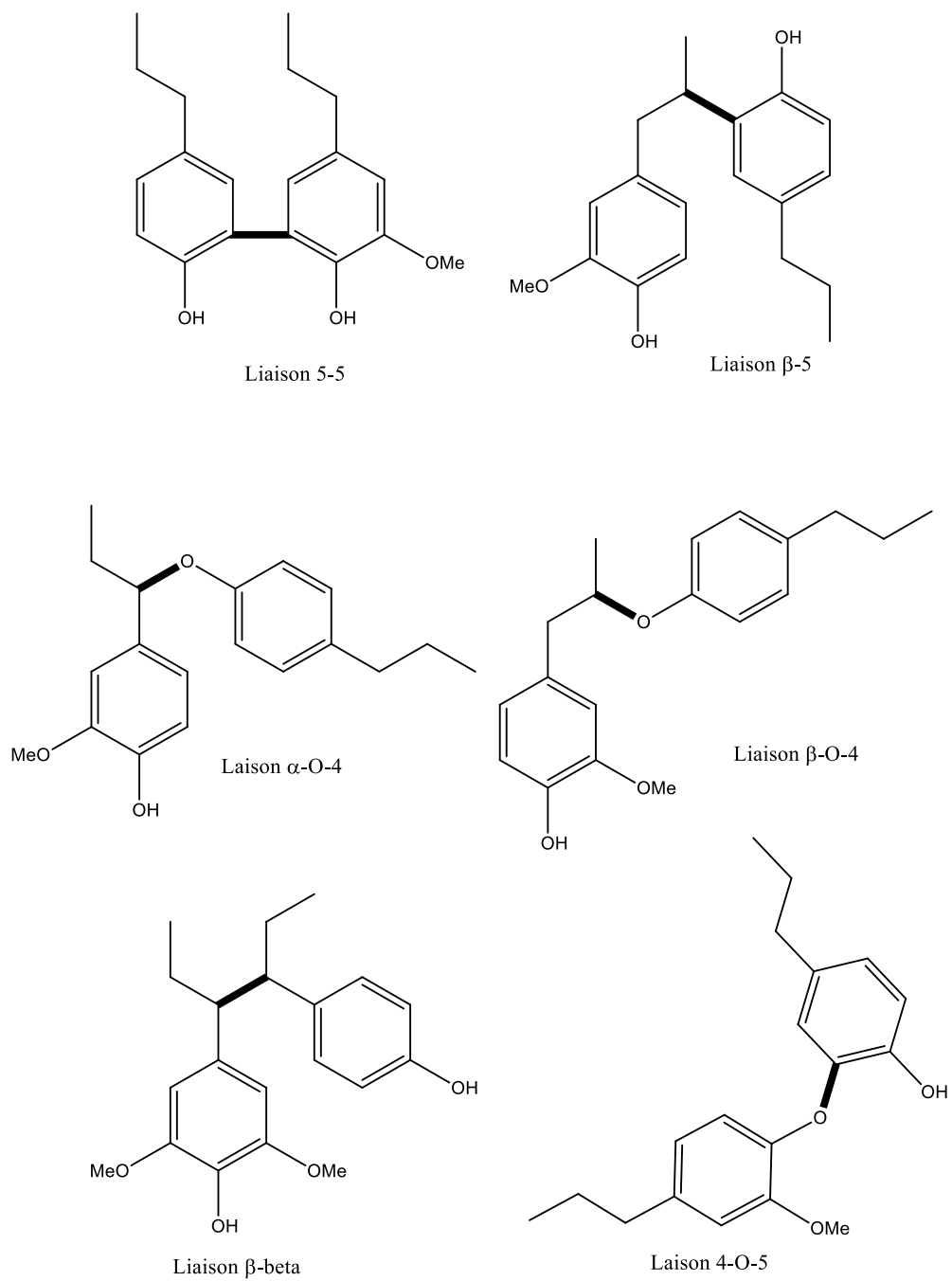


Figure 15 : Liaisons majoritaires entre les unités phénoliques au sein de la lignine

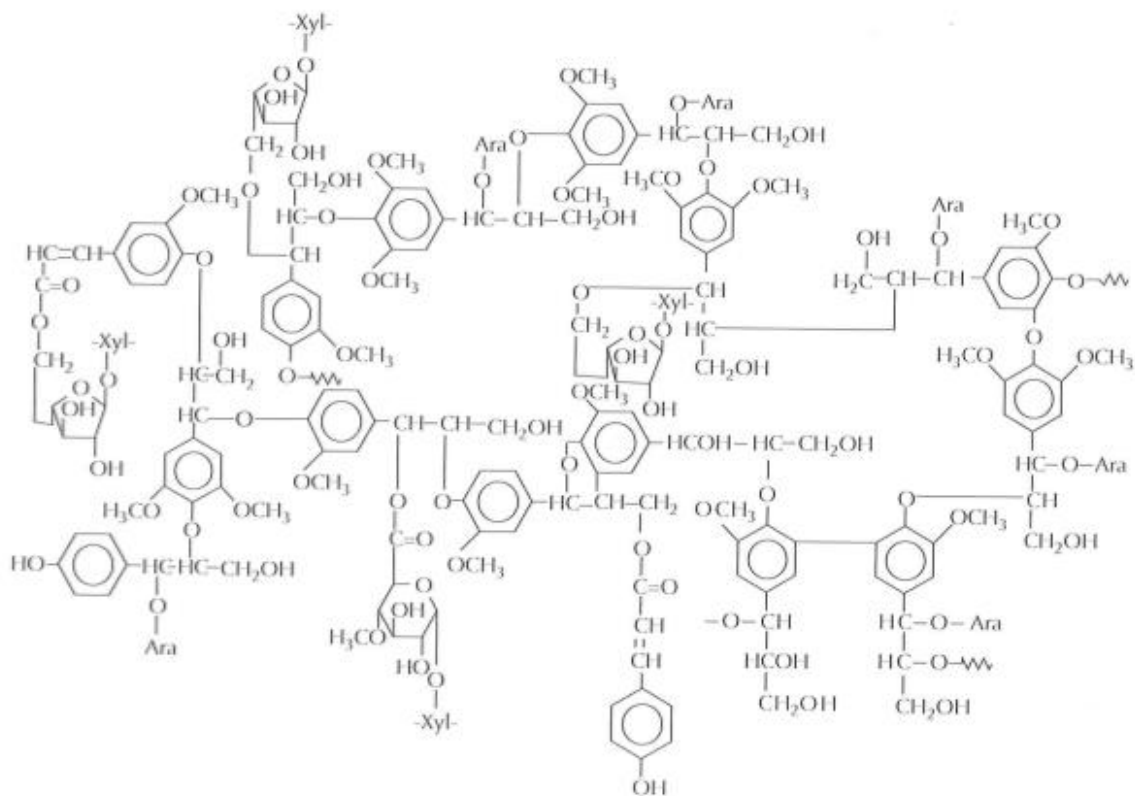


Figure 16 : Modèle de la lignine de paille de blé (Xu 2010)

(2) Réactivité biologique – chimique de la lignine

La lignine est un composé hydrophobe qui protège les plantes contre les attaques microbiennes (Xu 2010). De par ses interactions avec l'holocellulose, elle peut gêner son hydrolyse durant la méthanisation.

D'une part, la lignine est relativement résistante à la biodégradation. Seul un groupe limité de champignons (champignons de la pourriture blanche) est capable de la dégrader complètement en CO₂, alors que les champignons de la pourriture brune entraînent plutôt des changements structuraux (Kögel-Knabner 2002). Il faut noter que ces organismes sont aérobies, et ne se développent pas en milieu anaérobie. Selon Kirk & Farrell (1987) la lignine n'est pas biodégradable en milieu anaérobie.

D'autre part, certaines structures phénoliques constituant la lignine sont des inhibiteurs de l'activité microbienne (Delgenes, Moletta, et Navarro 1996). Vis-à-vis de la méthanisation, les impacts de la lignine et des structures phénoliques qui pourraient être libérées par des prétraitements ne sont pas bien définis, et peu d'informations sont disponibles dans la littérature.

D. Les prétraitements

Afin d'augmenter le rendement et la cinétique de méthanisation des biomasses, lignocellulosiques ou non, différents prétraitements ont été envisagés. La méthanisation étant plus développée sur les substrats de type « boues de STEP », la littérature est plus riche sur ce type de substrat.

1. Prétraitements thermiques

a) Chauffage « traditionnel » par convection

Ce prétraitement consiste à chauffer la biomasse jusqu'à des températures pouvant atteindre 230°C et peut être associé à une augmentation de la pression allant jusqu'à 60 bars. Il peut être effectué en laboratoire dans un autoclave, mais lors de son application industrielle l'injection de vapeur directement au sein de la matière est plus souvent utilisée (Carrère 2011). Ce prétraitement a été mis en place durant les années 1970 et est utilisé de manière industrielle depuis les années 1990.

Pour la biomasse lignocellulosique, ce prétraitement peut être associé à une détente rapide ce qui conduit à la déstructuration de la biomasse et rentre sous l'appellation d'explosion à la vapeur (Mosier et al. 2005; Han et al. 2010). Celle-ci permet aussi la méthanisation d'une biomasse lignocellulosique beaucoup plus difficile à méthaniser comme le bois (Take et al. 2006).

Cependant, ces traitements nécessitent de travailler à une température élevée (entre 160°C et 230°C) entraînant une consommation importante d'énergie thermique. Si la cogénération d'électricité et de chaleur n'est pas choisie comme voie de valorisation du méthane, ce prétraitement ne semble donc pas soutenable énergétiquement parlant.

b) Les traitements aux micro-ondes

Les micro-ondes entraînent la vibration et la rotation des molécules polaires et par conséquent la libération de chaleur (en particulier en présence de solvant polaire). Contrairement aux prétraitements thermiques classiques où l'énergie est transférée à la matière par convection, conduction ou radiation et où la chaleur est transmise selon un gradient thermique, les micro-ondes transforment une énergie électromagnétique en énergie thermique sans aucune considération du gradient thermique (David Jackowiak 2011). En délivrant directement l'énergie électromagnétique à la matière grâce à une interaction moléculaire avec le champ magnétique, ce prétraitement permet de chauffer la biomasse de

manière ciblée et à cœur. Part ailleurs, on peut s'attendre à ce que les micro-ondes entraînent des modifications au niveau de certaines fractions de la paille, en particulier lorsqu'elles sont associées à des réactifs chimiques. En effet OUYANG et al. (2010) ont montré, sur des liqueurs noires de paille de blé, que les micro-ondes en présence de H₂O₂ favorisaient la dégradation de la lignine à poids moléculaire élevée et sa recondensation en lignine à poids moléculaire plus faible.

Dans une étude sur la paille de blé, Jackowiak, Bassard, et al. (2011) mettent en évidence que la température optimale de prétraitement aux micro-ondes est de 150°C, et que cela entraîne une amélioration de la production de méthane de l'ordre de 28% au bout de 60 jours de digestion anaérobie. Dans cette étude le temps de traitement aux micro-ondes le plus court est de 30 minutes.

2. Les traitements chimiques

Les traitements chimiques, principalement acides ou basiques, ont été utilisés pour améliorer la digestibilité des matériaux lignocellulosiques par les ruminants ou pour la production de bioénergie (biocarburant et biogaz) (Ward et al. 2008).

a) Traitements alcalins

Lorsque les matériaux lignocellulosiques sont traités à la soude diluée, la principale réaction chimique est la saponification des esters portés par les chaînes xylanes (Datta 1981) ce qui entraîne un gonflement de la biomasse lignocellulosique. Ainsi, les enzymes hydrolytiques, permettant l'hydrolyse de l'holocellulose, diffusent mieux malgré la présence de la lignine. Il faudra cependant tenir compte de la libération de phénols ou polyphénols dérivés de la lignine, suite à ce prétraitement, qui peuvent être une source d'inhibition pour la méthanisation (Fedorak et Hrudey 1984).

Selon (Lin et al. 2009), le prétraitement basique des boues d'une papeterie, entraîne une meilleure digestion anaérobie de la cellulose mais une diminution de la digestion des hémicelluloses.

Le traitement de la paille de blé à la soude concentrée (1mol/L) (Pavlostathis et Gossett 1985) provoque une forte augmentation de la production de méthane (187 Nm³CH₄/t de MSV sans prétraitement contre 372 Nm³CH₄/t de MSV après prétraitement) au bout de 24 jours de méthanisation. Cependant pour cette concentration en soude, ce prétraitement est associé à une forte consommation de soude, ce qui remet en cause son application industrielle. Des

résultats encourageant ont aussi été obtenu avec des concentration en soude plus faible (1 à 10%), mais nécessitant des temps de contact plus long : de 12h à 24h (Sambusiti, Ficara, et al. 2013), ou des températures de chauffage comprises entre 100 et 160°C (Sambusiti, Monlau, et al. 2013).

b) L'oxydation

L'oxydation de la biomasse permet d'améliorer la méthanisation. Divers procédés d'oxydation chimique existent :

- Oxydation au chlore (Cl_2)
- Oxydation au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- Oxydation à l'ozone (O_3)
- Oxydation en voie humide (OVH) qui utilise l' O_2 comme agent oxydant à des températures et pressions élevées (jusqu'à 150 bars et 370°C) tout en restant inférieures au point critique de l'eau (221 bars et 373°C).

Encore une fois les procédés d'oxydation ont été plus testés sur des boues de STEP que sur les composés lignocellulosiques. Des résultats intéressants ont cependant été observés suite à l'oxydation des déchets verts par OVH. Après un prétraitement de 15 minutes de déchets verts en OVH à 185°C et 12 bars, la production de méthane est quasiment doublée en augmentant de 345Nm³CH₄/t.MSV à 685 Nm³CH₄/t.MSV (Lissens et al. 2004).

3. Traitements mécaniques

a) Le broyage

La réduction de la taille des particules solides entraîne une augmentation de la surface de contact avec le digestat. Le broyage des substrats semble donc être une option pour améliorer la cinétique de la méthanisation. En effet, la surface spécifique de réaction est un paramètre important à prendre en compte pour la digestion anaérobie des fibres végétales (Ward et al. 2008; Mshandete et al. 2006). La diminution de la taille des particules de sisal de 100mm à 2mm entraîne une augmentation de la production de méthane de 20% (augmentation de 18Nm³CH₄/t.MSV à 22Nm³CH₄/t.MSV) (Mshandete et al. 2006).

Cependant, un broyage plus fin n'améliore pas le rendement de méthanisation. Une étude interne à l'APESA montre même que le broyage fin (0,2mm) de la paille de blé entraîne une diminution du potentiel méthanogène. Il est possible l'élévation de la température, lors du broyage, entraîne la perte de certaines fractions volatiles de la paille.

b) Les traitements aux ultrasons

Le traitement aux ultrasons ou sonication consiste à créer des ondes de pression dans le milieu, entraînant la formation de bulles de cavitation. Lorsque la pression locale dans le liquide est inférieure à la pression de cavitation (ou pression d'évaporation) de petites bulles de cavitation se forment et grossissent. Quand la pression locale redevient supérieure à la pression de cavitation, ces bulles implosent, libérant ainsi d'importantes quantités d'énergie mécanique sous forme de vagues d'expansion et de compression. Lorsqu'elles se rencontrent, ces vagues entraînent des phénomènes de turbulence et de cisaillements importants au sein de liquide. Les ultrasons permettent donc une déstructuration de la matière à une échelle plus fine que le broyage.

Les ultrasons favorisent aussi la libération de radicaux libres ($\text{OH}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{H}\cdot$) et de peroxyde d'hydrogène du fait de la dissociation de l'eau (Carrère 2011), ce qui entraîne des réactions d'oxydation pouvant agir sur la lignine (Tiehm et al. 2001).

La prédominance des phénomènes de cisaillement ou de dissociation de l'eau est définie par la fréquence de sonication. Les fréquences élevées (500-1000 kHz) entraînent la dissociation de l'eau tandis qu'avec les fréquences faibles (20-40kHz) les bulles de cavitation sont plus grosses favorisant les phénomènes de cisaillement (Tiehm et al. 2001).

4. Traitements biologiques

Les prétraitements biologiques permettent une faible consommation en produits chimiques et en énergie. Ce sont des méthodes écologiques pour éliminer la lignine des biomasses lignocellulosiques. Les champignons produisant des enzymes capables de dégrader la lignine, semblent les organismes les plus prometteurs pour les prétraitements biologiques.

Les champignons sont cependant des organismes aérobies qui ne peuvent pas se développer dans un digesteur anaérobie. Il faut donc envisager un prétraitement aérobie pour favoriser leurs développements afin de dégrader la lignine et favoriser la digestion anaérobie des substrats lignocellulosiques.

L'utilisation des champignons a été testée sur une biomasse beaucoup plus difficilement méthanisable que la paille comme des copeaux de bois (Take et al. 2006). Différents champignons sont utilisés pendant des prétraitements de 20 jours en milieu aérobie et à température ambiante (Tableau 13) :

Tableau 13 : Production de méthane au bout de 21 jours de digestion anaérobie, à partir de copaux de cèdre traité pendant 20 jours avec une souche de champignon (Take et al. 2006)

Champignon	Production (m ³ CH ₄ /kg bois)	Amélioration (%)
<i>Ischnoderma resinoseum</i> AW 04-02	0,015	+87
<i>Fomitella fraxinea</i> AW 04.03	0,027	+238
<i>Mycoleptodonoides aitchisonii</i> AW 04-04 10	0,005	-38
<i>Trichaptum abietinum</i> AW 04-05W	0,004	-50
<i>Cyathus stercoreus</i> AW 03-72	0,043	+438
<i>Trametes hirsuta</i> NBRC 4917	0,030	+275
Sans prétraitement	0,008	

Comme le montre le Tableau 13, trois souches fongiques de la classe des basidiomycètes se démarquent des autres pour améliorer la méthanisation du bois : *Fomitella fraxinea* AW 04.03 et *Trametes hirsuta* NBRC 4917 (famille des Polyporaceae) et *Cyathus stercoreus* AW 03-72 (famille des Nidulariaceae) avec des productions de 0,027 ; 0,03 et 0,043 m³CH₄/kg bois. Même si ces productions de méthane sont faibles vis à vis de la production de la paille brute, il faut les comparer à la production de méthane avec des TPM sur du bois brut : 0,008 m³CH₄/kg bois.

E. Objectifs de ce travail

La digestion anaérobie apparaît comme un procédé favorisant un retour au sol optimum d'éléments nutritifs et minéraux de la biomasse, tout en permettant la production de méthane à partir d'un coproduit agricole. De plus la digestion anaérobie effectuée sur des déchets revêt deux avantages : la gestion de ces déchets en réduisant leur volume et la récupération d'une ressource carbonée simple présente dans leur matière organique.

Cependant la structure et la composition de la biomasse lignocellulosique sont des freins à sa transformation en biogaz par méthanisation, ce qui limite le développement de cette technologie. En effet la biomasse lignocellulosique est composée de trois biopolymères fortement liés : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. La présence de la lignine dans cette structure confère à celle-ci une résistance aux attaques bactériennes en limitant l'accessibilité de l'holocellulose aux enzymes cellulolytiques, et en retardant ainsi sa dégradation en milieu anaérobie. D'autre part, la composition même de la lignine est suspectée de limiter la croissance bactérienne. Afin d'optimiser le rendement des digesteurs de méthanisation, il est donc nécessaire de mieux comprendre les voies de dégradation de chaque fraction de la biomasse lignocellulosique et les interactions qu'elles peuvent avoir entre elles lors de la méthanisation.

Ainsi un prétraitement est nécessaire pour déstructurer la biomasse lignocellulosique soit en éliminant une partie de la lignine, soit en permettant une meilleure accessibilité à l'holocellulose pour les enzymes responsables de sa digestion. Un large spectre de méthodes est présent dans la littérature selon les types de biomasses considérées (lignocellulosiques ou non). Ces prétraitements peuvent être d'ordre physique (mécanique, thermique, ...), chimique (oxydant, alcalin, ...), biologique (enzyme, champignon, ...) ou faire intervenir une combinaison de différents prétraitements.

Afin de choisir et d'associer correctement ces prétraitements il faut déterminer leurs impacts sur la structure et la composition de la biomasse lignocellulosique et pouvoir faire le lien avec leurs impacts sur la méthanisation. L'augmentation du rendement et de la cinétique de méthanisation est donc une réponse clé à évaluer pour chaque prétraitement effectué.

Dans le but de rendre les prétraitements étudiés plus raisonnables, une diminution des réactifs et une étude de l'énergie dépensée ont été effectuées à l'échelle du laboratoire. Le prétraitement alcalin en présence de soude a été particulièrement étudié en association avec différents prétraitements physiques : thermique, micro-onde, ultrasons. Mais aussi d'autres

prétraitements tels que le raffinage de type papetier, l'oxydation de la paille à l'ozone ou l'utilisation d'ammoniaque.

La première partie de cette thèse porte sur la caractérisation de la paille de blé, tant en termes de composition chimique que de potentiel méthanogène. L'impact des différentes fractions sur la méthanisation a été étudié et une attention particulière a été portée sur la lignine.

Dans la seconde partie, l'effet de la dégradation de la lignine sur la méthanisation, a été analysé à travers une étude portant sur la méthanisation de différents produits phénoliques pouvant résulter de la dégradation de la lignine. En effet, si leurs impacts sur l'activité enzymatique ont été largement étudiés dans le cadre de la production de bioéthanol, le nombre d'études portant sur leurs conséquences sur la digestion anaérobie est limité.

La troisième partie porte sur l'amélioration de la méthanisation par les prétraitements physiques de la paille de blé, comme le raffinage papetier effectué à la pile Valley, le chauffage par convection et par micro-onde, et la sonication aux ultrasons.

Enfin le dernier chapitre porte sur l'association de ces prétraitements physiques à des réactifs chimiques comme la soude et l'ammoniaque. Ainsi que sur l'oxydation de la paille à l'ozone.

Afin de qualifier et quantifier la pertinence de l'utilisation de ces prétraitements sur la biomasse lignocellulosique pour améliorer sa biodégradation en milieu anaérobie, et donc la production de méthane, trois analyses ont été effectuées de manière récurrente (Figure 17) :

- Analyse de la perte de masse liée au prétraitement
- Analyse de la composition de la paille en terme d'extractibles, cellulose, hémicelluloses et lignine
- Analyse du potentiel méthanogène de la biomasse prétraitée par TPM

D'autres analyses propres à chaque prétraitement ont été réalisées, après chacun d'entre eux, sur les fractions liquide ou solide en résultant et sont décrites en détail dans la partie expérimentale.

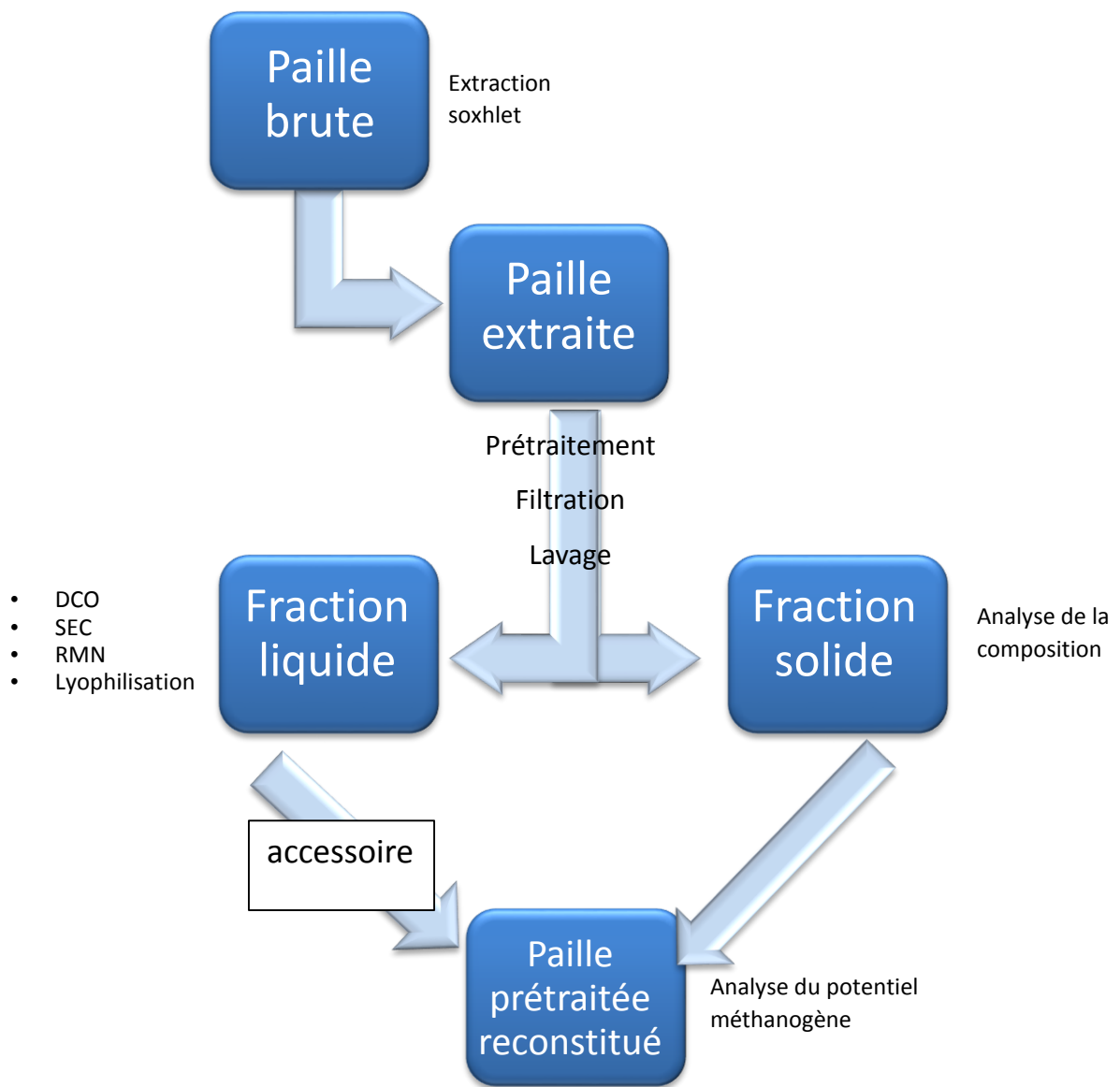


Figure 17: Schéma du principe général de l'étude de la paille prétraitée

Partie expérimentale

A. Préparation et conditionnement de la biomasse

La paille de blé, récoltée en quantité suffisante pour réaliser toutes les expériences de cette étude (20kg), a été conservée dans une salle de stockage à température ambiante ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$). Afin d'homogénéiser la biomasse, pour la caractérisation, la déconstruction, les prétraitements et les tests de méthanisation, celle-ci est broyée à 1 millimètre avec un broyeur de type broyeur à rotor ultra-centrifuge (Retsch ZM 200).

Pour chaque biomasse, la matière sèche (MS) est mesurée à l'aide d'une balance dessiccatrice à infrarouge (Mettler toledo LJ16). Pour la paille de blé broyée, la MS est de $91\% \pm 1\%$.

B. Caractérisation et déconstruction de la paille

La caractérisation, la déconstruction de la biomasse et les prétraitements sont effectués au LCPO (Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques – Bordeaux).

1. Caractérisation selon Van Soest

La biomasse est caractérisée selon la méthode Van Soest qui consiste en une hydrolyse, en présence de détergents et d'amylase, des différentes fractions de la paille. Trois solutions sont utilisées successivement :

- La solution NDS (neutral detergent solution) associée à de l'amylase thermiquement stable permet l'extraction des extractibles.
- La solution ADS (acid detergent solution) permet l'hydrolyse des hémicelluloses.
- L'acide sulfurique (H_2SO_4) à 72% permet l'hydrolyse de la cellulose.

Ces trois solutions permettent d'obtenir les fractions solides respectives suivantes :

- neutral detergent fiber (NDF) correspondant à la norme ISO 16472:2005.
- acid detergent fiber (ADF) correspondant à la norme ISO 13906:2007.
- acid detergent lignin (ADL) correspondant à la norme ISO 13906:2007.

L'analyse selon Van Soest est effectuée à l'aide de l'appareil Fibertec 1020 – FOSS Analysis. La teneur en matière minérale est déterminée par calcination à 500°C pendant 3h. Les taux respectifs d'extractibles, d'hémicelluloses, de cellulose, de lignine et de matière organique (MO) sont calculés par perte de masse (précision de pesée = 0,1mg).

Une mesure de répétabilité a été effectuée sur de la paille brute (6 réplicats) et a permis de calculer un écart type inférieur à 0,4% pour NDF, ADF et ADL.



Figure 18 : Fibertec unités de traitement à chaud (gauche) et à froid (droite)

a) Protocole NDF – fraction : cellulose + hémicelluloses + lignine

Peser 1 gramme de paille, broyée à 1 millimètre, dans un creuset spécial Fibertec (porosité n°2) préalablement taré. Parallèlement faire une mesure de siccité sur une fraction aliquote de paille à analyser. Insérer le creuset dans l'unité d'extraction à chaud, puis ajouter 100 millilitres de solution NDS. Mettre en marche le système de chauffage puis, après 5 minutes, ajouter 0,1 millilitre de solution d'amylase. Porter le mélange à ébullition pendant 1h, puis filtrer et rincer à l'eau distillée et à l'acétone (dans l'unité d'extraction à froid). Le résidu solide est séché à l'air (pour analyse ultérieure de ADF et de ADL) ou à 105°C (pour mesurer NDF).

La fraction solide résiduelle est nommée NDF (Neutral Detergent Fiber), elle est constituée de lignine, cellulose et hémicelluloses. La fraction solubilisée est constituée d'extractibles.

b) Protocole ADF – fraction : cellulose + lignine

Après extraction des extractibles avec la méthode NDF, mettre le creuset contenant la fraction NDF dans l'unité d'extraction à chaud, ajouter 100 millilitres de solution ADF, et porter à ébullition pendant 1h. Puis filtrer et rincer à l'eau chaude et à l'acétone (dans l'unité d'extraction à froid). Le résidu solide est séché à l'air (pour analyse ultérieure de ADL) ou à 105°C (pour mesurer ADF).

La fraction solide résiduelle est nommée ADF (Acide Detergent Fiber), elle est constituée de lignine et de cellulose. La fraction solubilisée est constituée d'hémicelluloses.

c) Protocole ADL – fraction : lignine

Après l'extraction des hémicelluloses avec la méthode ADF, mettre le creuset dans l'unité d'extraction à froid, ajouter 25 millilitres d'acide sulfurique à 72% à 20°C, laisser agir pendant 3h en agitant de temps en temps puis filtrer le résidu solide. Rincer à l'eau jusqu'à pH = 7 (± 0,5). Le résidu solide est séché à 105°C.

La fraction solide résiduelle est nommée ADL (Acide Detergent Lignin), elle est constituée de lignine. La fraction solubilisée est constituée de cellulose.

Remarque : lors de la mesure de chaque fraction, il faut s'affranchir des matières minérales. Pour cela une mesure du taux de matière minérale est effectuée sur chaque fraction solide.

d) Calcul du taux de chaque fraction

Les taux d'extractibles, hémicelluloses, cellulose et lignine sont calculés selon les formules suivantes :

$$\text{Taux d'extractibles} = \frac{(m_2 - m_1) \times (1 - s_1 + s_2)}{m_1 - m_0}$$

$$\text{Taux d'hémicelluloses} = \frac{(m_3 - m_2) \times (1 - s_3 + s_2)}{m_1 - m_0}$$

$$\text{Taux de cellulose} = \frac{(m_4 - m_3) \times (1 - s_4 + s_3)}{m_1 - m_0}$$

$$\text{Taux de lignine} = \frac{(m_4 - m_0) \times (1 - s_4)}{m_1 - m_0}$$

Où :

m_0 = masse du creuset vide (g)

m_1 = masse du creuset avec de la paille (g de MS)

m_2 = masse du creuset avec NDF (g de MS)

m_3 = masse du creuset avec ADF (g de MS)

m_4 = masse du creuset avec ADL (g de MS)

s_1 = taux de matière minérale dans la paille brute (%paille sèche)

s_2 = taux de matière minérale dans NDF (%paille sèche)

s_3 = taux de matière minérale dans ADF (%paille sèche)

s_4 = taux de matière minérale dans ADL (%paille sèche)

2. Extraction et purification des constituants de la paille de blé

Ces protocoles sont dérivés des méthodes utilisées pour la caractérisation du bois et des pâtes celluloses de l'industrie papetière (normes TAPPI).

a) Extractibles

Pour en retirer les extractibles, la paille broyée (200g) est mise dans un soxhlet (1,2L) puis extraite successivement avec 3 solvants : mélange acétone/éthanol (2/1), éthanol puis eau. Chaque extraction dure 4h et est effectuée avec 2,5 litres de solvant. La fraction solide résiduelle correspond à la paille extraite, elle est séchée à l'air ($T < 30^\circ\text{C}$). Chaque fraction liquide est évaporée séparément à l'évaporateur rotatif ($T < 40^\circ\text{C}$) afin de récupérer les extractibles (fractions solides).

b) Holocellulose

La paille extraite (2g) est mise dans un erlenmeyer (250mL) avec 80 millilitres d'une solution d'acétate de sodium (25g d'hydroxyde de sodium et 75g d'acide acétique pour 1L de solution) avec 2 millilitres de solution de chlorite de sodium (27%). L'erlenmeyer est ensuite plongé dans un bain marie à 70°C . Toutes les heures durant 5 heures, 2 millilitres de chlorite de sodium sont ajoutés à la solution agitée avec une baguette de verre.

Après 5h de réaction, l'échantillon est refroidi puis filtré sur verre fritté (n°2). La fraction solide est lavée à l'eau (500mL) puis à l'acétone (15mL). L'holocellulose correspondant à la fraction solide est composée de cellulose et d'hémicelluloses. Afin de déterminer le taux d'holocellulose, l'échantillon est séché à l'étuve (105°C ; 3h), tandis que pour mesurer son potentiel méthanogène celui-ci est séché à l'air (48h).

c) α -Cellulose

L'holocellulose séchée à l'air, obtenue à partir de 2 grammes de paille extraite, est mise dans un bécher en verre avec une solution d'hydroxyde de sodium (17,5%) (10mL). Le mélange, maintenu à température ambiante, est agité régulièrement avec une baguette en verre, tandis que 3 ajouts de 5 millilitres de solution d'hydroxyde de sodium (17,5%) sont

réalisés après 10, 15 et 20 minutes. Trente minutes après le dernier ajout de NaOH, 20 millilitres d'eau froide sont ajoutés, puis le mélange est filtré sur fritté (n°2). L' α -cellulose est rincée 2 fois avec 200 millilitres d'eau, puis avec 15 millilitres d'acide acétique (10%) et finalement avec 500 millilitres d'eau chaude. Pour déterminer le taux de cellulose extraite, l'échantillon est séché à l'étuve (105°C ; 3h) tandis que pour mesurer son potentiel méthanogène celui-ci est séché à l'air (48h).

d) Lignine de Klason

La paille extraite (1 g) est mélangée à 15 millilitres d'acide sulfurique (72%) dans un bécher. Le mélange est agité régulièrement pendant 2 heures à température ambiante. L'acide est dilué en versant le mélange dans 560 millilitres d'eau dans un erlenmeyer, il est chauffé sous reflux pendant 4 heures. La fraction solide est filtrée sur un fritté (n°4) puis rincée à l'eau (500 mL). Pour déterminer le taux de lignine de Klason, l'échantillon est séché à l'étuve (105°C ; 3h), pesé, puis calciné à 500°C pour retrancher le taux de matière minérale.

e) Lignine dioxane-eau

La paille extraite (40g de matière sèche) est placée dans un ballon en verre (1L), 400 millilitres de solution de dioxane – eau (rapport 82 – 18 en volume) sont ajoutés. Le mélange est porté à ébullition sous reflux pendant 2 heures. Le mélange est ensuite filtré sous vide sur fritté n°4. La fraction liquide est évaporée à 40°C à l'évaporateur rotatif, puis précipitée dans l'eau à 4°C pendant 12h. Le lendemain, le mélange est centrifugé (CR412 – Jouan) filtré (fritté n°4) et lavé à l'eau. La fraction solide récupérée est nommée lignine dioxane, elle est séchée à l'étuve à 40°C puis sur P₂O₅.

C. Etude de la méthanisation d'un substrat

1. Test du potentiel méthanogène (TPM) mesure de la production de biogaz par la pression

Le Test du Potentiel Méthanogène TPM est effectué à l'APESA (Association Pour l'Environnement et la Sécurité en Aquitaine – Pau) sur un banc d'analyse que j'ai développé au sein de l'entreprise spécialement pour cette étude.

a) Présentation de l'installation

Tous les TPM ont été réalisés à 39°C en plaçant les bouteilles dans une étuve thermostatée (appareil TS 606/2-1 – société WTW).

Le bouchon étanche, que j'ai développé, permettant un relevé de pression journalier est présenté sur le schéma ci-dessous (Figure 19). Il est adaptable sur les bouteilles en verre de 0,5L résistant à 1 bar de pression (Duran), à goulot large (DL45). L'étanchéité entre le bouchon et la bouteille est effectuée avec un septum en silicone (septum DL45 – Roth) découpé spécialement pour cette application.

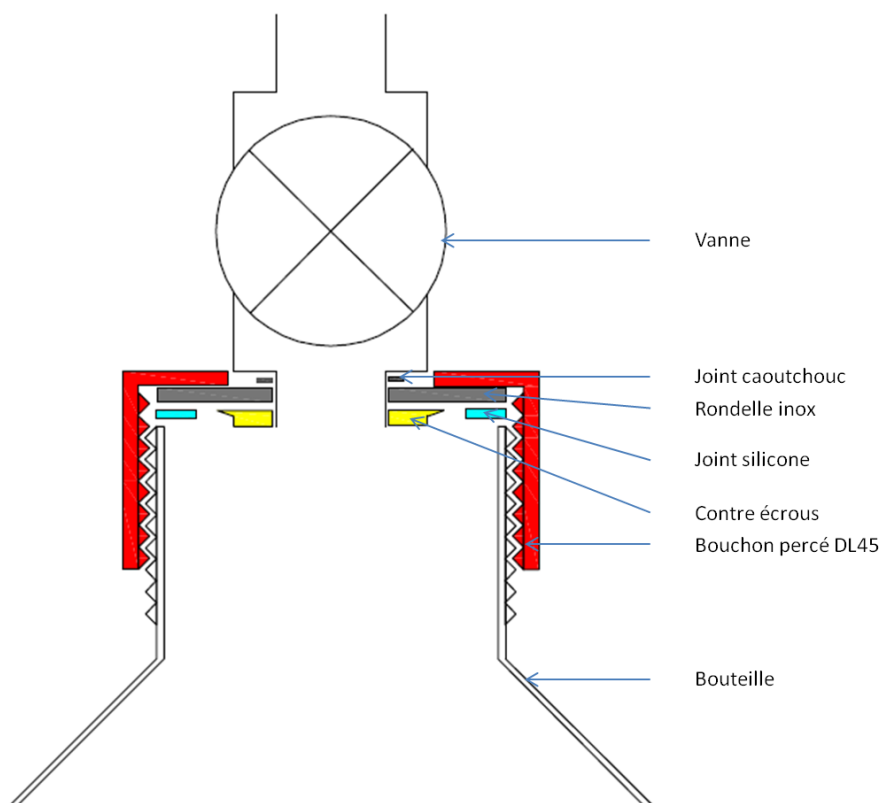


Figure 19 : Schéma du bouchon étanche aux gaz fermant le TPM pression



Figure 20 : Détails du banc d'analyse TPM en pression

Ce banc d'analyse permet de travailler sur 14 flacons en parallèle en utilisant peu d'espace (1m² d'emprise au sol).

b) Protocole

L'inoculum est composé de boues de station d'épuration (STEP) alimentée deux fois par semaine en paille de blé et stocké à 39°C en milieu anaérobie. L'inoculum n'est pas alimenté durant les 96h précédant son utilisation pour le TPM.

Le TPM est effectué dans une bouteille en verre de 0,5L fermée hermétiquement et remplie d'azote. La production de biogaz est mesurée grâce à la pression, relevée tous les jours à l'aide d'un manomètre électronique (Digitron 2083P). Un échantillon gazeux est

également prélevé pour mesurer les taux de CH₄ et de CO₂ dans le biogaz. L'analyse du biogaz est réalisée par chromatographie gazeuse avec une détection par catharomètre (colonne : longueur = 2m diamètre = 1/8'' remplissage Porapak Q 80-100 mesh; température de l'injecteur : 180°C ; température du four : 40°C ; température du détecteur : 140°C). Le TPM sur chaque substrat est effectué en triplicat.

Chaque bouteille est remplie avec 95 grammes d'inoculum et 5 g.MO/L d'inoculum (analyse sur des substrats « pures ») ou 10 g.MO/L d'inoculum (analyse sur de la paille prétraitée ou non) puis le mélange est complété à l'eau distillée jusqu'à atteindre 100 grammes. Afin d'évaluer l'activité endogène de l'inoculum 2 TPM « blanc » sont également effectués : la biomasse est remplacée par de l'eau distillée.

Pour surveiller la stabilité de l'inoculum, un témoin positif est effectué en triplicat. Le substrat utilisé est alors de la pâte de cellulose à haute pureté en cellulose (biofluff) fournie par l'entreprise Tembec (5g.MO/L).

Après fermeture, les bouteilles sont incubées à 39°C et agitées tous les jours. La pression est relevée quotidiennement puis le gaz dans les bouteilles est ramené à pression atmosphérique. L'analyse du taux de CH₄ et CO₂ est effectuée une fois par semaine.

Un TPM dure environ 25 jours jusqu'à l'obtention du plateau de production de biogaz.

c) Erreur expérimentale

Afin d'évaluer l'erreur liée à la mesure de TPM, 6 réplicats d'analyse de la paille brute ont été effectués dans une même enceinte thermostatée pendant 24 jours. L'écart type calculé est de 20 Nm³.biogaz / t.MSV pour la production de biogaz total et de 9 Nm³.biogaz / t.MSV pour la production de CH₄. Dans les deux cas, le coefficient de variance est de l'ordre de 5,5%.

2. Calcul de la production de biogaz d'un substrat

La mesure de production de biogaz d'un TPM prend en compte aussi bien celle liée au substrat testé que celle intrinsèque à l'inoculum. Cette dernière est donc retranchée à la production totale afin de n'évaluer que la production liée au substrat.

De cette façon, lorsqu'un substrat est transformable en biogaz, la production de biogaz est positive, lorsqu'il est un inhibiteur de la méthanisation la courbe de production est négative.

Production de biogaz liée au substrat X

= production de biogaz [TPM(X)]

– production de biogaz [TPM(blanc)]

3. TPM sur une paille « théorique »

Afin d'évaluer l'impact des interactions, entre les différentes fractions de la paille, sur la méthanisation, un TPM théorique est calculé à partir des TPM des fractions de la paille (voir paragraphe B.2) (i.e. extractibles, holocellulose et lignine). Il correspond à la somme de la production de biogaz de chaque fraction (mesurée par TPM) pondéré par leur taux respectif, dans la paille, déterminé précédemment.

Production de biogaz de la paille de synthèse numérique

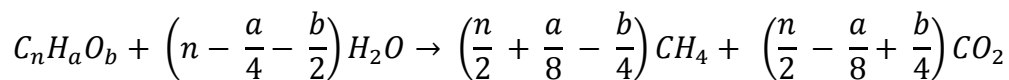
$$= \sum_i (\text{biogaz produit par la fraction } (i) \text{ de la paille de blé})$$

** (taux de la fraction (i))*

4. Formule de Buswell

Afin de calculer la production théorique d'un substrat dont on connaît la composition en carbone, hydrogène et oxygène par l'analyse élémentaire, la formule de Buswell est utilisée (Buswell et Mueller 1952) pour évaluer le taux de biodégradation de la matière testée en TPM.

Formule de Buswell :



Et :

$$\text{Taux de biodégradation (\%)} = \frac{CH_4 \text{ produit (mesuré par TPM)}}{CH_4 \text{ théorique (calculé selon Buswell)}}$$

Remarque : Il est normale que la production théorique selon Buswell ne soit pas atteinte puisque 5 à 10% de la biomasse injectée dans le digesteur anaérobie est transformé en biomasse bactérienne (Guillou et Moletta 2011).

D. Prétraitements

1. Prétraitement de la paille brute à la pile Valley

Le prétraitement à la pile Valley (Figure 21) demandant plus de biomasse que les autres prétraitements testés, de la paille brute est utilisée à la place de la paille extraite. La paille brute est broyée grâce à un broyeur à couteau (appareil Retsch SM100 standard) sur une maille de 4 millimètres, 60 grammes de paille broyée sont trempés dans 1 litre d'eau pour s'hydrater pendant 12 heures.

Le mélange paille broyée-eau est mis dans la cuve de la pile Valley puis de l'eau est ajoutée jusqu'à ce que le volume total atteigne 20 litres. La pile Valley est mise en fonctionnement pendant 5 minutes sans mettre de contrepoids sur la platine, puis un contrepoids de 5 kilogrammes est installé et le défibrage de la paille est effectué pendant 10 minutes.

Afin d'évaluer l'impact de la pile Valley seul et de s'affranchir de l'étape de trempage, un « blanc » est effectué. La paille broyée (60 g) est mise dans 1 litre d'eau, après 12 heures de trempage, de l'eau est ajoutée jusqu'à ce que le volume total atteigne 20 litres.

Les mélanges sont filtrés sur verre fritté (porosité n°1). Les fractions liquides sont analysées en termes de DCO tandis que les fractions solides sont séchées à l'air pour analyses ultérieures.



Figure 21 : Pile Valley en fonctionnement

2. Préparations des substrats après prétraitements

Sauf mention contraire, le mélange paille prétraitée-liquide est filtré sous vide sur verre fritté (n°2). Le résidu solide nommé paille prétraitée est séché à l'air pendant 48h (MS \approx 91%) tandis que le filtrat est lyophilisé (Alfa 1-2 LDplus – Bioblock scientifique).

3. Prétraitement à température ambiante ou par chauffage « traditionnel »

La paille extraite (12 g de MS), broyée à 1mm, est mise dans un ballon en verre de 500mL. Cent cinquante millilitres d'eau sont ajoutés. Une homogénéisation manuelle est effectuée en début de prétraitement, mais la majeure partie de ce dernier doit être effectuée sans agitation afin de ne pas détruire la biomasse.

Si le traitement est effectué à température ambiante, le ballon est posé dans une pièce à 24°C pendant 1h.

Si le traitement est effectué à chaud, le ballon est mis dans un bain d'huile thermostaté à 90°C pendant 1h pour un chauffage « traditionnel ». Un réfrigérant à reflux est ajusté sur le ballon.

4. Prétraitement par chauffage aux micro-ondes

Le chauffage est effectué aux micro-ondes (appareil Ethos touch control, Milestone) avec contrôle de la température du liquide par sonde à thermocouple (Figure 22). Douze grammes de paille extraite ont été broyés à 1mm puis mis dans trois réacteurs en téflon de 90mL chacun. Dans chaque réacteur 50 millilitres d'eau sont ajoutés. Ces réacteurs sont fermés hermétiquement puis une homogénéisation manuelle est effectuée en les retournant plusieurs fois. Une sonde de température (thermocouple) est ajustée sur un des réacteurs puis l'ensemble des réacteurs est exposé aux micro-ondes pendant 1h, en contrôlant la température afin qu'elle ne dépasse pas 90°C.



Figure 22 : Prétraitement de la paille chauffée par micro-ondes

Les réacteurs sont enfin plongés dans un bain de glace puis ouverts avant filtration.

5. Prétraitement aux ultrasons

Le prétraitement aux ultrasons est effectué sur de la paille extraite (12 g de MS) et broyée à 1mm. Elle est mélangée à 150 millilitres d'eau dans un bécher en verre de 250mL par une homogénéisation manuelle puis la sonde à ultrasons (appareil Sonopuls – 20kHz ; puissance max : 200W – Bandelin) est plongée dans le bécher. La sonication est effectuée par tranche de 5 minutes, avec un temps sans apport d'ultrasons de 5 minutes entre deux épisodes de sonication. La température limite de sonication est fixée à 90°C. La sonication est effectuée pendant 6 fois 5 minutes, soit 1 heure de prétraitement.

6. Prétraitement à la soude à température ambiante ou associé à différents prétraitements physiques

Dans les cas du prétraitement à température ambiante ou associé à un chauffage « traditionnel », le protocole est le même que décrit au paragraphe 3 mais l'eau est remplacée par une solution de soude à 0,2 mol/L.

Par contre, les modalités de chauffage aux micro-ondes varient :

- Chauffage pendant 1h sans contrôle d'énergie apportée.
- Chauffage pendant 1 minute en apportant 125 W/g.paille puis 59 minutes de réaction sans apport d'énergie.
- Chauffage pendant 5 minutes en apportant 25 W/g.paille puis 55 minutes de réaction sans apport d'énergie.

Les modalités de sonication varient aussi :

- Sonication pendant 5 minutes.
- Sonication pendant 6 x 5 minutes, soit 1 heure de prétraitement.

7. Prétraitement à l'ammoniaque

Le prétraitement à l'ammoniaque est effectué avec 12 grammes de paille extraite dans 150 millilitres de solution d'ammoniaque à 0,2mol/L. Trois conditions de traitement sont effectuées :

- A température ambiante (24°C) sans agitation
- A 90°C par chauffage aux micro-ondes pendant 1h
- En présence d'ultrasons pendant 1h

Ces trois modalités de prétraitement sont effectuées dans les mêmes conditions que celles des prétraitements à la soude (0,2mol/L).

8. Prétraitement oxydatif à l'ozone

a) Voie liquide

La paille extraite (5 g de MS) est broyée à 1mm puis mise dans un réacteur en verre de 500mL avec 200 millilitres d'eau osmosée. Le mélange est agité par une hélice fixée sur un moteur. L'ozone, synthétisé par un ozoneur à partir d'oxygène pur, est injecté au sein du liquide à un débit de 15L/min pendant 30 minutes.

b) Voie humide

La paille extraite, broyée à 1mm (5 g de MS) est mise dans un bécher en verre avec 12 grammes d'eau osmosée, le taux de matière sèche est donc de 29,4%. La paille extraite humidifiée est déposée dans une colonne en verre (longueur = 5 cm ; diamètre = 5 cm) avec un fritté (n°0), un couvercle d'aluminium percé de trous est posée au dessus. Le montage est présenté Figure 23. L'ozone, synthétisé par un ozoneur (appareil : Pilote OZ1 - 001) à partir d'oxygène pur, est injecté en bas de colonne, par un tuyau traversant un bouchon de silicone. Le débit d'oxygène gazeux est de 15 L/min (erreur \pm 5 L/min) pendant 30 minutes.

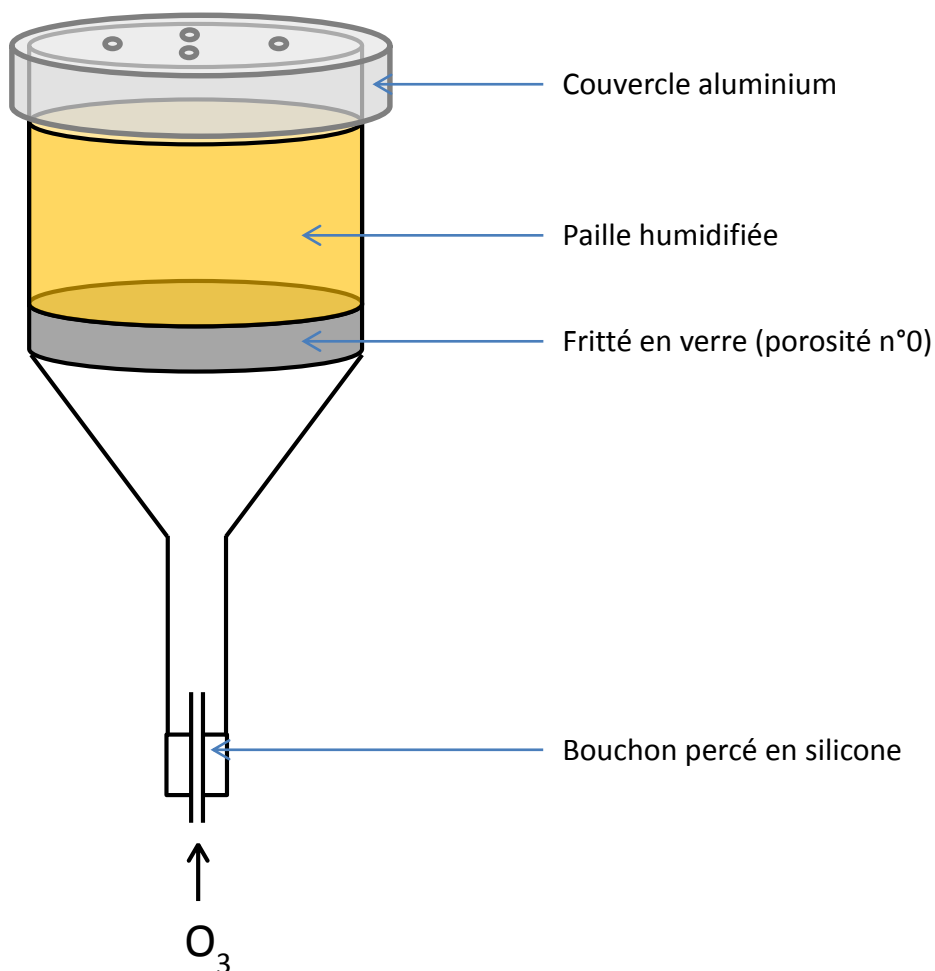


Figure 23 : Schéma du prétraitement du dispositif de prétraitement de la paille en voie sèche

E. Caractérisations post-prétraitement

1. Evaluation de la mouillabilité au goniomètre

Une pastille de paille de blé est effectuée à partir de 200 milligrammes de paille séchée à l'air. La paille est mise dans une pastilleuse habituellement utilisée pour faire des pastilles de KBr nécessaires à l'analyse FT-IR (Infrarouge à transformée de Fourier). La pastille est compressée à 200 kg/cm² pendant 15 minutes.

La pastille est posée au centre du goniomètre (DSA10 Mk2) connecté à un ordinateur. Une goutte d'eau (10µL) est déposée sur la pastille et l'angle formé entre la goutte et la surface de la pastille est mesuré par le logiciel DSA1 (version 1.80).

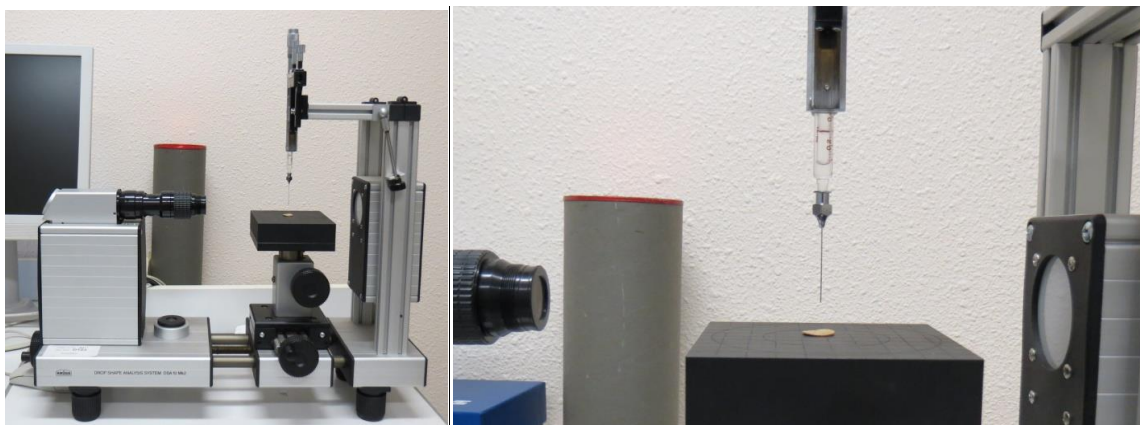


Figure 24 : Photo du goniomètre DSA10 Mk2

2. Analyse de la cristallinité par diffraction aux rayons X

Les clichés de diffraction de poudre ont été enregistrés à l'ICMCB (Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux – Pessac) au moyen d'un appareil PANalytical X'Pert Pro 3830 fonctionnant à une tension de 40 kV et avec une émission de 40 mA (radiation monochromatique Cu Ka1, $\lambda = 0,15418$ nanomètre). Chaque acquisition a été effectuée pendant 1 h 14 minutes

En diffraction des rayons X, le spectre de diffraction présente deux pics d'intensité différente, l'un correspondant à la fraction cristalline et l'autre à la fraction amorphe. L'indice de cristallinité peut alors être calculé en utilisant la méthode de la hauteur des pics (Segal et al. 1959), sa valeur est donnée par la formule suivante :

$$CrI = \frac{(1 - I_{AM})}{(I_{002} - I_{AM})} \times 100$$

Où

- I_{002} : Intensité du pic pour 2θ compris en 22° et 23° pour la cellulose I (ou entre 18° et 22° pour la cellulose II) (fraction cristalline)
- I_{AM} : Intensité du pic pour 2θ compris 18° et 19° pour la cellulose I (ou entre 13° et 15° pour la cellulose II) (fraction amorphe)

3. Demande chimique en oxygène (DCO)

L'analyse de la DCO est réalisée sur la fraction liquide après prétraitement. Elle est effectuée avec le réacteur chauffant (Hach) et le colorimètre DR/890 (Hach), en suivant le protocole fourni associé aux tubes de réactifs « solution digestive pour DCO » (gamme 0-1500 ppm).

4. Spectroscopie Infrarouge par transformée de Fourier (FT-IR)

Le spectre FT-IR a été réalisé sur une dispersion de produit (0,2mg) dans 200 milligrammes de KBr, compressés à 200 kg/cm^2 sous vide pour former une pastille adaptée à l'analyseur FT-IR. L'analyse par transmission a été effectuée grâce au spectromètre Avatar 370FT-IR (Thermo Nicolet), associé au logiciel Omnic.

5. Chromatographies liquide

Les analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et HPLC ont été effectuées grâce à un appareil Thermo Séparation Spectra Physics équipé d'une pompe P100 et d'un auto-injecteur AS3000. Les solutions analysées sont les fractions lyophilisées, re-solubilisées à une concentration de 10mg/L dans l'eau, le pH a été ajusté à 12 avant filtration sur filtre en acétate de cellulose de porosité 0,45 micromètre

Pour l'analyse SEC, 3 colonnes Tosoh Bioscience (TSKgel G 3000 PW, TSKgel G 3000 PW et TSKgel G 4000 PW) sont utilisées associées à un détecteur UV 2000 et à un réfractomètre

Shimadzu RID-10A. Le solvant d'élution est un mélange d'eau et de soude à pH = 12 injecté à un débit de 1 ml/min à température ambiante. Les temps de rétention ont été calibrés avec des standards polystyrènes sulfonés de masses molaires connues, échelonnées de $666.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$ à 900 g.mol^{-1} .

L'analyse HPLC a été effectuée sur une colonne de silice greffée de C-18 (5u C18(2) 100A 250 x 4,60mm 5microns - Phenomenex) en association au détecteur PDA (UV6000LP - ThermoFinnigan). L'éluant est constitué d'un mélange acétonitrile-eau injecté à un débit d'1 ml/min donc le gradient varie en fonction du temps comme décrit dans le tableau suivant (Tableau 14).

Tableau 14 : Gradient de concentration eau - acétonitrile pour l'analyse HPLC

Temps (min)	[eau] (%)	[acétonitrile] (%)
0	80	20
15	75	25
25	0	100
30	0	100

6. Chromatographie Flash

La séparation des constituants de la phase liquide suite au prétraitement à l'ozone est effectuée par chromatographie Flash (Reveleris – Grace) en utilisant la colonne (Reveleris C18 RP 4g Cartridge). Après avoir été lyophilisé, 1 gramme de produit est solubilisé dans le minimum d'eau ($\approx 2 \text{ mL}$) avant d'être injecté dans l'appareil.

Deux séparations successives sont effectuées : la totalité de la solution est traitée suivant le gradient suivant (Tableau 15). La fraction récupérée avant $t=8,3\text{min}$ est séchée, puis remise en solution afin d'être séparée de nouveau.

Tableau 15 : Gradients en eau pour la première et la deuxième séparation par chromatographie Flash

Première séparation			Seconde séparation		
Temps (min)	[eau] (%)	[acétonitrile] (%)	Temps (min)	[eau] (%)	[acétonitrile] (%)
0	95	5	0	100	0
8,3	95	5	2	100	0
25	0	100	22	92	8
29,2	0	100	32	92	8

7. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

a) RMN du proton

Les spectres RMN ^1H , ^{13}C (1D et 2D) ont été réalisés sur un spectromètre BRUKER AVANCE 400 équipé d'une cryosonde directe à l'azote. Les déplacements chimiques sont indiqués en ppm par rapport au signal du TMS utilisé comme référence. Tous les spectres ont été réalisés à 25 degrés dans le D_2O . Les spectres ^1H et ^{13}C ont été réalisés à 400,33 MHz et 100,66 MHz avec 128 et 20000 accumulations et un temps d'attente entre deux impulsions (d1+AQ) de 8 secondes et 4 secondes respectivement.

Paramètres des analyses 2D :

HSQC phasée (NS=128): Corrélation hétéronucléaire 1J avec inversion de phase pour les CH, CH₃ et CH₂.

L'expérience DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) a été développée afin de faciliter l'analyse d'un mélange en s'appuyant sur la mesure du coefficient de diffusion. Les molécules qui se trouvent dans une solution sont toujours en mouvement permanent. Ce mouvement de translation, contrairement au mouvement de rotation, est connu sous le nom « mouvement moléculaire Brownien » et s'appelle souvent diffusion ou autodiffusion. Il dépend des paramètres physiques comme la taille, la forme de la molécule, la température et la viscosité du milieu. La mesure du coefficient de diffusion, basée sur l'expérience DOSY, nécessite l'utilisation de gradients pulsés.

L'analyse DOSY a été réalisée à 25°C sur le même appareil équipé de la cryosonde 5mm capable de produire des gradients dans la direction z d'une force de 53,5 G.cm⁻¹. L'échantillon (6mg) a été dissout dans 0,4 millilitre de D_2O pour limiter les phénomènes de convection. L'acquisition a été faite avec le programme d'impulsion *ledbpgp2s* de la base de données Bruker topspin. La force des gradients a été linéairement incrémentée en 16 étapes de 5% à 95%. La durée maximale du gradient est de 2,0 millisecondes et le temps de diffusion est de 300 millisecondes. Le traitement des données a été effectué avec 8192 points dans la dimension F2 et 32 points dans la dimension F1 avec le logiciel topspin. Sur la carte DOSY la première dimension (axe horizontal) donne les déplacements chimiques et à partir de la deuxième dimension (axe vertical), on détermine le coefficient de diffusion. Deux molécules

de taille et de mobilité différentes, seront séparées sur la carte DOSY selon leur coefficient de diffusion D.

b) RMN du phosphore (RMN ^{31}P)

Les spectres RMN ^{31}P quantitatifs ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance 400 opérant à 162,06 MHz pour le phosphore 31. Les spectres ont été calibrés en utilisant le signal fin à 132,2 ppm provenant de la réaction de l'eau résiduelle avec le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane. Les conditions d'acquisition des spectres (256 accumulations) sont celles décrites par Argyropoulos (1994), excepté le choix du mélange de solvant pyridine/ CDCl_3 qui au lieu d'être 1,6v/1v a été pris égal à 1v/1,6v. Le cholestérol a été utilisé comme référence interne. Il présente un signal unique à 144,8 ppm (S. Wu et Argyropoulos 2003). L'échantillon de lignine (30 à 40 mg pesé avec précision) est mis à dissoudre dans du DMF anhydre (0,5 mL) dans un récipient de type Vial (5 mL) sous agitation magnétique et atmosphère d'azote. Après 10 mn d'agitation, on ajoute successivement un mélange de pyridine/ CDCl_3 (0,3 ml; 1v/1,6v), une solution (0,1 mL) de cholestérol (43 mg mL⁻¹) dans un mélange de pyridine/ CDCl_3 1v/1,6v), une solution (0,1 mL) d'acétylacétonate de chrome (III) (5,28 mg mL⁻¹) dans un mélange de pyridine/ CDCl_3 1v/1,6v) et le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaphospholane (0,1 mL). Le mélange réactionnel est transféré dans un tube RMN après agitation sous azote pendant 1 heure. Une filtration sur coton de verre est effectuée pour éliminer les impuretés solides. Le spectre est enregistré dans la demi-journée qui suit la réaction. Le taux des différents groupes hydroxyles est calculé par rapport au signal du cholestérol de concentration connue.

Les intervalles des signaux correspondant aux différents types de groupement hydroxyle (Figure 25) sont définis comme suit :

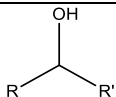
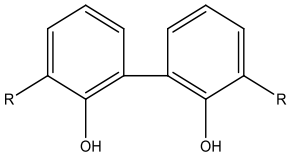
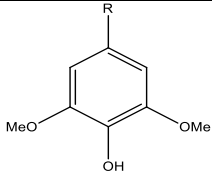
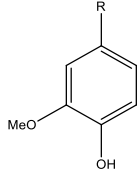
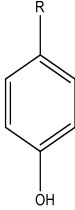
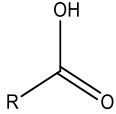
Groupements hydroxyles	Formule développée	Intervalles de déblindage (ppm)
Aliphatiques		149,2 – 146,2
Unités condensées		144,4 – 143,4 141,3 – 140,3
Syringyles		143,3 – 142
Guaiacyles		140,4 – 139
Unités p-hydroxyphénol		138,7 – 137,7
Acides carboxyliques		135,7 – 134,3

Figure 25 : Intervalles de déblindage des groupements hydroxydes

Chapitre I : Caractérisation de la paille de blé et impact de ses différentes fractions sur la méthanisation

A. Introduction

La biomasse lignocellulosique a une structure complexe, composée en majorité de trois fractions polymériques : la cellulose, les hémicelluloses (l'holocellulose étant l'association de ces deux polymères) et la lignine (Xu 2010). L'hydrolyse totale de l'holocellulose permet la libération de différents sucres : en majorité du glucose (provenant de la cellulose) et du xylose (provenant des hémicelluloses) (Y. Peng et Wu 2010; Ren et Sun 2010; R. Sun, Lawther, et Banks 1996). Ces sucres sont des substrats facilement biodégradables lors de la méthanisation, mais la structure cristalline de la cellulose, et les interactions cellulose-hémicelluloses, peuvent diminuer la cinétique d'hydrolyse de l'holocellulose. La présence de lignine dans la biomasse lignocellulosique peut être responsable d'une diminution du rendement et de la cinétique de méthanisation, même si son action n'est pas encore bien définie. La lignine est un composé hydrophobe qui peut bloquer l'accès à l'holocellulose pour les enzymes participant à son hydrolyse (Zhu et Pan 2010). Par ailleurs, Ximenes et al. (2010) ont étudié l'impact des phénols sur l'activité de cellulases (enzymes hydrolysant la cellulose) et ont mis en évidence un effet d'inhibition pour certains composés phénoliques. Afin d'optimiser le rendement des digesteurs de méthanisation, il est nécessaire de déterminer les voies de dégradation de chaque fraction de la biomasse lignocellulosique et les interactions qu'elles peuvent avoir entre elles.

Après avoir analysé sa composition, la déconstruction de la paille de blé a permis d'isoler ses différentes fractions. Dans un premier temps, chacune de ces fractions a été étudiée séparément afin de déterminer leur rôle respectif sur la méthanisation. En particulier, une étude plus poussée a été menée sur la lignine. Par la suite, l'impact des interactions lignine-holocellulose, vis-à-vis de la méthanisation de la biomasse lignocellulosique, a été étudié.

B. Caractérisation de la paille de blé

1. Comparaison méthode Van Soest - méthode TAPPI

Deux méthodes sont généralement utilisées pour caractériser la biomasse lignocellulosique : la méthode Van Soest, ou les méthodes papetières (issues des normes TAPPI). La méthode Van Soest est généralement utilisée pour caractériser la biomasse de type plantes annuelles et les résidus de l'industrie agro-alimentaire. C'est une méthode destructive basée sur la solubilisation successive des extractibles, des hémicelluloses puis de la cellulose. Pour cela deux solutions de détergents sont utilisées : Neutral Detergent Solution (NDS) puis Acid Detergent Solution (ADS). Enfin la cellulose est hydrolysée par de l'acide sulfurique concentré, ne laissant que la lignine comme fraction solide (nommée ADL). Suite aux solubilisations par NDS et ADS, les fractions solides restantes sont nommées respectivement Neutral Detergent Fibre (NDF) et Acid Detergent Fibre (ADF) et sont composées d'holocellulose et de lignine pour NDF, et de cellulose et de lignine pour ADF. Les différentes étapes solubilisation de la méthode Van Soest sont résumées dans la figure suivante (Figure 26). Lors de l'élimination des extractibles avec NDS, une enzyme est utilisée : l' α -amylase ; celle-ci permet la solubilisation de l'amidon et des protéines.

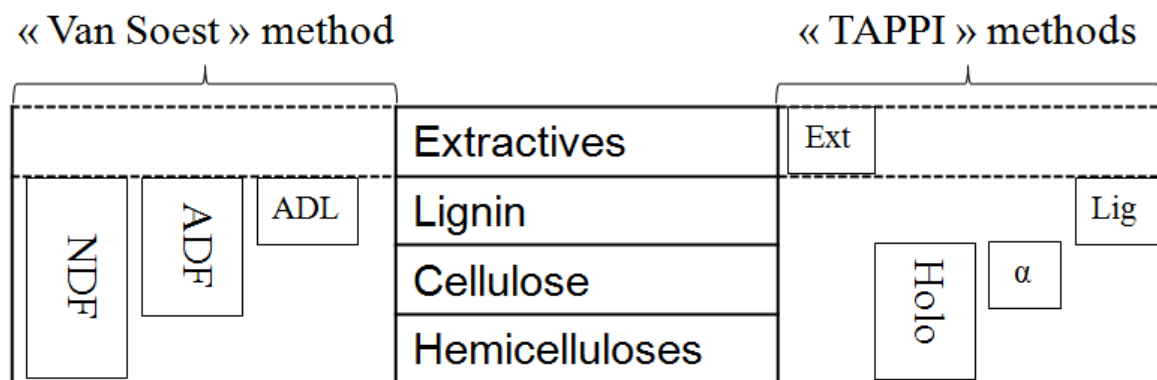


Figure 26 : Synthèse des fractions récupérées selon les différentes méthodes d'analyse de la biomasse lignocellulosique

La deuxième méthode développée dans ce travail est inspirée des normes papetières (TAPPI) et a été développée pour caractériser les produits résidus de l'industrie du bois et de l'industrie papetière. A l'inverse de la méthode Van Soest qui déduit le taux de chaque fraction par perte de masse, cette méthode consiste à purifier les différentes fractions pour en mesurer la masse résiduelle après extraction des autres fractions. Les fractions obtenues par

cette méthode sont présentées ci-dessus (Figure 26) et sont les extractibles, la lignine de Klason, l'holocellulose et l' α -cellulose.

Tableau 16 : Caractérisation de la paille de blé selon la méthode Van Soest (VS) et la méthode TAPPI pour de la paille brute et de la paille extraite (acétone/éthanol, éthanol, eau)

	Paille de blé brute (VS)	Paille de blé extraite (VS)	Paille de blé brute (TAPPI)
Extractibles (% MS)	13	2	14
Hémicelluloses (% MS)	30	38	33
Cellulose (% MS)	43	51	36
Holocellulose (% MS)	73	89	69
Lignine (% MS)	7	8	17

L'analyse de la paille de blé est effectuée selon les deux méthodes citées précédemment afin de pouvoir les comparer (Tableau 16). Les taux d'extractibles, d'holocellulose (= hémicellulose + cellulose) et de cellulose, obtenus par déconstruction de la paille de blé, sont semblables aux taux mesurés par la méthode Van Soest. Par contre, le taux de lignine Klason est plus de deux fois supérieur au taux de lignine déterminé par la méthode Van Soest (respectivement 17%.MS et 7%.MS). Selon Bunzel et al. (2011) la valeur élevée observée dans la lignine de Klason vient de la présence de résidus protéiques non hydrolysés lors de l'attaque acide. Du fait de l'utilisation d'amylase et de détergents lors de l'étape NDF, les protéines de la paille ont été enlevées avant l'attaque acide dans la méthode Van Soest, ce qui expliquerait la différence de résultat entre les deux méthodes de caractérisation utilisées. Cependant, d'autres critères que l'utilisation des réactifs avant l'hydrolyse acide, varient entre les deux méthodes utilisées :

- Le verre fritté utilisé dans la méthode Klason (n°4) a une porosité plus faible que celui utilisé dans la méthode Van Soest (n°2).
- Lors de la méthode Klason, la lignine est recondensée à chaud en milieu dilué avant filtration alors que selon Van Soest, la filtration est effectuée directement après l'hydrolyse dans l'acide sulfurique concentré (72%).

Ces deux points pourraient aussi expliquer le faible taux de lignine mesuré dans la méthode Van Soest. Afin d'évaluer leurs impacts sur le taux de lignine deux expériences complémentaires ont été menées :

- Hydrolyse de la cellulose selon la procédure Klason sur la fraction ADF → correction 1.
- Mesures Van Soest avec des verres frittés de porosité plus faible (n°3) → correction 2.

Les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 17).

Tableau 17: Analyses de la paille de blé brute selon TAPPI ou Van Soest avec ou sans correction de la méthode :
correction 1 = Hydrolyse de la cellulose selon la procédure Klason sur la fraction ADF ;
correction 2 = porosité des fritté plus faible (n° 3)

	Van Soest « Classique »	Van Soest Correction 1	Van Soest Correction 2	Van Soest Correction 1 et 2	TAPPI
Extractibles (% MS)	13	13	13	13	14
Holocellulose (% MS)	72	71	71	71	69
Hémicelluloses (% MS)	29	29	29	29	33
Cellulose (% MS)	43	42	42	42	36
Lignine (% MS)	6,7	7,4	7,7	7,8	17

Malgré les corrections apportées, le taux de lignine d'après Van Soest reste compris entre 6,5% et 8% de la paille brute, tandis que le taux de lignine de Klason, effectué sur de la paille extraite, correspond à 17% de la paille brute. La porosité des verres frittés et la recondensation de la lignine en milieu acide dilué, ainsi que la combinaison de ces deux paramètres n'entraînent qu'une augmentation de 1% du taux de lignine. Leur importance est donc négligeable dans l'analyse de la paille selon Van Soest.

L'azote résiduel à été mesuré dans la lignine de Klason et dans la lignine obtenue selon la méthode Van Soest par analyse élémentaire (effectué par le laboratoire SGS par mesure de conductibilité thermique), dans les deux cas le taux d'azote est inférieur à 1% massique. Le taux de protéines résiduelles, après hydrolyse selon la méthode Klason, est donc faible. Ces données ne confirment pas l'étude de (Bunzel, Schüßler, et Tchetseubu Saha 2011) selon laquelle la lignine de Klason comporte encore des protéines, non hydrolysées dans ces conditions, quand elle est effectuée sur des plantes annuelles.

La méthode Van Soest semble donc plus adaptée pour caractériser la paille de blé, que la méthode issue des normes papetières TAPPI, c'est elle qui sera utilisée dans le reste de ce travail. Par contre cette méthode ne permet pas d'obtenir des fractions pures de biomasse lignocellulosique (extractibles, holocellulose cellulose et lignine). Par conséquent, la déconstruction de la paille de blé sera effectuée selon les protocoles issus des méthodes de caractérisation papetière. D'autre part, la lignine Klason étant considérée comme ayant une structure plus condensée que la lignine native (i.e. proche de sa structure dans la biomasse lignocellulosique), une méthode de type organosolve (solubilisation dans un mélange dioxane-eau) a été utilisée pour extraire la lignine de la paille. Cette méthode ne permet la solubilisation que d'une partie de la lignine, et n'est donc pas utilisable pour quantifier la lignine présente dans la paille. Après l'obtention des différentes fractions, leurs impacts sur la méthanisation pourront être étudiés.

2. Caractérisation de la lignine de paille de blé

La lignine extraite en milieu acide (acide chlorhydrique 1mol/L) par un mélange dioxane-eau (82-18) est considérée comme la plus représentative des tissus ligneux de la paille (lignine dioxane). Celle-ci sera donc utilisée pour caractériser la lignine et évaluer son impact sur la méthanisation.

a) Analyse par infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

L'analyse infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), faite sur de la lignine dioxane donne le spectre suivant (Figure 27).

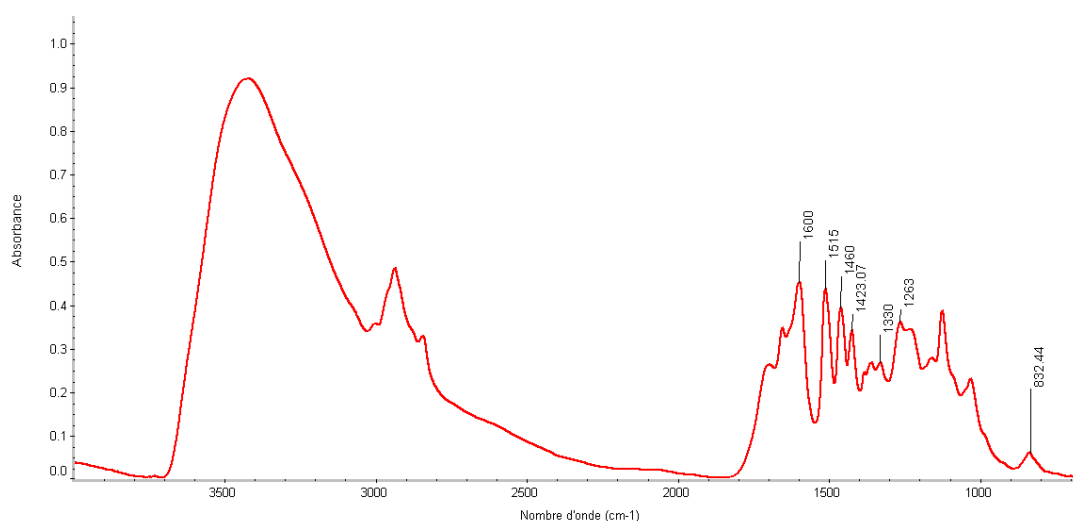


Figure 27 : Spectre FT-IR de la lignine dioxane

Les bandes autour de 3400 cm^{-1} sont caractéristiques de vibrations d'élongation O-H. Les absorptions entre 2840 et 3100 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation C-H des structures aliphatiques et aromatiques. Le spectre présente également des bandes caractéristiques du squelette aromatique à 1600 , 1515 et 1460 cm^{-1} de la lignine (Fengel et Wegener 1983). Les bandes des groupes guaiacyle et syringyle sont observées à 1330 cm^{-1} et 1263 cm^{-1} (1200 cm^{-1} dans la littérature). La bande d'absorption à 832 cm^{-1} est attribuée à des vibrations de déformation dans les unités p-hydroxyphénol normalement observées à 825 cm^{-1} . Le spectre FT-IR est conforme aux données de la littérature mais ne fait pas apparaître clairement de fonctions acide carboxylique ou aldéhydes présentes dans les structures chimiques comme l'acide férulique ou la vanilline.

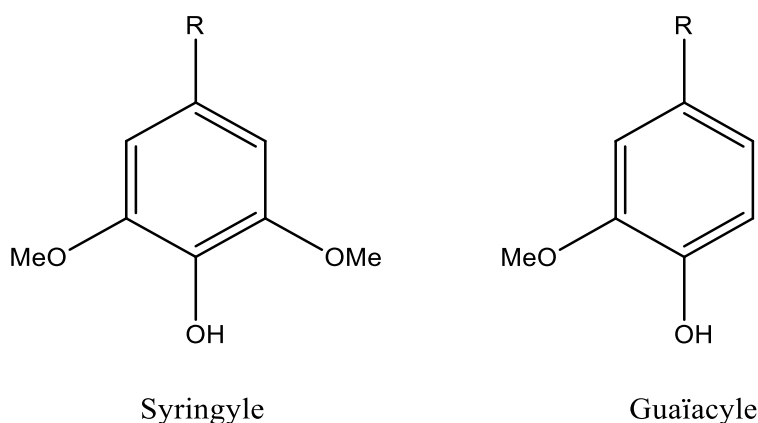


Figure 28 : Structure des unités syringyle et guaiacyl dans la lignine

b) Analyse par RMN du phosphore

Après phosphorylation de la lignine, la RMN du phosphore (RMN – ^{31}P) permet d'analyser les environnements chimiques des hydroxyles présents dans la lignine (Figure 30).

La réaction de phosphorylation est la suivante :

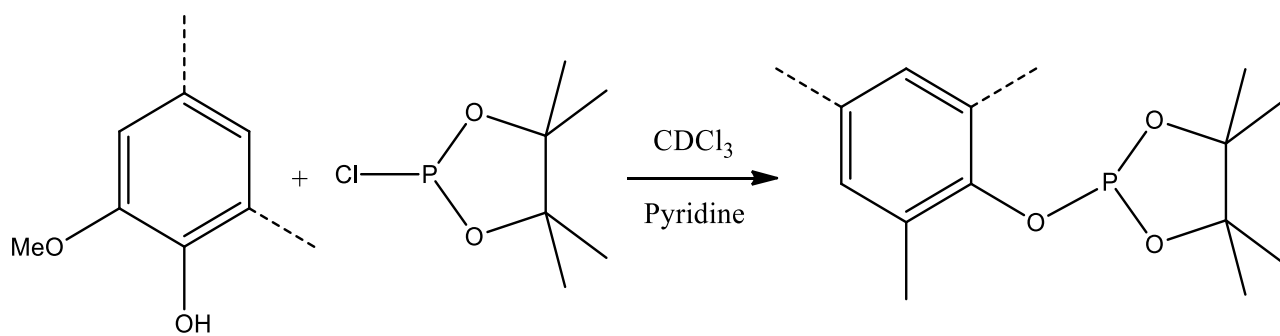


Figure 29 : Réaction de phosphorylation d'un composé phénolique de la lignine

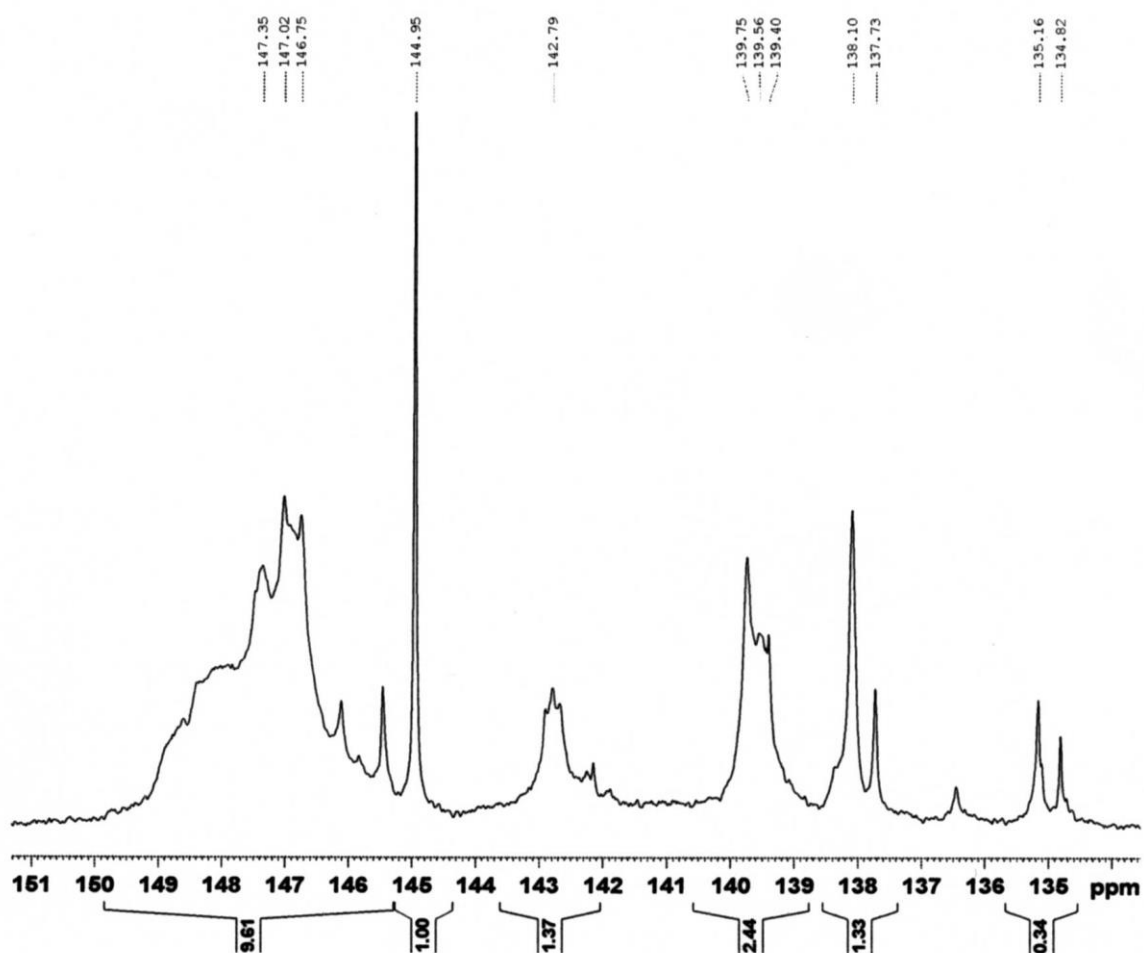


Figure 30 : Spectre RMN - ^{31}P de la lignine dioxane de paille de blé

Pour quantifier les différents types de groupements hydroxyles, une référence interne, le cholestérol, est introduite en quantité connue avec la lignine. L'intégration du pic relatif à ce composé, permet la détermination du nombre de moles d'hydroxyles (ϵ). L'attribution des

pics aux différents motifs phénoliques est présenté dans la partie matériel et méthode (Figure 25)

Tableau 18 : Quantification des groupes hydroxyles par RMN 31P (mmol/g de lignine) de la lignine dioxane de paille de blé

Type de groupement OH	ε -OH (mmol/g.lignine)
Aliphatique	0,34
Syringyle	0,48
Guaïacyles	0,86
Unité p-hydroxyphénol	0,42
Acide carboxylique	0,12
Unités condensées	0

Le tableau ci-dessus (Tableau 18), recense les quantités calculées des différentes unités de la lignine de paille. Il n'y a pas d'unité condensée, peu d'acide carboxylique et peu d'alcool aliphatique (respectivement 0,12 et 0,34 mmol/g.lignine). Par ailleurs, la lignine extraite de la paille de blé est constituée à parts égales d'unités syringyles (S) et p-hydroxyphénol (H) (respectivement 0,48 et 0,42 mmol/g.lignine), et du double d'unité guaïacyle (G) (0,86 mmol/g.lignine). Les proportions relatives des trois motifs de base de la lignine (2G/1S/1H) sont conformes aux valeurs rencontrées dans la littérature, déterminées par thioacidolyse (Runcang Sun, Lawther, et Banks 1997).

L'impact sur la méthanisation, des structures phénoliques dérivées des unités guaïacyle et syringyle, a été étudié dans le chapitre II.

C. Calcul de la production et du rendement de méthanisation d'après la littérature

En considérant la composition élémentaire de la paille de blé relevée dans la littérature, la production de méthane théorique peut être calculée ainsi que le rendement réel de méthanisation.

La composition moyenne de la paille selon Bodineau & Pouet (2006) est la suivante :

- carbone : 42 à 43%
- hydrogène : 5 à 6%
- oxygène 38%
- eau 14 à 20%

Après calcul, la formule brute de la paille correspond donc à $C_{35} H_{60} O_{24}$.

Ainsi la formule théorique de méthanisation de la paille selon Buswell (voir partie « matériel et méthode ») est la suivante :



Cela équivaut à une production théorique de $0,493 \text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg}$ de MSV de paille.

Tableau 19 : Production de méthane de la paille de blé selon différentes sources

Source	T° du milieu	Résultats
(Wang et al. 2009)	55°C	0,250 $\text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 / \text{g MS}$
(Amon et al. 2007)	39°C	0,189 $\text{ Nm}^3 / \text{kg MSV}$
TPM à l'APESA	39°C	0,197 $\text{ Nm}^3 \text{ CH}_4 / \text{kg MSV}$

En comparant cette production théorique aux productions réelles mesurées aux cours de plusieurs études (Tableau 19), le rendement de la méthanisation de la paille de blé oscille donc entre 51% (pour la digestion thermophile) et 38% (pour la digestion mésophile). Ces faibles rendements sont en accord avec ceux des biomasses lignocellulosiques de type agricole.

Le calcul précédent ne tient pas compte des spécificités de chaque fraction et en particulier du rôle de la lignine. En effet ce polymère est constitué d'unités phénoliques qui sont des inhibiteurs potentiels de l'activité microbienne (Delgenes, Moletta, et Navarro 1996).

Son comportement vis-à-vis de la méthanisation peut donc aller de celui d'un substrat inerte jusqu'à celui d'un inhibiteur de l'activité microbienne. Pour tenir compte des spécificités de la biomasse lignocellulosique, certains auteurs (Chandler, Jewell, et Gossett 1980) proposent que la dégradation anaérobie de la biomasse soit directement proportionnelle à son taux de lignine :

$$B = 0,830 - 0,028X$$

Où :

- B est la fraction biodégradable (% MSV)
- X est le taux de lignine (% MSV)

Appliquée à une paille de blé avec un taux de lignine de 8,5% MS soit 9,1% MSV, 82,7% de matière organique de la paille seraient biodégradable selon (Chandler, Jewell, et Gossett 1980). En tenant compte de la production théorique de la paille calculée dans la synthèse bibliographique p 54 ($493 \text{ Nm}^3\text{CH}_4/\text{t.MSV}$) la production théorique de méthane, par digestion anaérobie de la paille de blé, corrigée de la proportion de lignine devient alors :

$$493 * 0,827 = 408 \text{ Nm}^3\text{CH}_4/\text{t.MSV}$$

En comparant cette production théorique avec les productions réelles mesurées (Tableau 10) les rendements de la méthanisation de la paille de blé restent compris entre 61% (en milieu thermophile) et 46% (en milieu mésophile). La formule de Chandler et al. (1980), développée sur des copeaux de cèdre, ne suffit donc pas à expliquer le faible rendement de méthanisation de la paille de blé.

Le rôle de la lignine est donc plus complexe que celui d'une charge inerte au sein de la paille. Indépendamment de l'inhibition potentielle liée à sa composition, son association intime avec la fraction holocellulosique peut gêner voir empêcher son accessibilité.

D. Impact de différentes fractions de la paille de blé sur la méthanisation

L'hydrolyse de la cellulose libère du glucose et du cellobiose. Ce dernier constitué de deux unités anhydroglucopyranose liées par une liaison β -O-4, est le monomère de la cellulose. Leur analyse par TPM est nécessaire pour comprendre l'importance du temps d'hydrolyse de ces molécules lors de la méthanisation de la cellulose.

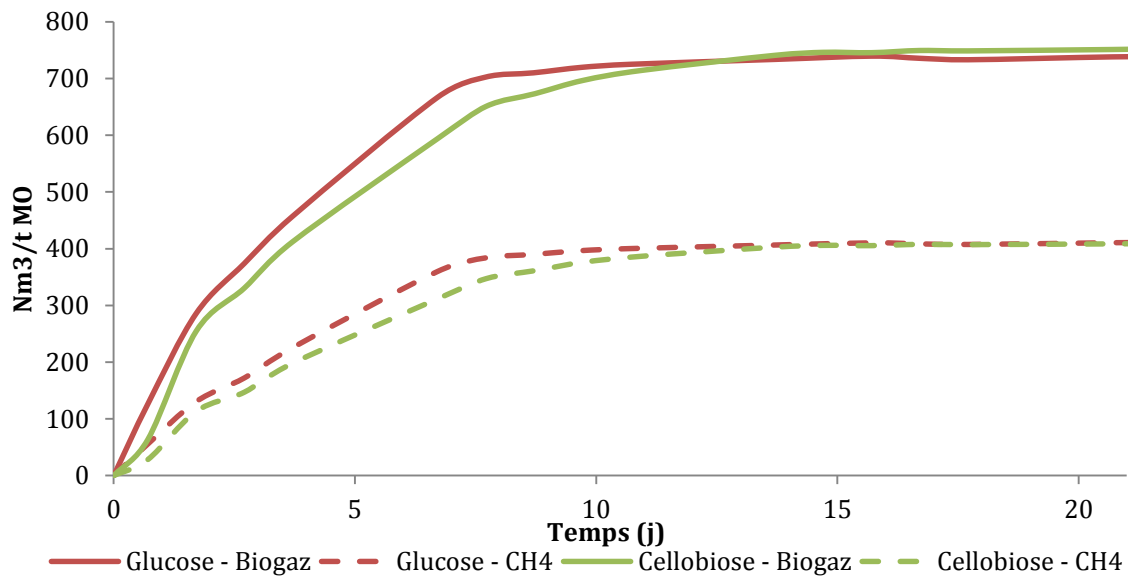


Figure 31 : Production cumulée de biogaz totale et de méthane à partir de cellobiose et de glucose

Les productions de biogaz total et de méthane, après 21 jours d'analyse par TPM du glucose et du cellobiose, atteignent respectivement 738 et 751 Nm³_{Biogaz}/t.MSV soit 410 et 407 Nm³_{CH₄}/t.MSV.

Les productions de biogaz et méthane à partir de ces deux substrats sont donc identiques. L'étape d'hydrolyse de la liaison β -O-4 permettant la libération de glucose à partir de cellobiose n'est donc pas limitante pour la méthanisation dans un réacteur de digestion anaérobie. Par ailleurs, ces productions de biogaz et de méthane sont conformes aux productions théoriques définies par la formule de Buswell.

Dans le but d'évaluer les impacts respectifs de chaque fraction de la paille sur sa méthanisation, les potentiels de production de biogaz des extractibles, de l'holocellulose, de la cellulose et de la lignine dioxane sont mesurés par TPM pendant 21 jours. La valeur finale de chaque TPM est comparée à la production théorique, calculée grâce à la formule de Buswell, permettant ainsi d'évaluer le rendement de production de biogaz et de CH₄ pour chaque composante.

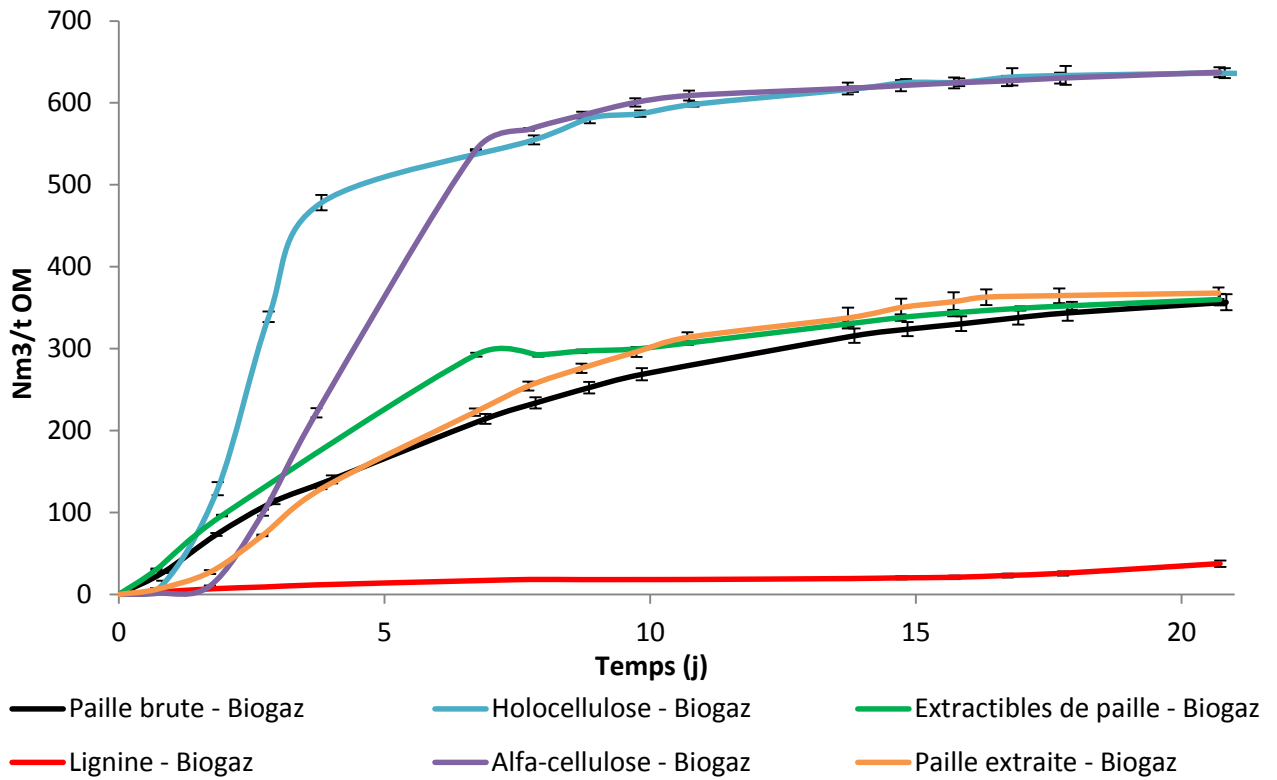


Figure 32 : Production cumulée de biogaz à partir de paille de blé brute et de ses différentes fractions (extractibles, holocellulose, cellulose et lignine)

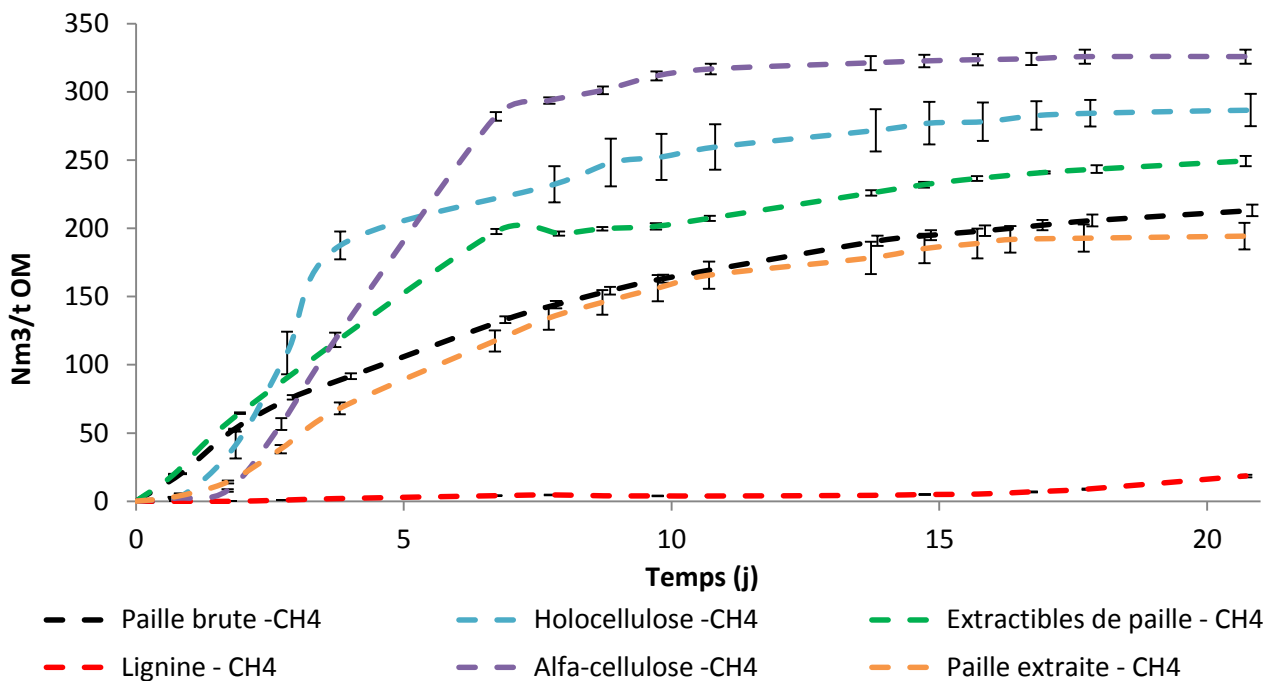


Figure 33 : Production cumulée de CH₄ à partir de paille de blé brute et de ses différentes fractions (extractibles, holocellulose, cellulose et lignine)

Les courbes cumulées de production de biogaz mettent en évidence des variations de production de biogaz total (CO₂ + CH₄) (Figure 32) et de méthane (Figure 33) en fonction de la nature des fractions de la biomasse lignocellulosique. Les maxima de production à partir de la paille de blé sont respectivement de 357 Nm³_{biogaz}/t.MSV et 193 Nm³_{CH₄}/t.MSV ce qui correspond à 39% de la production théorique de biogaz et 42% de la production théorique de méthane, selon la formule de Buswell (926 Nm³_{biogaz}/t.MSV et 461 Nm³_{CH₄}/t.MSV). Les valeurs pour la paille extraite ne sont pas significativement différentes de celles de la paille brute. Par ailleurs, les valeurs de productions de biogaz et méthane à partir de paille brute sont cohérentes avec la littérature (paragraphe précédent).

Les volumes maximum de production mesurés pour l'holocellulose, la cellulose, et la lignine dioxane sont respectivement de 636 ; 637 et 37 Nm³_{biogaz}/t.MSV et 287 ; 326 et 19 Nm³_{CH₄}/t.MSV. D'après les analyses élémentaires effectuées sur les différentes fractions de la paille (effectué par le laboratoire SGS) et la formule de Buswell (Tableau 20), les TPM représentent donc 61%, 76% et 3% de biotransformation réelle pour chacune de ces fractions de la paille et des rendements en méthane de 59%, 72% et 4%.

Tableau 20 : Analyses élémentaires et production de biogaz et de méthane calculées (formule de Buswell) de différentes fractions pures de la paille de blé

Echantillon	Paille brute	Holocellulose	α-cellulose	Lignine
Carbone (% massique)	42	41,7	41,9	49,8
Hydrogène (% massique)	6	5,84	6,12	4,25
Oxygène (% massique)	38	14,58	48,52	26,06
Formule brute « expérimentale »	C _{3,5} H ₆ O _{2,4}	C _{3,5} H _{5,8} O _{0,9}	C _{3,5} H _{6,1} O ₃	C _{4,1} H _{4,3} O _{1,6}
Production de biogaz théorique (Nm ³ _{biogaz} /t.MSV)	927	896	835	1244
Production de CH ₄ théorique (Nm ³ _{CH₄} /t.MSV)	491	456	410	522
Rendement réel (%)	Biogaz	39	61	76
	CH₄	42	59	72

Ainsi l'holocellulose et à plus forte raison la cellulose sont les fractions fortement méthanisables de la paille. Cependant un temps de latence de 3 jours est observé au début de l'analyse TPM de la cellulose, ce qui n'est pas le cas avec le TPM de l'holocellulose.

La cellulose présente des structures cristallines (voir « synthèse bibliographique » p59), tandis que les hémicelluloses sont considérées comme entièrement amorphes (Delmer et Amor 1995; Béguin et Aubert 1994; Ha et al. 1998). Or Kuhad et al. (1997) ont montré que la

structure cristalline de la cellulose était fortement résistante aux attaques microbiennes et enzymatiques, tandis que la structure amorphe était beaucoup plus sensible à ces dernières (Jung et al. 1999). Les indices de cristallinité observés sur la cellulose et l'holocellulose sont respectivement de 69% et 57%. Cette différence est expliquée par la présence d'hémicelluloses dans l'holocellulose qui viennent s'ajouter à la fraction amorphe de la cellulose. L'absence de temps de latence au début de la méthanisation de l'holocellulose, peut raisonnablement être justifiée par leur présence.

Les productions de biogaz mesurées à partir de glucose et de cellobiose sont plus importantes que celles obtenues à partir de cellulose et d'holocellulose. Les différences observées doivent pouvoir s'expliquer par l'énergie dépensée lors de l'étape d'hydrolyse des polysaccharides. Ce qui confirme l'idée communément admise (R. Moletta 1993) que l'hydrolyse est l'étape limitante de la méthanisation.

La lignine est un biopolymère tridimensionnel constitué d'unités phénoliques (voir « synthèse bibliographique » p 63) présent dans les tissus lignocellulosiques. Ximenes et al. (2010) ont étudié les effets des phénols simples sur l'activité de cellulases et ont observé une inhibition induite par les composés phénoliques. En outre, la présence de la lignine dans la structure agit en tant que barrière physique protectrice par son action hydrophobe, qui gêne l'adsorption des enzymes sur l'holocellulose (Zhu et Pan 2010). Dans le cas présent, la production de biogaz à partir du mélange lignine-inoculum (permettant le calcul de celle de la lignine) est très légèrement supérieure à celle de l'inoculum seul (blanc). Si les composés phénoliques présents dans la lignine avaient une action inhibitrice sur l'activité des enzymes ou des bactéries, la production liée au mélange lignine-inoculum aurait été inférieure à celle de l'inoculum seul. La lignine de paille de blé, ne présente donc pas d'effet inhibiteur sur la méthanisation, ce qui n'exclut pas le fait que, lors de sa dégradation par des prétraitements, des inhibiteurs phénoliques soient libérés.

La production de biogaz à partir de la paille de blé est donc due principalement à l'holocellulose et à une partie des extractibles. Cependant la paroi cellulaire végétale n'est pas une juxtaposition simple de polysaccharides et de lignine mais implique des interactions fortes entre ces biopolymères, ayant pour résultat un composé de haute résistance. Ces interactions augmentent la cohésion des parois cellulaires et peuvent modifier la digestibilité des tissus végétaux.

E. Potentiel méthanogène de la paille de blé « théorique »

Afin d'évaluer l'impact des interactions, entre les différentes fractions de la paille, sur la méthanisation, un TPM sur une paille théorique (Figure 34), a été calculé en se basant sur les TPM des fractions pures (extractibles, holocellulose et lignine) pondérés par leurs proportions dans la paille de blé.

Bien que les interactions entre cellulose et hémicelluloses soient toujours présentes au sein de l'holocellulose, elles sont considérées comme raisonnablement négligeables compte tenu des productions cumulées de biogaz de l'holocellulose et de la cellulose (Figure 32). Puisque la paille extraite et la paille brute ont les mêmes potentiels de production de biogaz et de méthane (Figure 32), les interactions entre extractibles et holocellulose sont peu importantes vis-à-vis de la méthanisation. En conséquence, la différence de production entre la paille théorique et la paille réelle est essentiellement due aux interactions lignine-cellulose et lignine-hémicelluloses. Afin de confirmer cette étude, une paille synthétique a été créée en mélangeant de la « lignine dioxane » et de l'holocellulose (respectivement 16% et 84%). Les extractibles ne sont pas ajoutés à la paille de synthèse du fait de leur viscosité qui les rend difficile à incorporer de façon homogène.

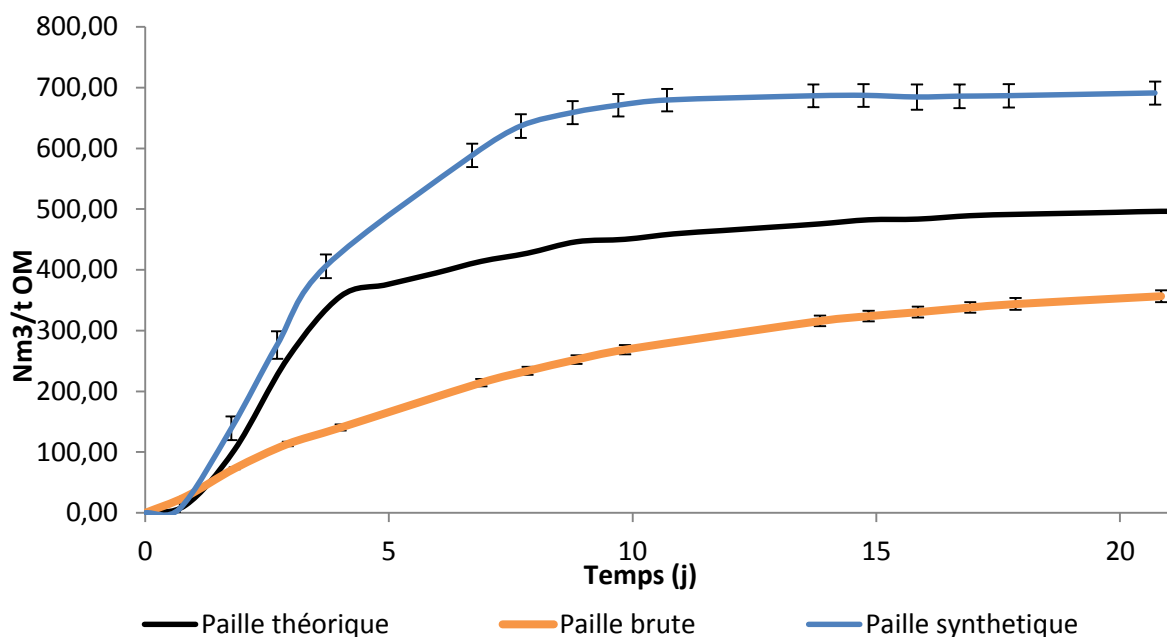


Figure 34 : Production de biogaz cumulée, mesurée par TPM sur de la paille de blé brute, sur de la paille synthétique et de la paille théorique

Après 21 jours de digestion anaérobie, la paille théorique a produit $437 \text{ Nm}^3_{\text{biogaz}}/\text{t.MSV}$ tandis que la paille de blé réelle a permis la production de $357 \text{ Nm}^3_{\text{biogaz}}/\text{t.MSV}$. D'autre part,

la comparaison des productions de biogaz après 7 jours de production permet d'évaluer l'impact des interactions lignine-holocellulose sur la cinétique initiale de production de biogaz. Après 7 jours 372 Nm³_{biogaz}/t.MSV sont produits à partir de la paille théorique tandis que la paille réelle conduit à une production de 214 Nm³_{biogaz}/t.MSV. Ainsi, les interactions lignine-holocellulose peuvent expliquer une diminution de 42% de la production de biogaz après 7 jours de digestion anaérobie et de 18% après 21 jours.

Cette comparaison entre la paille théorique et la paille brute réelle permet de mettre en évidence l'impact des interactions lignine-holocellulose sur le rendement final de méthanisation (après 21 jours) et sur la cinétique initiale de production (après 7 jours). La lignine n'étant pas inhibitrice vis-à-vis des bactéries responsables de la méthanisation (paragraphe D), c'est l'accessibilité à l'holocellulose par les enzymes qui est impactée par ces interactions. Afin d'améliorer le rendement et la cinétique de méthanisation des substrats lignocellulosiques, il sera donc nécessaire d'améliorer l'accessibilité à l'holocellulose, sans forcément enlever la lignine du substrat à méthaniser. Cette étude confirme donc le caractère non inhibiteur de la lignine sur la méthanisation des polysaccharides de la paille de blé.

L'étude du TPM de la paille synthétique pose cependant plusieurs questions :

- de la paille de synthèse, permet d'obtenir 691 Nm³_{biogaz}/t.MSV au bout de 21 jours d'analyse. Le résultat est légèrement supérieur à celui obtenu à partir d'holocellulose pur (636 Nm³_{biogaz}/t.MSV) (paragraphe D) ce qui est surprenant.
- La production de biogaz à partir de paille synthétique est nettement supérieure à celle de la paille théorique.

L'absence de la fraction « extractibles » dans la paille synthétique (remplacée par de l'holocellulose) ne suffit pas à expliquer la différence entre les paille synthétique et théorique, à moins que celle-ci ne soit, pour partie, inhibitrice de la méthanisation. Il est cependant possible qu'une partie de la « lignine dioxane » de faible masse moléculaire, injectée en plus faible quantité que dans l'étude précédente, soit transformée en biogaz lors du TPM de la paille synthétique. En effet, en dessous d'une certaine concentration, certaines molécules phénoliques présentes dans la lignine peuvent être transformées en biogaz (Barakat et al. 2012; Fedorak et Hrudey 1984).

F. Conclusion

Cette étude montre que le faible taux de biodégradation, de la biomasse lignocellulosique, par digestion anaérobie, est principalement dû aux interactions entre la lignine et l'holocellulose. Aucune inhibition, des micro-organismes de la méthanisation, par la lignine, n'est mise en évidence. Sur une paille théorique, sans interaction entre lignine et holocellulose, la production de biogaz est multipliée par 1,4 et 1,2 après respectivement 7 et 21 jours de méthanisation. Ces résultats prouvent que la rupture des interactions de la lignine avec la biomasse, permet une amélioration du rendement et de la cinétique de méthanisation, même si la lignine reste dans la fraction liquide méthanisée.

L'analyse de la lignine par RMN-³¹P a permis de mettre en évidence un taux important d'unités guaïacyle, syringyle et p-hydroxyphényle, or elles pourraient être inhibitrices vis-à-vis de la méthanisation si elles sont libérées dans le milieu lors d'un prétraitement. D'autre part, les prétraitements pourraient libérer d'autres fractions phénoliques dont les impacts sur la méthanisation sont peu connus, puisque les études ont surtout porté sur l'impact des composés phénoliques sur la production de bioéthanol (Barakat et al. 2012). Une étude sur l'impact de différents composés phénoliques sur la méthanisation est donc nécessaire et est présentée au chapitre suivant.

Chapitre II : Impacts des fractions phénoliques sur la méthanisation

A. Introduction

La méthanisation, au même titre que la production de bioéthanol, à partir de matériaux lignocellulosiques, nécessite souvent des prétraitements visant à dégrader plus ou moins la lignine afin de favoriser l'accessibilité à l'holocellulose. Or, cette dégradation favorise la libération de fractions de faible poids moléculaire issues de la lignine, pouvant entraîner une inhibition de la méthanisation.

Certaines de ces fractions sont des molécules aromatiques de type phénoliques. Si leurs impacts négatifs sur la fermentation (production de bioéthanol à partir de molécules simples comme le glucose) ont été largement étudiés (Zaldivar, Martinez, et Ingram 1999; Almeida et al. 2013; E Palmqvist et al. 1999; Eva Palmqvist et Hahn-Hägerdal 2000), peu d'études ont porté sur la méthanisation. La fermentation du sucre en éthanol nécessite généralement une ou quelques souches de levure (*Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Candida shehatae* et *Pichia stipites*) (Delgenes, Moletta, et Navarro 1996; Zaldivar, Martinez, et Ingram 1999), tandis que la digestion anaérobie est réalisée par un cocktail microbien présentant une diversité taxonomique beaucoup plus importante (René Moletta et Verstraete 2011; Garcia 1990). Par conséquent les résultats concernant l'inhibition, liée aux molécules aromatiques, ne sont pas forcément transposables à la digestion anaérobie.

Fedorak & Hrudey (1984) ont mis en évidence l'effet inhibiteur du phénol, à partir de 2g/L d'inoculum, et de certains diméthylphénols sur la digestion anaérobie. Récemment Barakat et al. (2012) ont montré que la vanilline et à plus forte raison le syringaldéhyde pouvaient être transformés en biogaz par digestion anaérobie. En se basant sur ces deux études, l'impact sur la méthanisation, de différentes molécules possédant un noyau phénolique et pouvant être libérées lors des prétraitements de la paille, est présenté dans ce chapitre.

B. Acide férulique et dérivés

L'acide férulique est présent dans la lignine de paille de plantes annuelles en quantité importante sous forme d'ester ou d'éther (Lu et Ralph 2010; Allerdings et al. 2005). Sa structure présente un noyau phénolique avec un groupe méthoxyle en ortho au même titre que la vanilline dont les impacts sur la méthanisation ont été étudiés (Barakat et al. 2012). A la différence de la vanilline, l'acide férulique possède une chaîne carbonée à 3 carbones et une fonction acide carboxylique. La comparaison entre les molécules dérivées de l'acide férulique et celles de la vanilline, sera donc une première étape pour appréhender l'impact du changement constitutif de la chaîne latérale portée par le noyau aromatique.

1. L'acide férulique

Afin d'évaluer sa capacité à être méthanisé en milieu anaérobie, l'acide férulique est mis en temps que substrat seul dans un digesteur anaérobie. Sauf mention contraire, la même concentration en substrat (5g/L d'inoculum) a été choisie pour toutes les molécules aromatiques dans cette étude.

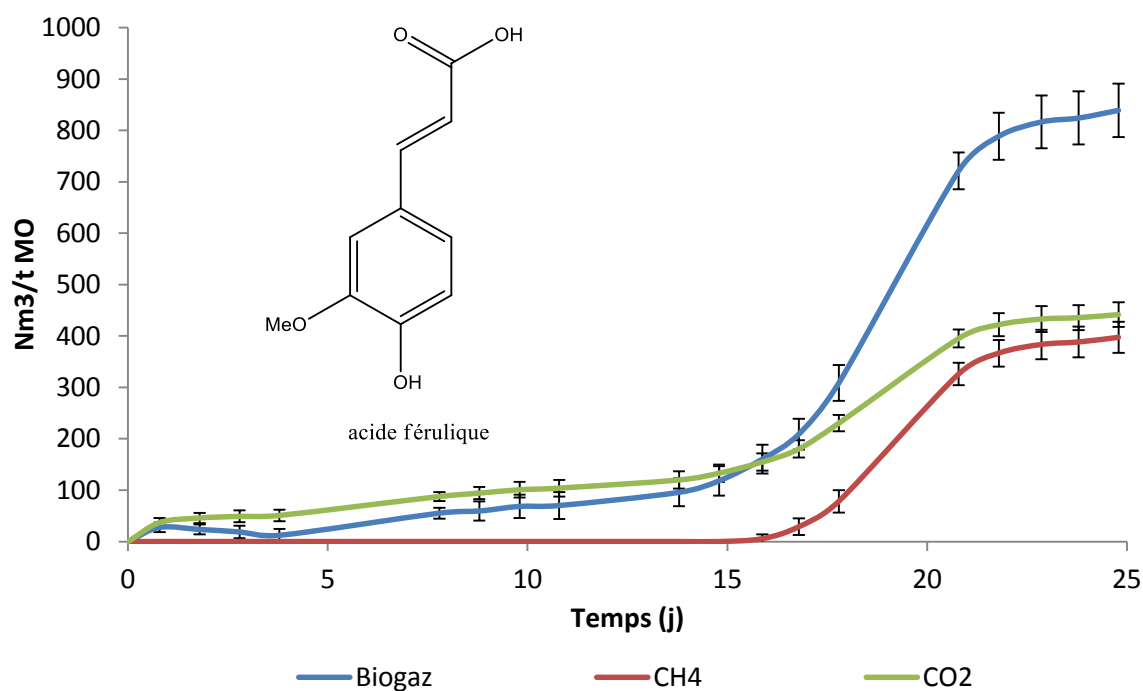


Figure 35 : Production de biogaz total, CO₂ et CH₄ à partir d'acide férulique (5g.MO/L d'inoculum)

Après un temps de latence notable (15 jours) une production importante de biogaz est observée. Au bout de 25 jours de méthanisation (Figure 35), les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ à partir de l'acide férulique sont respectivement de 839 ; 442 et 388 Nm³gaz/t.MSV.

La production de méthane est nulle durant les 15 premiers jours tandis qu'une production de dioxyde de carbone est observée. Ces observations peuvent avoir deux causes : une légère inhibition de l'étape de méthanogenèse due à un inoculum non adapté au substrat, ou la digestion des fractions les plus oxydées (hydroxyle, méthoxyle et acide carboxylique) durant les 15 premiers jours de la méthanisation. Dans l'étude de (Barakat et al. 2012) un temps de latence semblable est observé lors de la digestion anaérobie du 5-hydroxyméthylfurfural, et est associé au temps nécessaire à l'adaptation de l'inoculum au substrat.

Par ailleurs, en s'appuyant sur la formule brute de l'acide férulique (C₁₀ H₁₀ O₄) et sur la formule de Buswell, les productions théoriques de biogaz, de CO₂ et de CH₄ liées à sa méthanisation ont été calculées : respectivement 1155 ; 549 et 607 Nm³gaz/t.MSV. L'acide férulique est donc transformé en biogaz à hauteur de 73%, même si la production réelle de CH₄ ne correspond qu'à 64% de la production théorique.

Ces résultats vont à l'encontre de l'idée initiale selon laquelle les molécules aromatiques sont, soit des inhibiteurs de la méthanisation soit inertes vis-à-vis de la méthanisation. Les résultats sur les inhibiteurs de la fermentation, liée à la production de bioéthanol, ne sont donc pas directement transposables à la méthanisation.

Afin de se rapprocher du substrat réel (paille), l'acide férulique a été mis en tant que co-substrat de la cellulose dans un digesteur anaérobie (Figure 36) (acide férulique = 2,5g/L d'inoculum ; cellulose = 2,5g/L d'inoculum), pour évaluer son impact sur la méthanisation de composés cellulosiques.

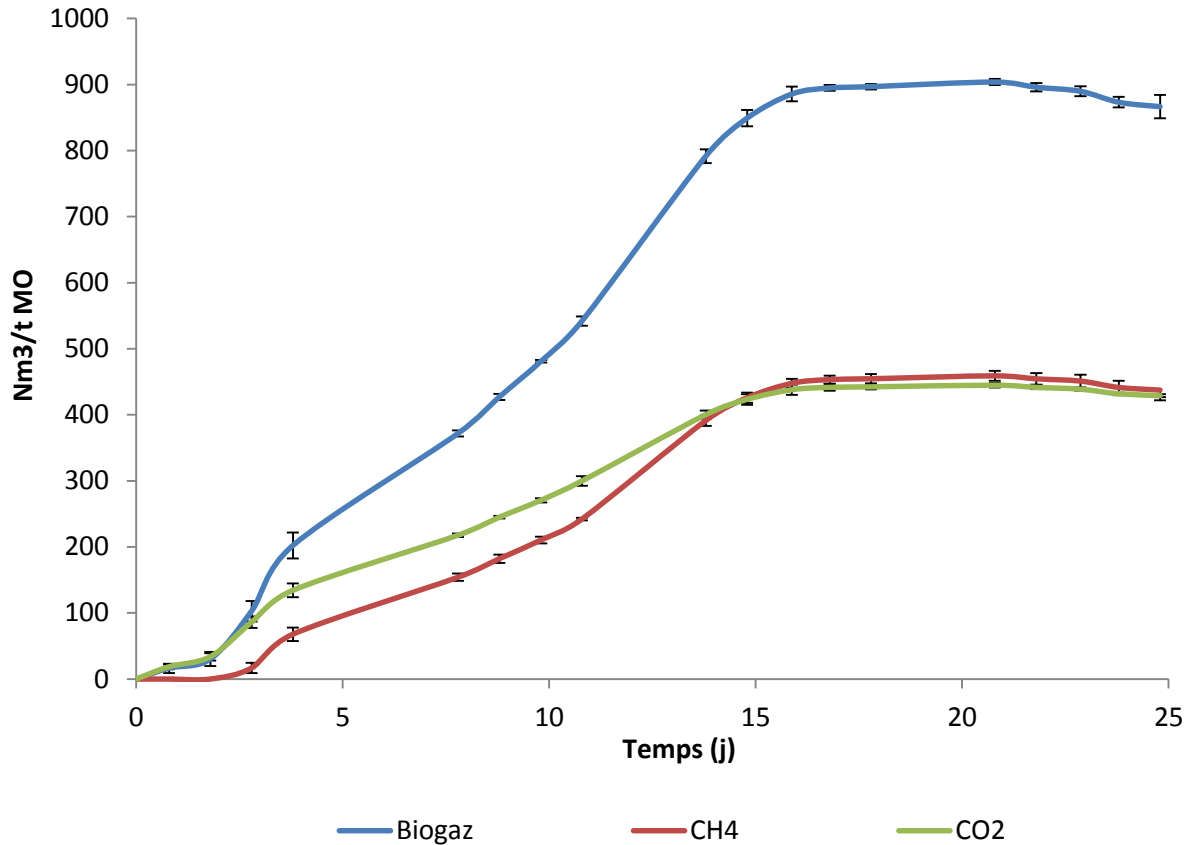


Figure 36: Production de biogaz, CH₄ et CO₂ à partir d'un mélange cellulose - acide férulique (2,5g.MO/L d'inoculum - 2,5gMO/L d'inoculum)

Après un temps de latence plus court que celui observé pour l'acide férulique seul (3j) mais identique à celui de la cellulose (p 110), une production de biogaz ne ressemblant ni à celle de la cellulose ni à celle de l'acide férulique est obtenue. Au bout de 25 jours de méthanisation (Figure 36), les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ à partir du mélange sont respectivement de 904 ; 445 et 459 Nm³gaz/t.MSV.

Afin de mieux comprendre les impacts respectifs de la cellulose et de l'acide férulique, une production de CH₄ théorique est calculée à partir des productions de CH₄ obtenues avec les fractions pures de cellulose et d'acide férulique. La production calculée du mélange est comparée à sa production réelle ainsi qu'à celle obtenue à partir de cellulose et d'acide férulique seuls (Figure 37). La production de biogaz totale étant semblable, en termes de cinétique de réaction, seule la production de CH₄ est présentée.

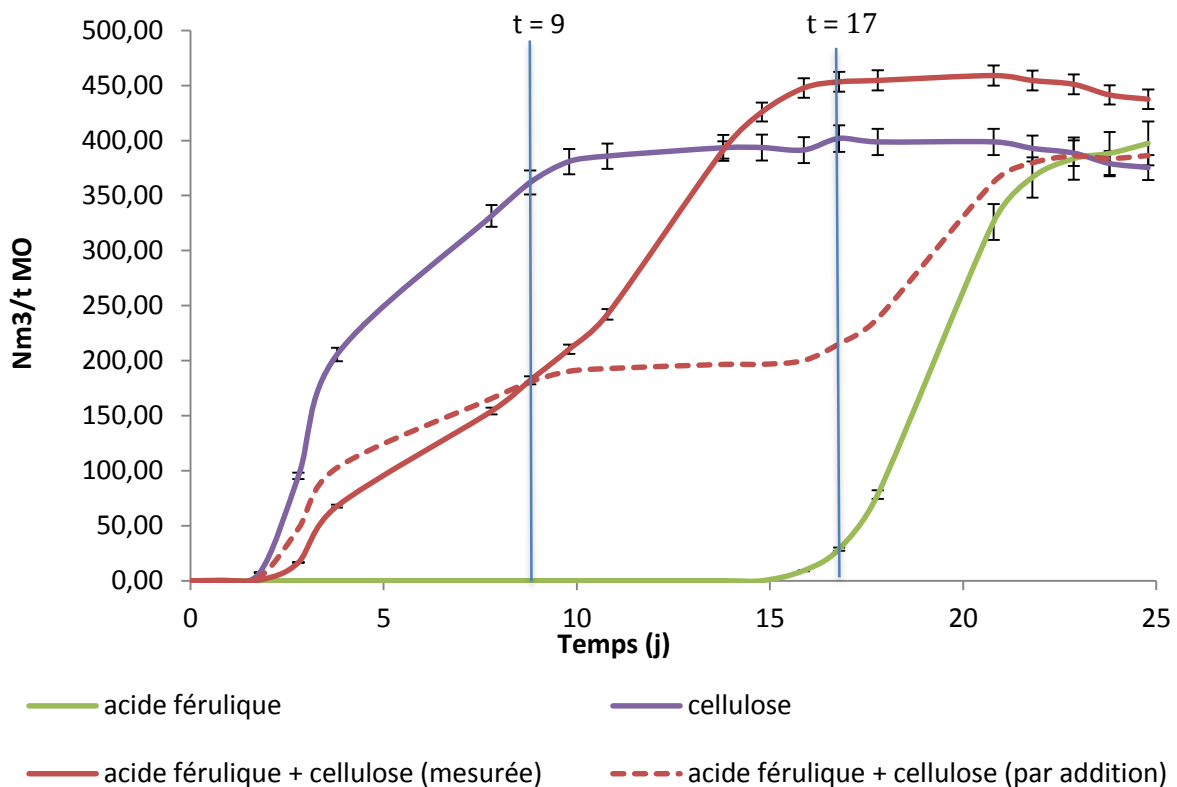


Figure 37 : Production de CH₄ mesuré et calculé à partir d'un mélange cellulose - acide férulique (2,5g.MO/L d'inoculum - 2,5gMO/L d'inoculum) ; ainsi qu'à partir de cellulose et d'acide férulique pur (5g.MO/L d'inoculum)

Au pout de 25 jours de méthanisation, la production mesurée de CH₄ cumulée est de 438 Nm³gaz/t.MSV tandis que celle calculée est de 386 Nm³gaz/t.MSV. Ces valeurs sont relativement semblables. Le rendement final en méthane est donc effectivement dû à la somme des productions de CH₄ liées à la cellulose et à l'acide férulique. Aucun facteur d'inhibition ni d'augmentation du rendement en CH₄ final, n'est mis en évidence au bout de 25 jours de digestion anaérobie, par le mélange de cellulose et d'acide férulique.

Durant les 15 premiers jours de digestion anaérobie, la production de CH₄ du mélange n'est théoriquement due qu'à la cellulose, puisque l'acide férulique seul n'est pas transformé en CH₄. Si cela est vrai jusqu'au 9^{ème} jour, une brusque production de CH₄, survenant entre le 11^{ème} et le 17^{ème} jour est attribuée à la présence d'acide férulique dans le mélange. Dans cette étude, la cellulose favorise donc la méthanisation de l'acide férulique en diminuant le temps de latence.

2. L'isoeugénol

Pour évaluer la capacité de l'isoeugénol (Figure 38) à être méthanisé en milieu anaérobie, il est mis en temps que substrat seul dans un digesteur anaérobie (5g/L d'inoculum). L'impact sur la méthanisation, de la fonction acide carboxylique portée par une chaîne carbonée en para du phénol pourra être mis en évidence en comparant les courbes obtenues pour l'isoeugénol et l'acide férulique.

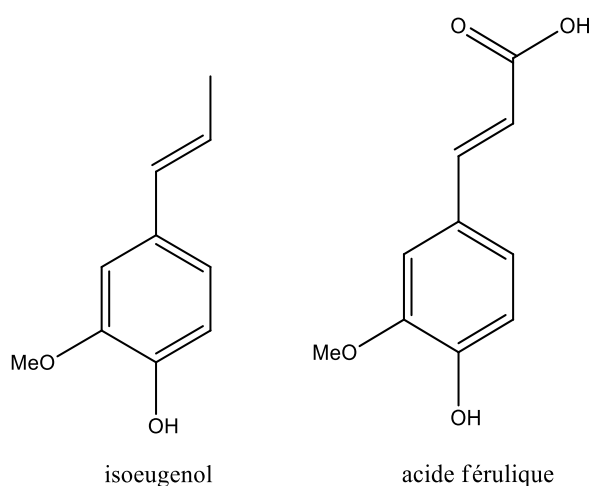


Figure 38 : Formule développée de l'isoeugénol et de l'acide férulique

Dans le cas présent la production liée au mélange inoculum-substrat étant plus faible que celle du blanc (inoculum seul), la production du blanc n'a pas été retranchée à celle du mélange (Figure 39).

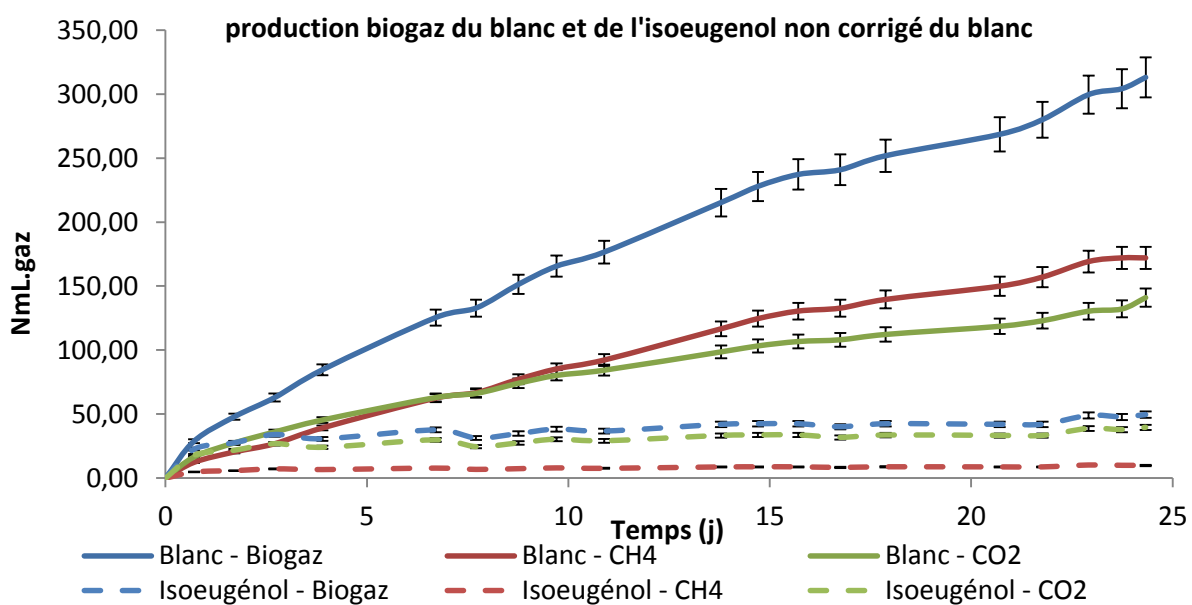


Figure 39 : Production biogaz total, CH₄ et CO₂ à partir du blanc et de l'isoeugénol non corrigé du blanc (5g.MO/L d'inoculum)

Après 25 jours de méthanisation, les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ sont respectivement de 313 ; 141 et 172 NmL.gaz pour le « blanc » tandis que pour le mélange inoculum-isoeugénol, les productions respectives sont 50 ; 40 et 10 NmL.gaz. Ces chiffres attestent d'une inhibition de la méthanisation liée à l'isoeugénol, celle-ci étant plus marquée pour la production de CH₄ que pour celle de CO₂.

La comparaison des TPM de l'acide férulique (taux de transformation en biogaz : 73%) et de l'isoeugénol, atteste de l'importance de la fonction acide carboxylique au cours de la méthanisation des molécules de cette famille. Pour mieux cerner l'impact de la fonction acide carboxylique, des TPM sur d'autres molécules aromatiques, proches de l'acide férulique et potentiellement libérées par les prétraitements de la paille, ont été effectués.

Hernandez & Edyvean (2008) ont mis en évidence pour certaines molécules phénoliques, que le caractère apolaire favorisait l'inhibition de la méthanisation en diminuant la production d'acides gras volatils, d'hydrogène et par conséquent de méthane. La différence d'impact sur la méthanisation de l'isoeugénol et de l'acide férulique peut donc venir de leur différence de polarité, liée à l'absence de l'acide carboxylique pour l'isoeugénol.

Enfin, (Eva Palmqvist et Hahn-Hägerdal 2000) ont émis l'hypothèse de l'influence de l'hydrophobicité des molécules aromatiques sur l'activité bactérienne lors de la fermentation. Même s'il a été montré précédemment que le digestat ne réagissait pas de la même façon que les milieux liés à la production de bioéthanol, il est possible que l'hydrophobicité de l'isoeugénol soit une explication à son caractère inhibiteur vis-à-vis de la méthanisation.

C. Vanilline et dérivés

La vanilline est un des sous produits de la lignine obtenue généralement par des procédés oxydant cette dernière (Araújo, Grande, et Rodrigues 2010). Des effets inhibiteur sur la croissance microbienne et le métabolisme cellulaire ont été observés pour la production de bioéthanol en présence de vanilline (Eva Palmqvist et Hahn-Hägerdal 2000). Une étude menée par Barakat et al. (2012) a mis en évidence l'absence d'inhibition de la méthanisation par la vanilline à une concentration de 2 g/L d'inoculum, et montre aussi l'absence d'inhibition en présence de syringaldéhyde (un inhibiteurs pour de la production de bioéthanol). Dans le cas présent, la concentration en vanilline étudiée est de 5g_{vanilline}/L d'inoculum.

Différents degrés d'oxydation (Figure 40) de la fonction en para de l'hydroxyle phénolique ont été étudiés dans la présente étude, le moins oxydé étant le créosol et le plus oxydé l'acide vanillique.

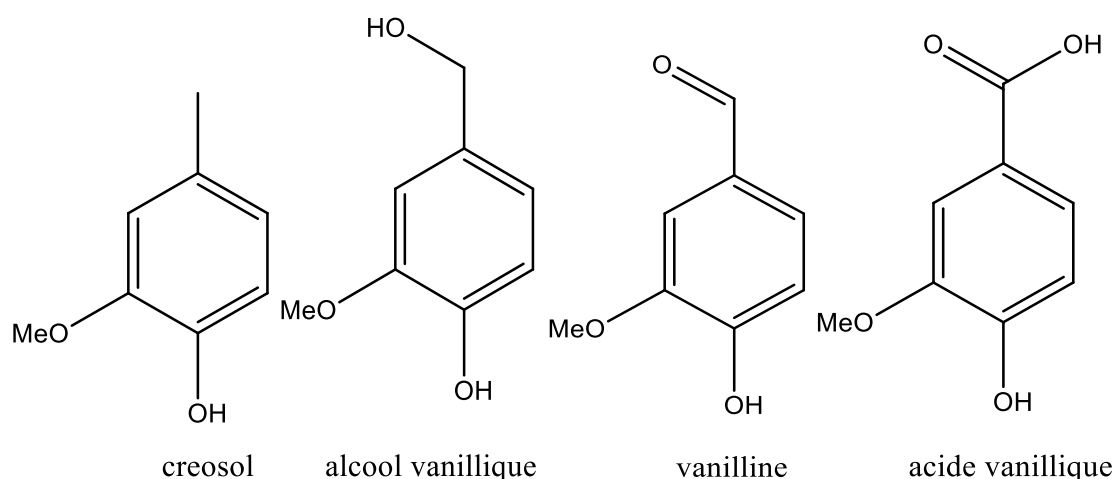


Figure 40 : Vanilline selon différents degrés d'oxydation de la fonction en para de l'hydroxyle phénolique

1. L'acide vanillique

L'acide vanillique présente les mêmes fonctions que l'acide férulique, si ce n'est que, dans le cas de l'acide vanillique, la fonction acide carboxylique est directement rattachée au noyau aromatique. Etudier la méthanisation de l'acide vanillique permet donc d'évaluer l'importance de la longueur de la chaîne carbonée reliant le phénol et la fonction acide carboxylique. La production de biogaz à partir de l'acide vanillique (5g/L d'inoculum) est présentée sur la Figure 41

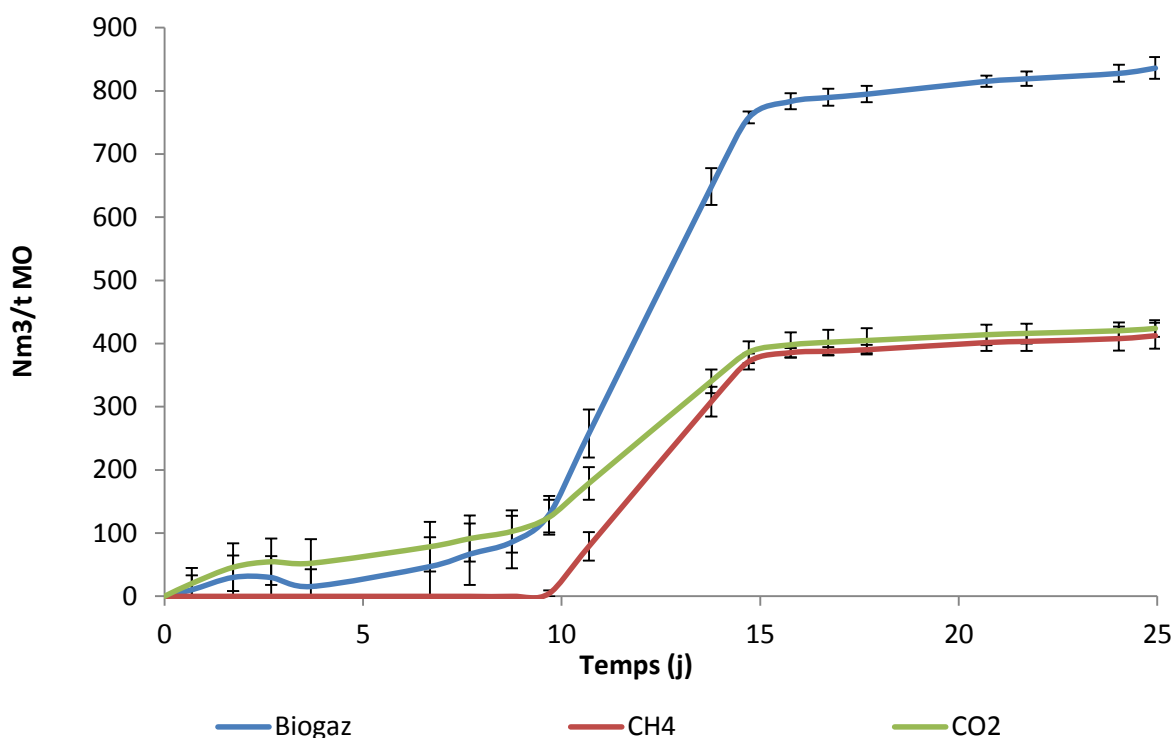


Figure 41 : Productions de biogaz, CH₄ et CO₂ à partir d'acide vanillique (5g.MO/L d'inoculum)

Après un temps de latence (9 j) légèrement plus court que celui lié à l'acide férulique (15 j) une production importante de biogaz est observée. Au bout de 25 jours de méthanisation, les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ à partir d'acide vanillique sont respectivement de 836 ; 420 et 416 Nm³gaz/t.MSV.

Grâce à la formule de Buswell associée à celle de l'acide vanillique (C₈ H₈ O₄), une production théorique de biogaz, de CO₂ et de CH₄ lié à sa méthanisation est calculée : respectivement 1091 ; 560 et 531 Nm³gaz/t.MSV. L'acide vanillique est donc transformé en biogaz à échelle de 77% par méthanisation, et la production réelle de CH₄ correspond à 78% de la production de la production théorique.

Ces chiffres confirment ce qui a été mis en évidence avec l'acide férulique : certaines molécules aromatiques, présentant un noyau phénolique, peuvent être transformées en biogaz par digestion anaérobie, à condition qu'elles présentent une fonction acide carboxylique en para de l'hydroxyle phénolique.

D'autre part, l'acide vanillique est peu soluble dans l'eau au contraire de l'acide férulique. A la différence de ce qui est avancé par (Eva Palmqvist et Hahn-Hägerdal 2000) et Hernandez & Edyvean (2008) dans le cas de la fermentation, la solubilité de la molécule aromatique semble avoir peu d'importance pour la méthanisation. Encore une fois, les études

sur la fermentation pour la production de bioéthanol, ne sont pas directement applicables à la méthanisation.

Barakat et al. (2012), supposent que la vanilline est peu transformée en méthane du fait de sa transformation rapide en phénol au sein du digesteur anaérobie. L'acide vanillique étant assez proche, chimiquement parlant, de la vanilline, sa transformation en biogaz doit suivre une voie de biodégradation différente durant laquelle la production de phénol est absente ou avec une cinétique lente. Il convient, dans un premier temps, de valider les résultats obtenus avec la vanilline en utilisant le même inoculum que pour les acides vanillique et férulique.

2. La vanilline

La vanilline (Figure 40) ne diffère de l'acide vanillique que par la présence d'une fonction aldéhyde à la place de l'acide carboxylique. Son impact sur la méthanisation est évalué par TPM à une concentration de 5g/L d'inoculum.

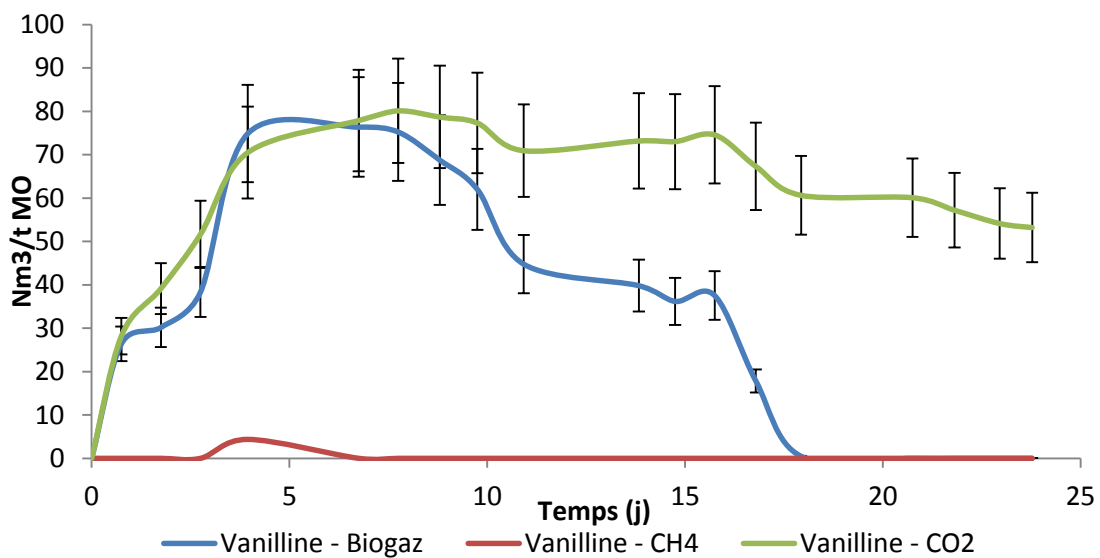


Figure 42 : Production du biogaz, CH₄ et CO₂ à partir de vanilline (5g.MO/L d'inoculum)

Après 25 jours d'analyse par TPM (Figure 42), une inhibition apparaît, mise en évidence par l'effondrement des productions de biogaz total et CO₂. De plus, l'aspect « chaotique » de la courbe de production, amène à penser que la concentration limite avant inhibition est très proche de 5g/L.inoculum pour la vanilline. En début de TPM, une production a quand même été observée : les productions maximum de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ à partir de la vanilline sont respectivement de 76 ; 80 et 4 Nm³gaz/t.MSV. La production de méthane à partir

de vanilline, peut donc être considérée comme nulle. Par ailleurs, la formule brute de la vanilline ($C_8H_8O_3$) permet de calculer une production théorique de biogaz total, CO_2 et CH_4 lié à sa méthanisation (formule de Buswell) : respectivement 1204 ; 581 et 624 Nm^3 gaz/t.MSV. Ce qui signifie que la vanilline a été peu transformée en biogaz (6%).

Malgré une faible transformation en biogaz de la vanilline, dans un premier temps, il semble qu'à cette concentration, celle-ci devienne un inhibiteur de la méthanisation. En comparant le TPM de la vanilline à celui de l'acide vanillique (77% de transformation en biogaz), la présence du groupe acide carboxylique plutôt que aldéhyde semble favoriser la méthanisation des molécules aromatiques « simples ».

A une concentration en vanilline plus faible (2g/L.inoculum) un rendement positif (17%) de production de méthane a été observé (Barakat et al. 2012), un effet de seuil pour l'inhibition liée à la vanilline a donc été mis en évidence. Par ailleurs, le syringaldéhyde (Figure 43), qui ne diffère de la vanilline que par la présence d'un second méthoxy en ortho de l'hydroxyle phénolique, a été testé vis-à-vis de la méthanisation (Barakat et al. 2012). A la concentration étudiée (2g/L.inoculum), cette molécule est « facilement » transformée en méthane (rendement = 84%).

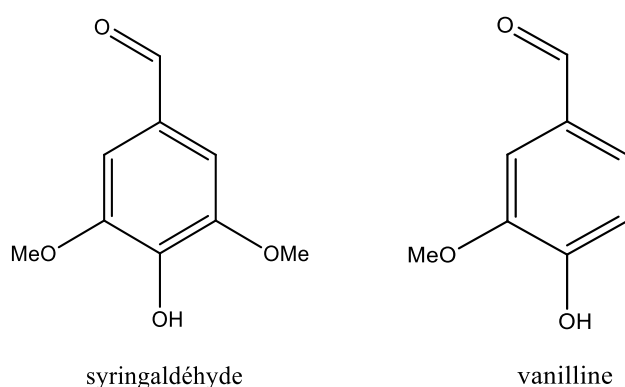


Figure 43 : Formules développées du syringaldéhyde et de la vanilline

Une voie de dégradation différente que celle des acides férulique et vanillique doit être considérée dans le cas de la vanilline. L'oxydation de l'aldéhyde en acide carboxylique, ne peut pas avoir lieu en milieu anaérobie (milieu réducteur), mais sa réduction entraînant la formation d'alcool vanillique est à envisager.

3. L'alcool vanillique

L'alcool vanillique (Figure 40) a été mis en tant que substrat seul dans un digesteur anaérobie, mais la production liée au mélange inoculum-substrat étant plus faible que celle du blanc, la production du blanc n'a pas été retranchée (Figure 44).

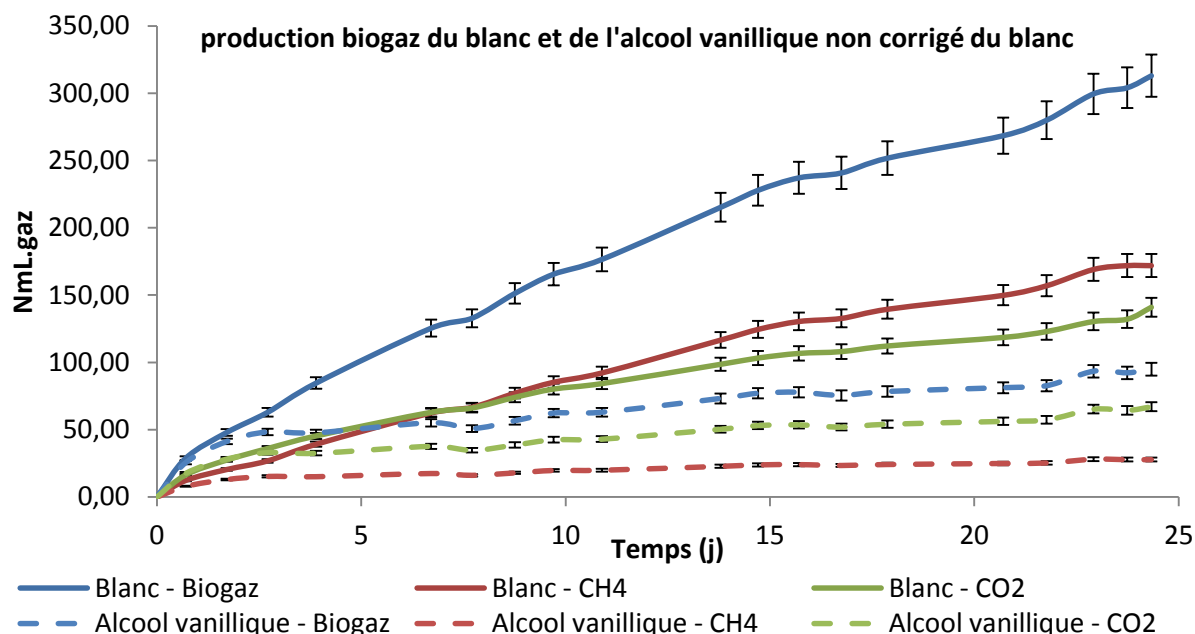


Figure 44 : Production du biogaz total, CO₂ et CH₄ à partir du blanc et de l'alcool vanillique non corrigé du blanc (5g.MO/L d'inoculum)

Après 25 jours de méthanisation, les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ sont respectivement de 313 ; 141 et 172 NmL.gaz tandis que pour le mélange inoculum-alcool vanillique, les productions respectives sont 95 ; 67 et 28 NmL.gaz. Ces chiffres attestent d'une inhibition de la méthanisation liée à l'alcool vanillique, celle-ci impacte aussi bien la production de dioxyde de carbone que celle de méthane.

Ce résultat, nouveau par rapport à l'étude de Barakat et al. (2012), montre que la réduction de la vanilline en alcool vanillique (plutôt qu'en phénol) peut expliquer le faible rendement de méthanisation de la vanilline, voir le caractère légèrement inhibiteur de cette dernière, à concentration élevée.

4. L'alcool vératrylique

Afin de différencier le rôle de l'hydroxyle phénolique de celui de l'hydroxyle aliphatique porté par la chaîne en para du phénol, l'alcool vératrylique et le créosol (Figure 45) ont été placés séparément en présence de l'inoculum (5g/L d'inoculum).

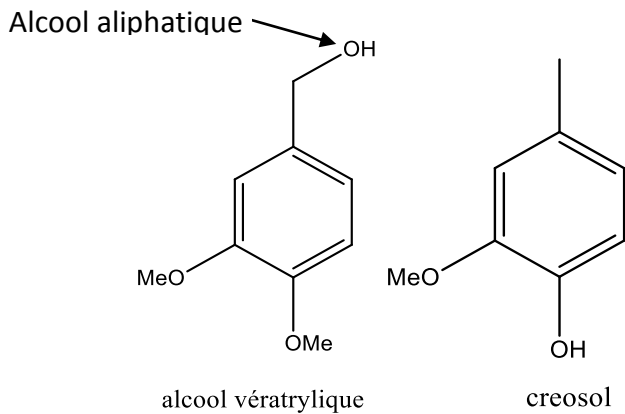


Figure 45 : Formules développées de l'alcool vératrylique et du créosol

De la même façon que pour l'alcool vanillique, la production du mélange inoculum-alcool vératrylique entraîne une production de biogaz plus faible que l'inoculum seul (blanc). La courbe de production de biogaz liée au mélange créosol-inoculum n'est donc pas retranchée de la courbe liée au blanc (Figure 46).

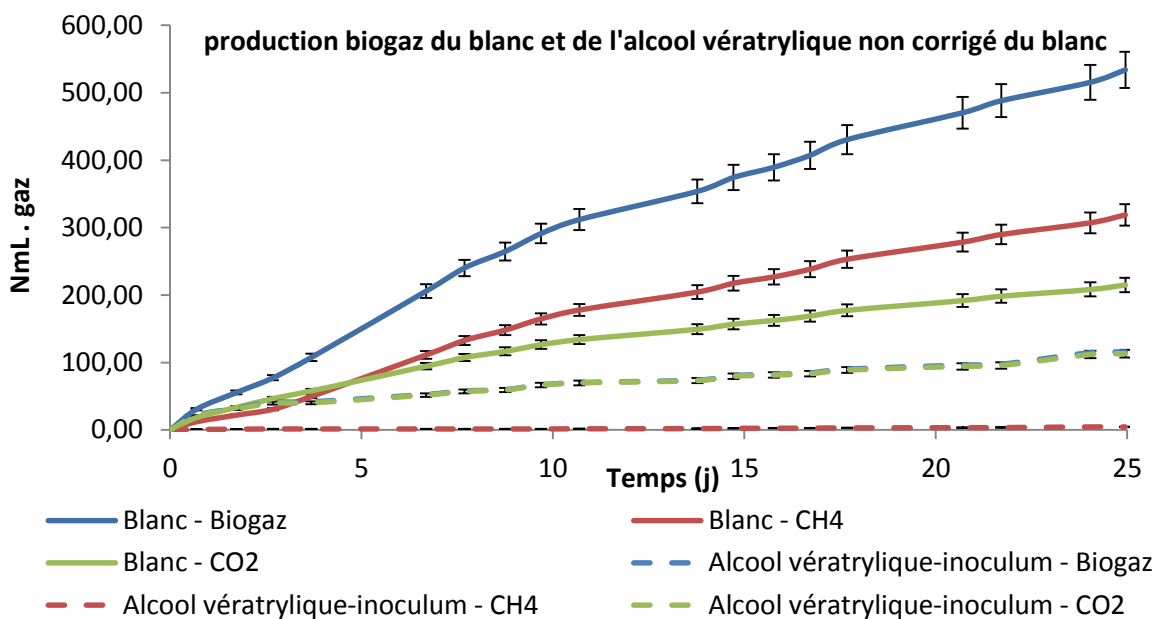


Figure 46 : Production de biogaz total, CH₄ et CO₂ du blanc et du mélange inoculum-alcool vératrylique non corrigé du blanc

Après 25 jours de méthanisation, les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ sont respectivement de 533 ; 215 et 318 NmL.gaz pour le blanc tandis que pour le mélange inoculum-alcool vératrylique, les productions respectives sont 116 ; 113 et 3 NmL.gaz. Ces chiffres mettent en évidence une inhibition de la méthanisation liée à l'alcool vératrylique. Par ailleurs, la production de méthane semble être plus impactée par l'alcool vératrylique que

celle de dioxyde de carbone. C'est donc l'étape de méthanogenèse qui doit être la plus touchée par cette molécule.

Une inhibition de la méthanisation est toujours observée en présence d'alcool véricatrylique alors même que l'hydroxyle phénolique a été remplacé par un méthoxyle. Dans le cas présent, l'alcool aliphatique joue peut être le même rôle que celui de l'hydroxyle phénolique dans le cas de l'alcool vanillique.

5. Le créosol

Afin d'étudier l'impact du phénol seul, et en conservant une molécule proche de la vanilline, l'effet du créosol (Figure 45) sur la méthanisation a été étudié (5g/L d'inoculum).

De la même façon que pour l'alcool vanillique, la courbe de production de biogaz liée au mélange créosol-inoculum (Figure 47) n'est pas retranchée de la courbe du blanc car elle est inférieure à celle-ci.

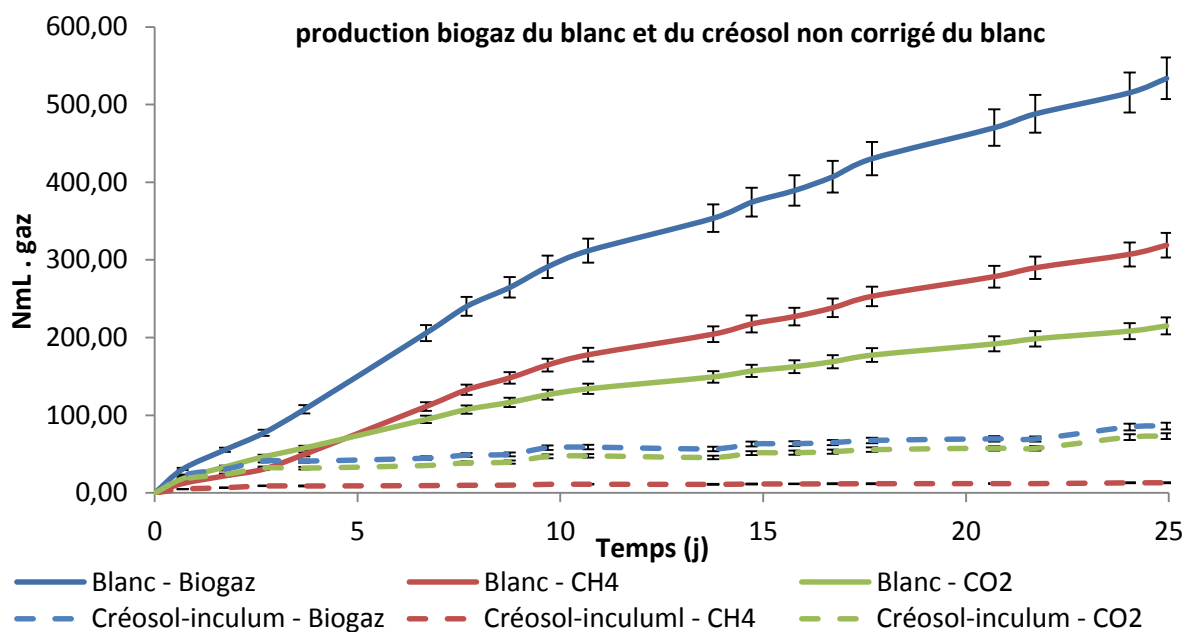


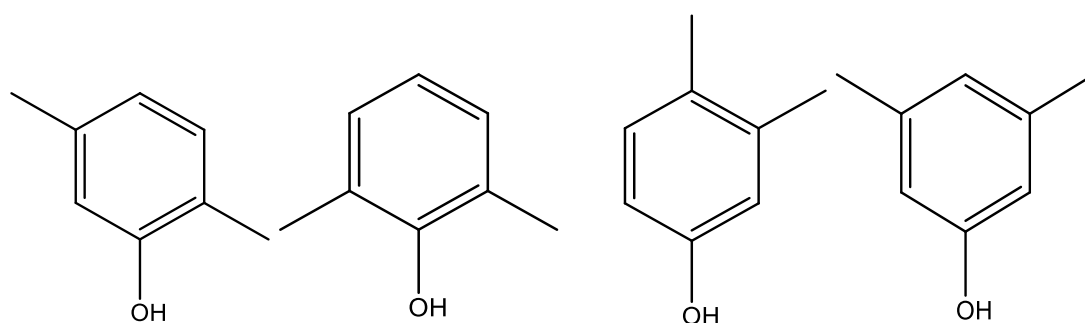
Figure 47 : Production de biogaz total, CO₂ et CH₄, du blanc et du mélange créosol-inoculum non corrigé du blanc

Après 25 jours de méthanisation, les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ sont respectivement de 533 ; 215 et 319 NmL.gaz tandis que pour le mélange inoculum-créosol, les productions respectives sont de 86 ; 73 et 13 NmL.gaz.

Ces résultats montrent qu'il y a bien inhibition de la méthanisation par le créosol. Le carbone seul en position para de l'hydroxyle phénolique ne permet donc pas de contrecarrer l'effet inhibiteur du phénol sur la méthanisation.

D. Conclusion sur les molécules aromatiques

Les effets des différentes molécules aromatiques testées sur la méthanisation sont recensés dans le Tableau 21. D'après (Fedorak & Hrudey 1984) le phénol n'est pas un inhibiteur de la méthanisation à une concentration inférieure à 1,2g/L d'inoculum et le devient au delà de cette valeur, mais les 2,5- 2,6- 3,4- 3,5-diméthylphénols le sont à partir de 0,5g/L d'inoculum.

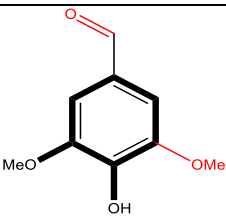
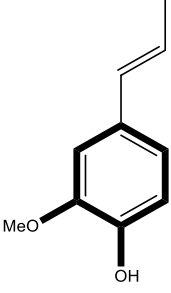
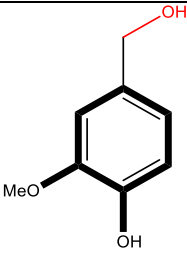
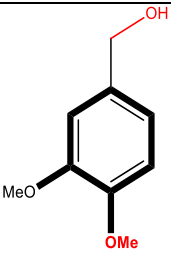
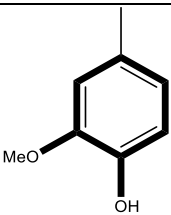


2,5-diméthylphénol 2,6-diméthylphénol 3,4-diméthylphénol 3,5-diméthylphénol

Figure 48 : Formules développées des 2,5- ; 2,6- ; 3,4- et 3,5-diméthylphénols

Tableau 21 : Impact de différentes molécules aromatiques sur le rendement en biogaz par méthanisation

molécule	formule	Rendement en biogaz total	Rendement en CH ₄
Acide férulique 5g/L		73%	64%
Acide vanillique 5g/L		77%	78%
Vanilline 5g/L		6%	0%
Vanilline 2g/L		Non communiqué (Barakat et al. 2012)	17% (Barakat et al. 2012)

molécule	formule	Rendement en biogaz total	Rendement en CH ₄
Syringaldéhyde 2g/L		Non communiqué (Barakat et al. 2012)	84% (Barakat et al. 2012)
Isoeugénol 5g/L		inhibiteur	Inhibiteur
Alcool vanillique 5g/L		inhibiteur	Inhibiteur
Alcool vératrylique 5g/L		inhibiteur	Inhibiteur
Créosol 5g/L		inhibiteur	Inhibiteur

Dans notre étude, la concentration en molécule aromatique est de 5g/L d'inoculum, afin de se situer au dessus du seuil d'inhibition lié au phénol. Pour l'acide vanillique et l'acide férulique, présentant un acide carboxylique porté par une chaîne carbonée (respectivement 1 et 3 carbones) en para de l'hydroxyle phénolique, la méthanisation est presque complète. D'autre part la vanilline et le syringaldéhyde, présentant un aldéhyde en para de la fonction hydroxyle du phénol, sont aussi des substrats méthanisables (rendement respectifs en méthane : 17% et 84%) à une concentration de 2g/L.inoculum (Barakat et al. 2012). Par contre la vanilline devient un léger inhibiteur de la méthanisation à partir de 5g/L.inoculum.

La fonction acide carboxylique en para de l'hydroxyle phénolique semble permettre une dégradation anaérobie presque totale des molécules présentant un noyau phénolique. A plus faible raison l'aldéhyde en para semble aussi favoriser leur méthanisation lors de concentration plus faible, son impact est nettement plus important avec un groupe méthoxyle en ortho de l'hydroxyle phénolique.

D'autres groupements ont été testés en position para de l'hydroxyle phénolique :

- $\phi\text{-CH}_2\text{-OH}$
- $\phi\text{-CH}_3$
- $\phi\text{-CH=CH-CH}_3$

Dans ces trois cas, les molécules obtenues sont des inhibiteurs de la méthanisation.

Par ailleurs, malgré le remplacement de l'hydroxyle phénolique par un groupe méthoxyle, l'alcool véricolique reste un inhibiteur de la méthanisation. L'hydroxyle phénolique n'est donc pas la seule fonction permettant d'expliquer le pouvoir inhibiteur de certaines molécules aromatiques.

Il est intéressant de noter l'importance du pH pour la méthanisation des molécules à noyau aromatique. Certaines expériences préliminaires ont été menées à $\text{pH} = 8,47$ pour l'acide férulique et l'acide vanillique. Le temps de latence avant le pic de production de CH_4 a fortement augmenté ($\approx 30\text{j}$) et la production de biogaz est moins importante. Il semble donc important, pour les molécules à noyau aromatique, de surveiller le pH du digesteur anaérobie afin qu'il reste inférieur à 8.

Les molécules aromatiques présentant une fonction phénolique sont majoritairement des inhibiteurs de la méthanisation. Cependant, la présence d'une fonction oxydée, et à plus forte raison d'une fonction acide carboxylique, en para semble rendre ces molécules fortement biodégradables ($\approx 75\%$ de biodégradation). Une hypothèse qui reste à valider serait que cette fonction permette la reconnaissance de la molécule aromatique par une enzyme spécifique permettant son hydrolyse. Le temps de latence important (10-15j) avant le début d'une production de biogaz rapide, va dans le sens d'une adaptation du milieu liée à la production de cette/ces enzyme(s). De manière plus faible, l'aldéhyde en para du phénol semble aussi favoriser la transformation du phénol en biogaz. La présence de 2 groupements méthoxyle en ortho augmentant nettement la biodégradation de l'aldéhyde.

Chapitre III : Prétraitements physiques

A. Introduction

D'après les résultats obtenus au chapitre précédent, le rendement de la méthanisation de la paille de blé est directement lié à l'accessibilité de l'holocellulose aux enzymes des bactéries, naturellement présentes dans l'inoculum. Le but principal des prétraitements physiques est de déstructurer la biomasse afin d'augmenter l'accessibilité à l'holocellulose. Dans certains cas, une faible fraction de la paille est dégradée par ces prétraitements et devient soluble. Cette fraction solubilisée peut alors être considérée comme un effluent à traiter ou comme un coproduit méthanisable. Dans cette étude, elle ne sera pas séparée et sera valorisée par méthanisation.

Différents types de prétraitements physiques sont présentés dans ce chapitre :

- Le raffinage de type papetier
- La sonication
- Deux types de prétraitements thermiques : par convection (chauffage « traditionnel ») et exposition aux micro-ondes

B. Prétraitement mécanique : raffinage à la pile Valley

Le raffinage est un procédé papetier qui consiste à faire subir à la biomasse des contraintes mécaniques de compression, cisaillement et étirement. Il entraîne des changements morphologiques sur les fibres de cellulose : coupure, gonflement et fibrillation externe (libération de certaines microfibrilles de la couche externe tout en les conservant liées à la fibre). Il permet également l'hydratation des microfibrilles de cellulose. Dans le cas présent, le but du raffinage est d'augmenter la porosité de la paille ainsi que l'accessibilité à l'holocellulose pour favoriser sa digestion en milieu anaérobie.

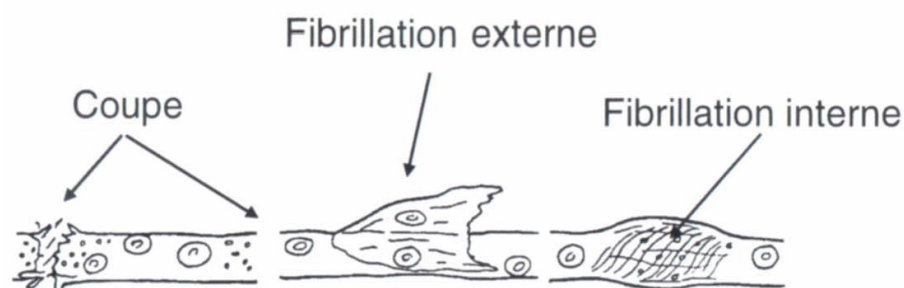


Figure 49 : Modification des fibres induites par le raffinage (Reynaud 2013)

La Pile Valley est un raffineur de laboratoire permettant de déstructurer la biomasse en présence d'eau (60g de paille dans 20L d'eau). La biomasse est écrasée entre les barres d'un cylindre en rotation (Figure 50) et une platine sur laquelle est accroché un contrepoids (5kg dans le cas étudié). Cette méthode permet un raffinage contrôlé, n'utilisant que de faible quantité de biomasse (60g).

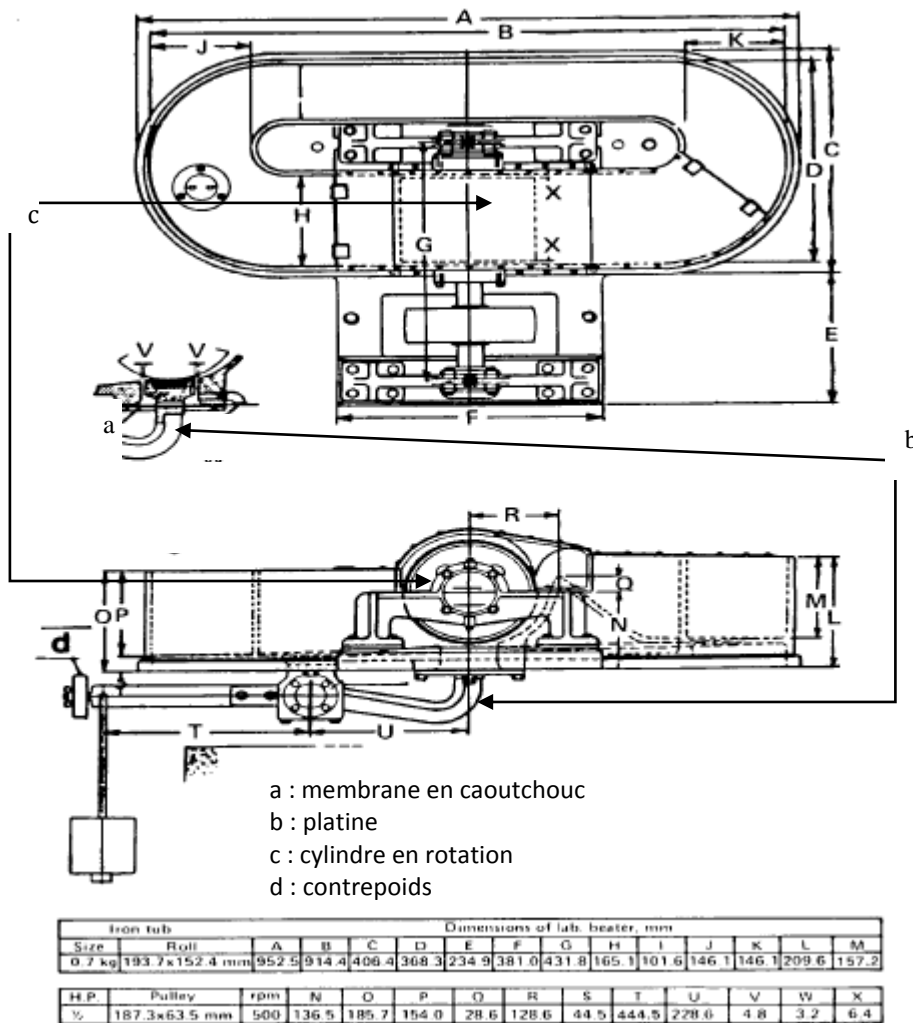


Figure 50 : Schéma de la pile Valley (TAPPI standard 2001 T 200 sp-01)

1. Impact du raffinage sur les caractéristiques de la paille de blé

Une analyse morphologique des fibres à l'aide de l'appareil Morphi (caméra haute résolution) a été effectuée sans succès du fait de la taille trop importante des fibres.

a) Analyse de la composition de la paille de blé

Après raffinage 83% de la paille raffinée est récupérée par filtration. Une partie de la paille de blé a donc été solubilisée (17%) ou réduite en particule de diamètre inférieur à 160 μ m par les actions conjuguées du trempage et du raffinage. La paille restante est analysée par la méthode Van Soest pour en connaître la composition (Figure 51). Afin d'évaluer les impacts respectifs du trempage préalable au raffinage et du raffinage à proprement parlé, un essai de trempage sans raffinage est réalisé pendant 12h dans de l'eau. Après filtration la perte de masse est de 16%. Le raffinage ne produit donc pas de nouveau fragment en plus de ceux déjà extraits par trempage de la paille brute.

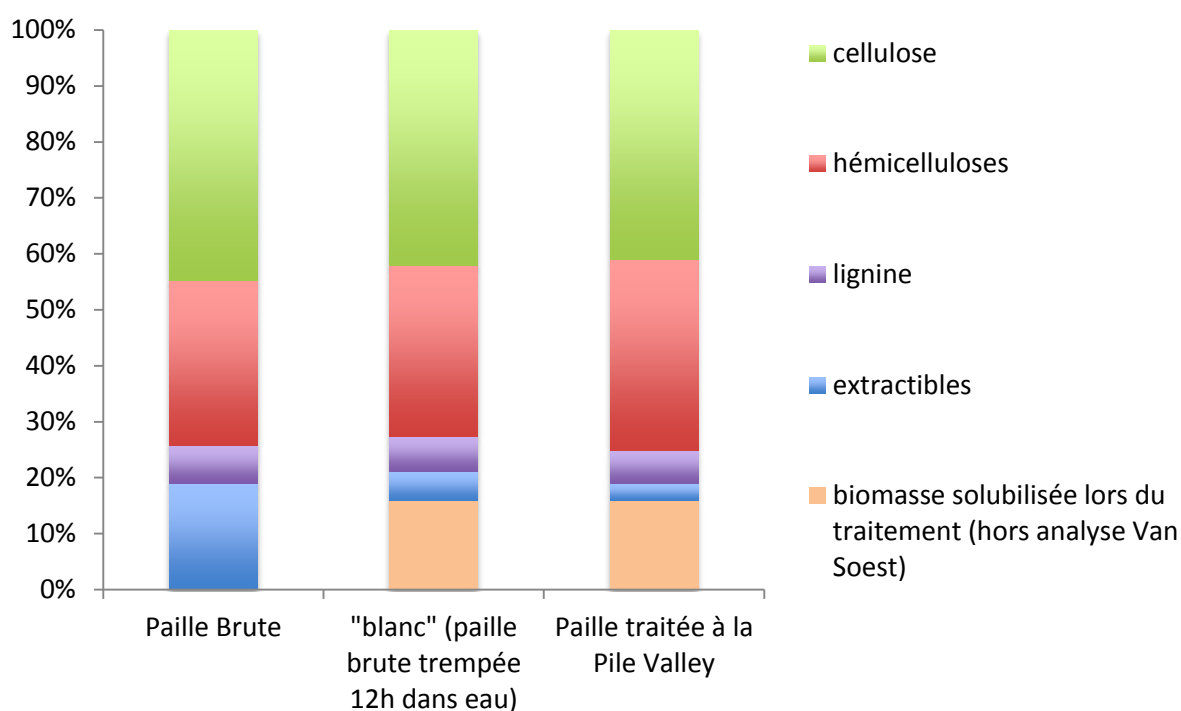


Figure 51 : Taux des différentes fractions de la paille brute en fonction du traitement (pile Valley 10min ou imbibition dans l'eau)

Le taux d'extractibles a diminué dans la paille brute après trempage puis traitement à la pile Valley : il est passé de 19% (paille brute) à 5% puis 3% respectivement après trempage ou trempage puis traitement à la pile Valley. La majorité des extractibles est donc solubilisée lors du trempage tandis que le raffinage n'extrait qu'une faible fraction des extractibles restants. Les taux d'hémicelluloses, cellulose et lignine sont restés stables : respectivement 30%, 31%, 34% pour les hémicelluloses ; 45%, 42%, 41% pour la cellulose et 7%, 6%, 6% pour la lignine. Le raffinage a donc très peu fragmenté les biopolymères de la paille.

Pour autant, des changements ont dû intervenir dans la structure de la paille de blé :

- Le raffinage doit entraîner une fibrillation externe des fibres de la paille, augmentant ainsi sa mouillabilité.
- En hydratant les portions cristallines des microfibrilles de cellulose, le raffinage doit diminuer la cristallinité de la paille.

b) Analyse de la mouillabilité à l'eau d'une pastille de paille de blé

Des mesures d'angle de contact ont été réalisées grâce au goniomètre sur des pastilles de paille brute ou après prétraitement, pour évaluer un éventuel changement dû au raffinage. Pour confectionner la pastille (Figure 52), de la paille a été compressée sous 200 kg/cm^3 dans une pastilleuse normalement utilisée pour préparer les pastilles de KBr nécessaire aux analyses par infrarouge.

Lors du dépôt de la goutte d'eau, son adsorption rapide ($t < 1$ seconde) dans la pastille entraîne un gonflement immédiat (Figure 52), rendant impossible le traitement quantitatif (par analyse numérique) permettant d'analyser son étalement. D'un point de vue qualitatif, les pastilles de paille brute et raffinées semblent absorber l'eau de la même manière.



Figure 52 : Pastille de paille de blé avant (gauche) et après (droite) dépôt de la goutte d'eau

L'analyse de la mouillabilité de la surface de la paille n'est donc pas possible avec cette méthode. Afin d'évaluer l'accessibilité de l'holocellulose aux enzymes, seuls les tests de potentiel méthanogène (TPM) seront utilisés.

c) Analyse de la cristallographie de la paille raffinée

La paille de blé est constituée de polymères amorphes (hémicelluloses et lignine) et de polymère organisé, par endroit, en zones cristallines (la cellulose). Il a été montré que les

zones amorphes de la cellulose sont plus sensibles aux attaques chimiques et enzymatiques que les zones cristallines (Kuhad, Singh, et Eriksson 1997; Jung et al. 1999).

L'analyse du taux de cristallinité est effectuée sur la paille par diffraction aux rayons X dont la courbe est présentée ci-dessous (Figure 53).

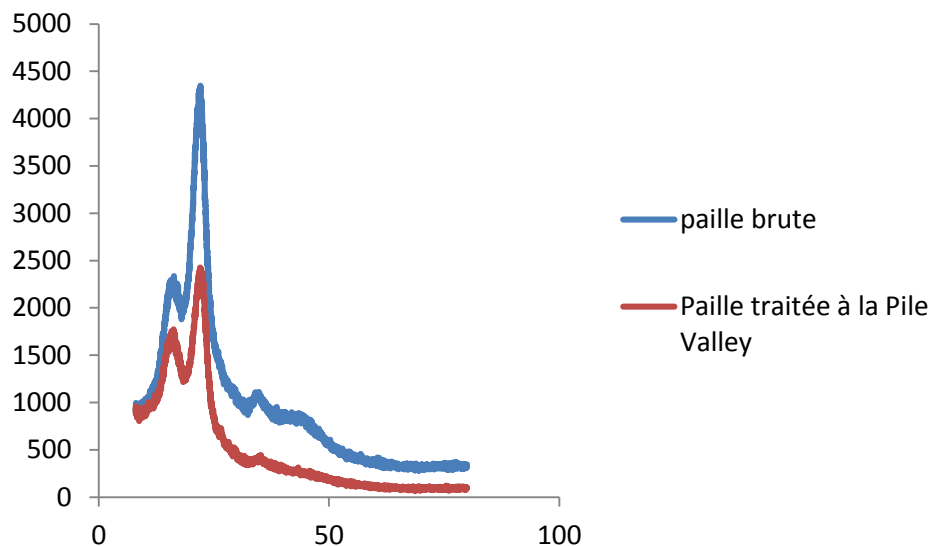


Figure 53 : Courbe de diffraction aux rayons X de la paille brute et de la paille raffinée à la Pile Valley.

L'analyse de ces courbes a permis d'en extraire la cristallinité globale de la paille avant et après raffinage (Tableau 22).

Tableau 22: Indice de cristallinité de la paille brute et de la paille raffinée à la Pile Valley, mesurée par diffraction aux rayons X.

Biomasse	Indice de cristallinité CrI (%)
Paille brute	57
Paille raffinée à la Pile Valley	50

L'indice de cristallinité de la paille a diminué sous l'effet du raffinage (trempage + pile Valley) en passant de 57% avant raffinage à 50% après. Par ailleurs, la seule perte des extractibles (amorphes) de la paille lors du raffinage aurait du faire augmenter l'indice de cristallinité global. Le raffinage a donc bien permis une hydratation des zones cristallines des microfibrilles de cellulose. La diminution de la cristallinité de la paille raffinée devrait être associée à une augmentation de sa digestibilité en milieu anaérobie.

d) Analyse DCO sur le filtrat

L'analyse de la DCO est une méthode rapide permettant d'évaluer l'évolution de la quantité de matière organique dans un liquide. Cette analyse a été réalisée sur les filtrats obtenus après trempage de la paille pendant 12h suivie ou non du traitement à la pile Valley.

La DCO observée sur le filtrat obtenu sans prétraitement est de 163 mg.O₂/L tandis qu'après prétraitement elle est de 165 mg.O₂/L. Ces valeurs n'étant pas significativement différentes, dans les conditions testées, le prétraitement à la pile Valley n'entraîne pas de solubilisation supplémentaire au trempage. Par contre le simple fait de laisser la paille s'imbiber d'eau pendant 12h favorise la libération de matière organique.

L'analyse de la DCO ne permet pas de connaître la nature des fractions solubilisées lors du trempage, mais il est raisonnable de penser qu'il s'agisse d'extractibles et de polysaccharides solubles.

2. Impact du raffinage à la pile Valley sur la méthanisation de la paille de blé

L'impact du raffinage sur la méthanisation de la paille de blé, a été évalué par des tests de potentiel méthane (TPM). Ils ont été effectués en parallèle sur de la paille brute et de la paille raffinée (10g/L d'inoculum).

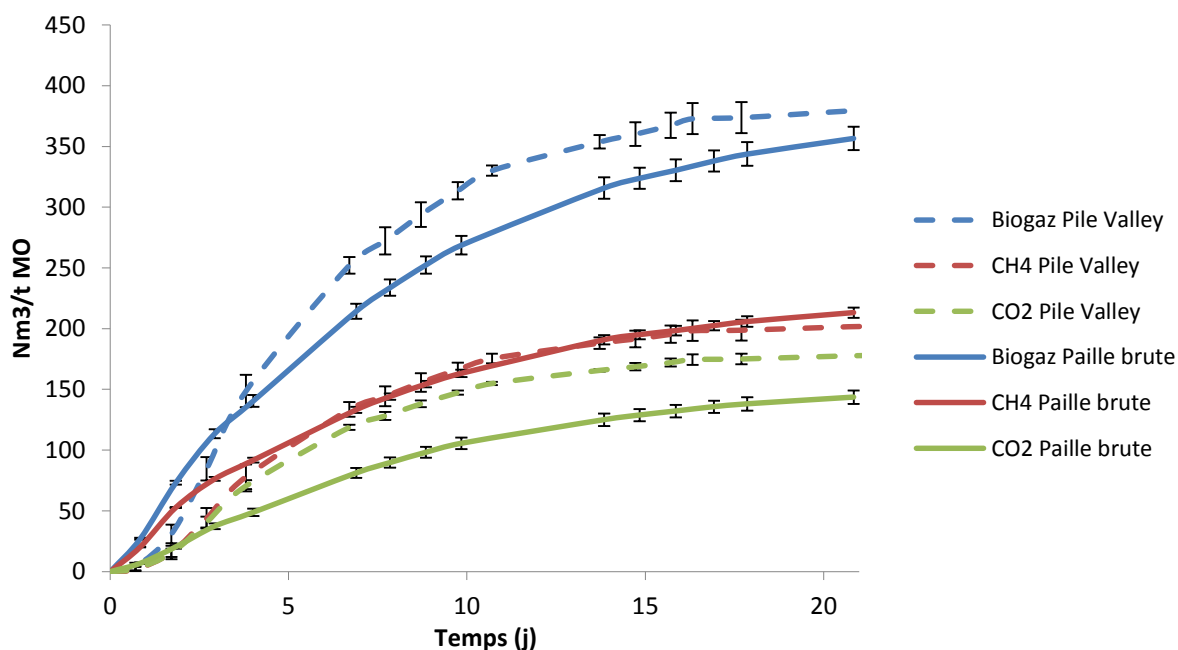


Figure 54 : Production de biogaz total, CO₂ et CH₄ à partir de paille brute et de paille traitée à la pile Valley

Au bout de 21 jours de méthanisation (Figure 54), les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ pour la paille brute sont respectivement de 357 ; 144 et 213 Nm³gaz/t.MSV,

tandis qu'après prétraitement de la paille à la pile Valley les productions sont respectivement de 382 ; 179 et 203 Nm³gaz/t.MSV. Aucun changement significatif n'est donc observé au niveau de la production de méthane après le prétraitement à la pile Valley. La très légère augmentation de production de biogaz après le prétraitement n'est due qu'à une augmentation de la production de CO₂, qui pourrait s'expliquer par une oxydation de la cellulose lors de l'hydratation des fractions cristallines.

La production de CH₄ n'augmentant pas suite au prétraitement à la pile Valley, il ne semble pas intéressant d'un point de vu énergétique. D'un point de vu cinétique, les productions de biogaz sont quasiment similaires avec ou sans prétraitement. La cinétique de méthanisation est directement liée au temps de séjour nécessaire à la dégradation de la biomasse dans le digesteur anaérobie, elle impacte donc la taille de ce dernier. Dans le cas présent, un tel prétraitement ne permettrait pas de diminuer la taille du digesteur. Un raffinage plus poussé devrait permettre de déstructurer plus finement la biomasse et de favoriser la méthanisation, mais il ne serait pas raisonnable sur un plan énergétique. Un exemple d'énergie liée au raffinage de pâte à papier kraft est donné dans l'étude de Lecourt et al. (2010), et est de 180kWh/t.pâte.

C. Prétraitement aux ultrasons

Un autre moyen de déstructurer la biomasse lignocellulosique, consiste à utiliser des ultrasons. Lors d'un traitement par sonication, des ondes de pression se propagent à travers le milieu, entraînant la formation de bulles de cavitation. En effet, lorsque la pression locale dans le liquide devient inférieure à la pression de vapeur saturante, de petites bulles se forment, elles grossissent puis implosent violemment lorsqu'elles atteignent leur taille critique. En éclatant, elles libèrent une quantité d'énergie mécanique importante sous forme de vague d'expansion et de compression (Tiehm et al. 2001). Cela entraîne des phénomènes de cisaillement importants au sein du milieu liquide-solide et localement la température et la pression peuvent atteindre des valeurs élevées.

D'autre part, les ultrasons peuvent entraîner la formation de radicaux libres (OH^\bullet , HO_2^\bullet , H^\bullet) ainsi que du peroxyde d'hydrogène par dissociation de l'eau (Carrère 2011), pouvant conduire à des réactions d'oxydation. La formation de radicaux est favorisée par les fréquences de sonication élevées (500-1000 kHz) tandis que les fréquences plus basses (20-40 kHz) favorisent les phénomènes de cisaillement (Tiehm et al. 2001).

Pour des raisons matérielles, seuls les ultrasons basses fréquences (20kHz) ont été testés lors du prétraitement de la paille de blé extraite. Pour limiter l'augmentation de la température lors de la sonication, le prétraitement aux ultrasons est effectué en alternant des phases de sonication (5min) et des phases sans ultrasons (5min) et ceci pendant 1h.

1. Impact du prétraitement aux ultrasons sur la composition de la paille de blé (Van Soest)

Afin de s'affranchir de l'action des ultrasons sur les extractibles, seule la paille extraite a été soumise à leur action. Ainsi seule la fraction lignocellulosique de la paille de blé est étudiée. Après sonication pendant 1h, 94% de la paille prétraitée est récupérée par filtration. Ce qui signifie que 6% de la paille de blé a été solubilisé ou réduite en particule de diamètre inférieur à 100 μm . La paille restante est analysée par la méthode Van Soest, afin de connaître sa composition (Figure 55).

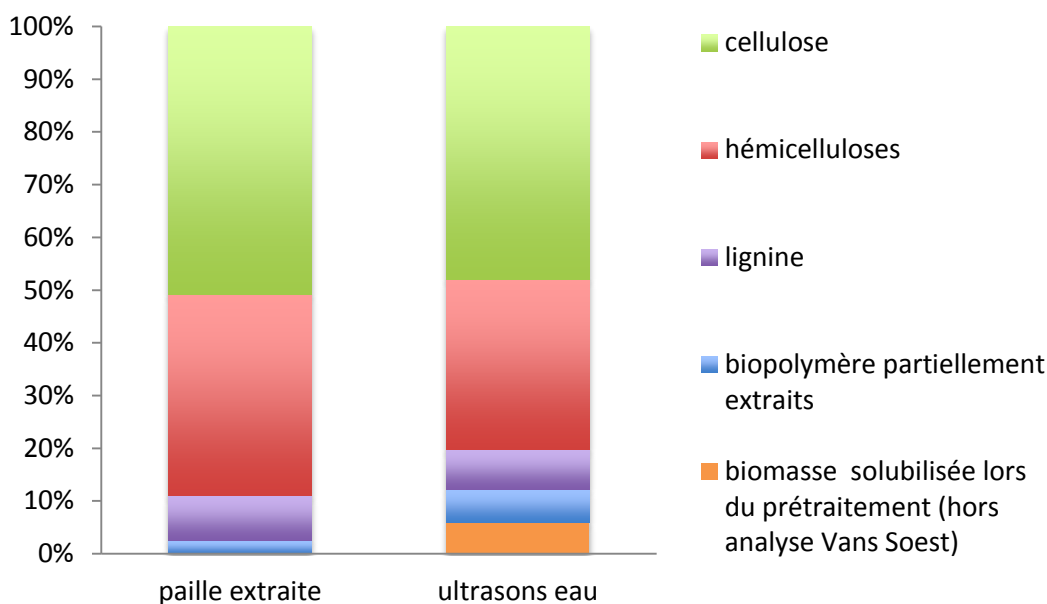


Figure 55 : Taux des différentes fractions de la paille extraite avant et après sonication dans l'eau (20kHz) pendant 1h

Lors de l'analyse Van Soest, une partie de la paille prétraitée apparaît comme des extractibles (6%), alors que le prétraitement a été effectué sur de la paille extraite. Lors de la sonication, une partie des polymères a donc été partiellement dégradée ou extraite sans être solubilisée, cette fraction doit être constituée majoritairement d'hémicelluloses, et doit être constituée de biopolymères partiellement extraits. En tenant compte de la fraction solubilisée et des polymères partiellement extraits, la sonication n'a déstructuré la paille qu'à hauteur de 12%. La fraction hémicellulosique étant la plus touchée par la sonication, elle représente 38% de la paille extraite contre 32% de la paille après sonication. La cellulose et la lignine semblent, par contre, moins touchées par la sonication puisqu'elles représentent respectivement 51% et 8,5% de la paille extraite et sont réduites à 48% et 7,6% après sonication. Malgré les changements de composition observés, il est difficile de mettre en évidence une modification structurale de la paille prétraitée et seul le TPM peut nous permettre de conclure sur l'accessibilité à l'holocellulose.

2. Impact du prétraitement aux ultrasons sur la méthanisation de la paille de blé

Les analyses TPM de la paille extraite non traitée et de la paille extraite prétraitée aux ultrasons pendant 1h ont été effectuées en parallèle. Après prétraitement, seule la fraction solide a été analysée par TPM. Le taux de fraction solubilisée étant faible, son impact sur la méthanisation est considéré comme négligeable.

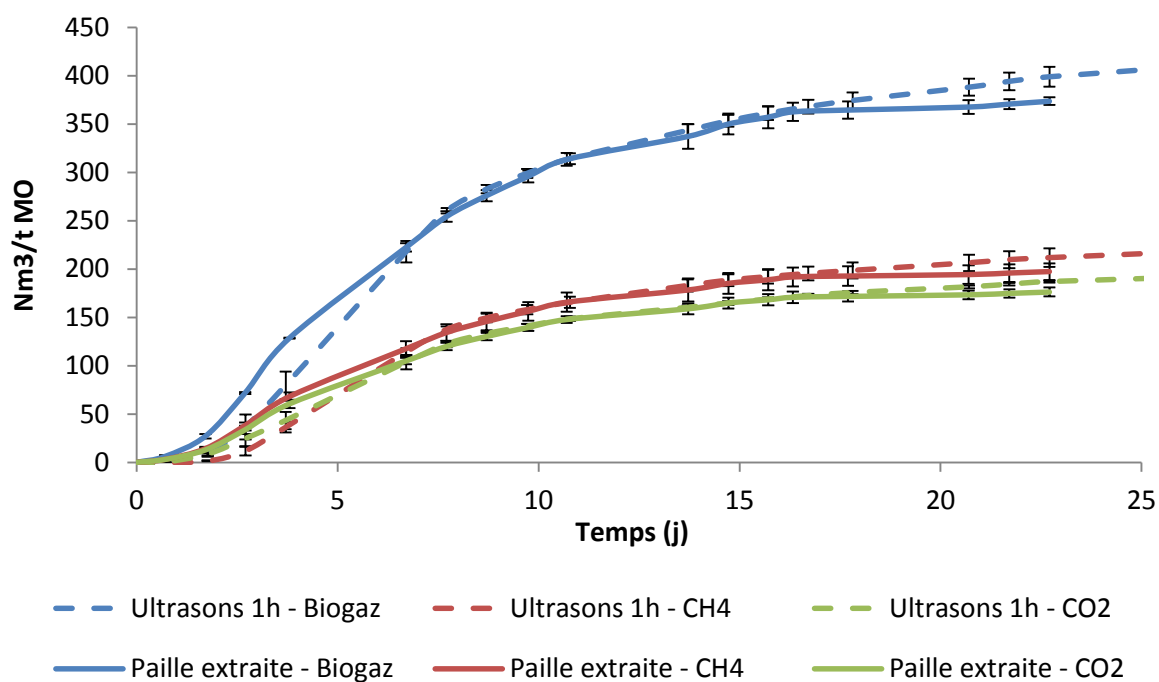


Figure 56 : Production de biogaz à partir de paille extraite et de paille traitée aux ultrasons pendant 1h (20kHz)

Après 23 jours de digestion anaérobie (Figure 56), les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ à partir de paille extraite sont respectivement 374 ; 176 et 197 Nm³gaz/t.MSV. Après prétraitement de la paille extraite aux ultrasons les productions sont respectivement de 399 ; 187 et 212 Nm³gaz/t.MSV. Aucun changement significatif n'est donc observé au niveau de la production de méthane, dioxyde de carbone ou biogaz total après le prétraitement aux ultrasons.

Ce prétraitement ne permet donc pas d'augmenter la production de méthane. D'un point de vue énergétique, il ne semble donc pas intéressant pour les biomasses lignocellulosique de type paille de blé.

D'un point de vue cinétique, les productions de biogaz sont quasiment similaires avec ou sans prétraitement. Il n'y a donc pas d'intérêt à ce prétraitement pour diminuer la taille du digesteur.

L'action des ultrasons seuls ne permet pas d'augmenter l'accessibilité à l'holocellulose de la paille de blé. Cependant, une déstructuration partielle a eu lieu puisqu'une partie lignocellulosique de la paille a été solubilisée.

D. Prétraitement thermique (chauffage par convection)

Le prétraitement thermique ou hydrolyse thermique est utilisé en laboratoire depuis les années 1970, pour altérer la structure de la biomasse lignocellulosique (Mosier et al. 2005; Carrère 2011). Le prétraitement majoritairement étudié est l'explosion à la vapeur. La biomasse est chauffée par de la vapeur à haute pression puis subit une décompression rapide. Les conditions testées nécessitent une quantité importante d'énergie (15-60min à 200-230°C). De plus ce prétraitement peut entraîner la formation de composés inhibiteurs de la méthanisation du fait de la libération de fractions de lignine de faible masse moléculaire.

Les prétraitements effectués au cours de ce travail visent à entraîner une dépense énergétique plus faible que l'explosion à la vapeur. D'autre part, cette étude est préliminaire à l'association du prétraitement thermique à un prétraitement chimique (alcalin) développé au chapitre IV. Elle permettra de différencier l'effet de la température de celui de la soude.

1. Impact du prétraitement thermique sur la composition de la paille

Après chauffage à 90°C pendant 1 heure, 81% de la paille prétraitée est récupérée par filtration, 19% de la paille de blé a donc été solubilisé ou réduite en particule de diamètre inférieur à 100µm. La paille récupérée est analysée par la méthode Van Soest, afin de connaître sa composition (Figure 57).

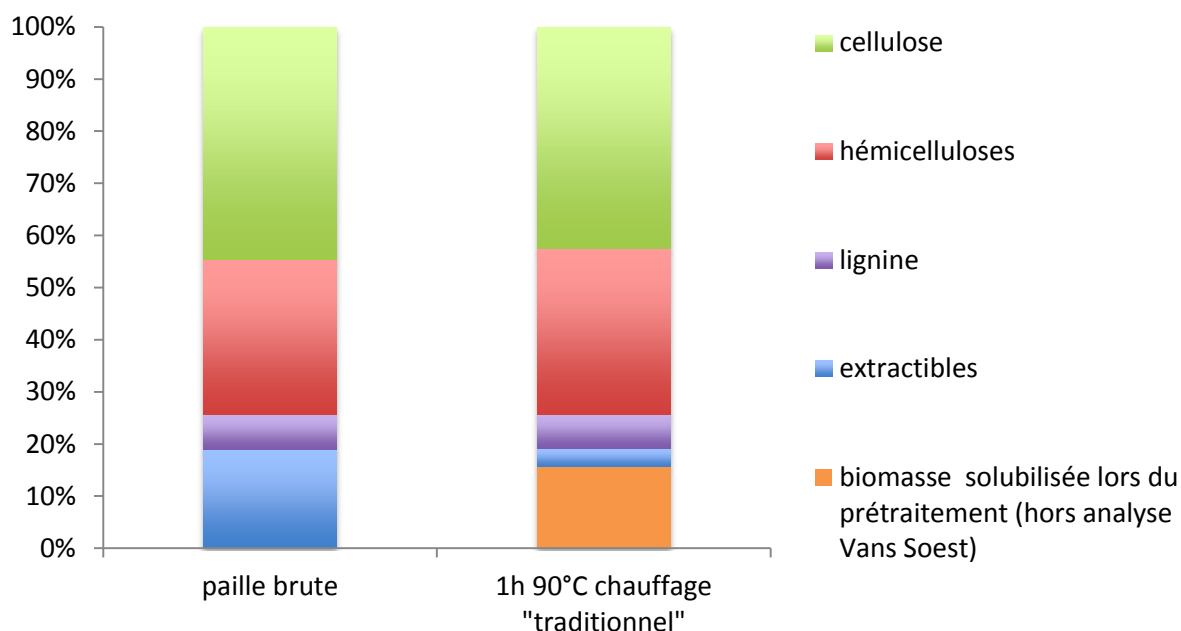


Figure 57 : Taux des différentes fractions de la paille brute avant et après cuisson dans l'eau à 90°C pendant 1h

Le taux d'extractibles a diminué dans la paille brute après chauffage à 90°C : il est passé de 19% (paille brute) à 4%. Les taux d'hémicelluloses, cellulose et lignine sont restés stables : respectivement 30%, 32% pour les hémicelluloses ; 45%, 42% pour la cellulose et 6,7%, 6,6% pour la lignine.

Le traitement de la paille par chauffage « traditionnel » dans l'eau à 90°C pendant 1 heure ne touche que les extractibles qui sont fortement solubilisés et extraits. L'intérêt de cette étude est de permettre un point de comparaison avec la cuisson aux micro-ondes à 90°C (paragraphe 0).

2. Impact du prétraitement thermique sur la méthanisation

Afin d'évaluer l'impact de la cuisson à l'eau (90°C) sur la méthanisation de la paille de blé, des tests de potentiel méthane (TPM) sont effectués en parallèle sur de la paille brute et de la paille traitée à chaud pendant 1h (10g/L d'inoculum). Pour des raisons de disponibilités matérielles, la mesure du TPM a été effectuée selon une autre méthode que dans le reste de la thèse. La production de gaz du TPM est mesurée en volume et non en pression, les valeurs de production de biogaz de la paille brute peuvent donc différer légèrement des données du reste de la thèse.

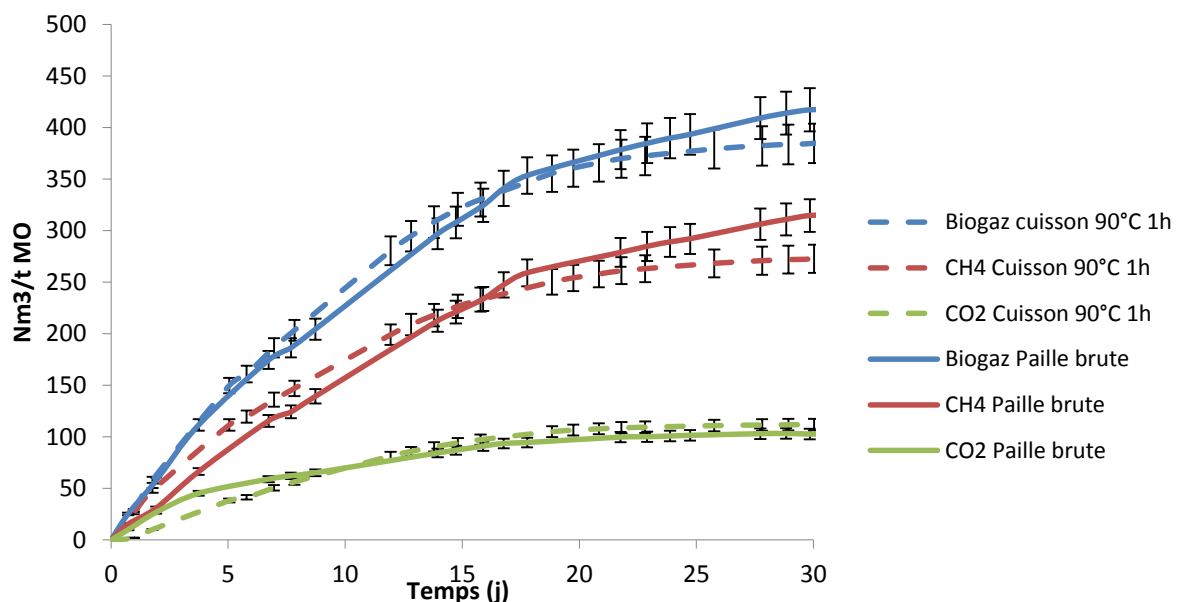


Figure 58 : Production de biogaz à partir de paille brute et de paille traitée à 90°C pendant 1h (chauffage « traditionnel »)

Après 30 jours de méthanisation (Figure 58), les productions de biogaz total, CO₂ et CH₄ à partir de paille brute atteignent respectivement 417 ; 103 et 315 Nm³gaz/t.MSV, tandis qu'après prétraitement thermique les productions sont respectivement de 370 ; 111 et 270 Nm³gaz/t.MSV. Aucun changement significatif n'est observable au niveau de la production de dioxyde de carbone après le prétraitement thermique. La légère augmentation de production de biogaz total est expliquée par celle de méthane, cependant celle-ci n'est que de 55 Nm³gaz/t.MSV, ce qui est faible au regard de l'imprécision de mesure (20 Nm³gaz/t.MSV).

Tant pour la production de méthane finale que pour la cinétique, ce prétraitement ne permet pas d'améliorer la méthanisation. Du point de vue énergétique ou pour la taille du digesteur anaérobie, il ne semble donc pas intéressant pour les biomasses lignocellulosiques, de type paille de blé.

E. Prétraitement thermique associé aux micro-ondes

Contrairement au prétraitement thermique classique où le transfert d'énergie à la matière met en jeu des phénomènes de convection, conduction et radiation, et où la chaleur est transmise selon un gradient thermique, le prétraitement par exposition aux micro-ondes permet de délivrer l'énergie directement au cœur de la matière. Cette différence de transfert d'énergie peut entraîner de nombreux avantages :

- En chauffant la matière directement au cœur, sans gradient de diffusion, le chauffage est plus homogène.
- En l'absence de perte d'énergie liée au transfert thermique, le chauffage par exposition aux micro-ondes peut permettre de diminuer l'énergie nécessaire au chauffage, ainsi que le temps de montée en température de la biomasse.

L'étude menée par David Jackowiak (2011) sur de la paille de blé chauffée à 150°C par micro-onde montre une augmentation de 28% de la production de méthane suite au prétraitement. Cependant, dans ce cas l'énergie consommée lors du prétraitement n'est pas contrebalancée par l'apport énergétique lié à la méthanisation. Afin de diminuer l'impact énergétique du prétraitement, la température limite est fixée à 90°C dans notre étude.

1. Impact du prétraitement aux micro-ondes sur la composition de la paille extraite

La biomasse prétraitée est de la paille extraite afin de ne travailler que sur la partie lignocellulosique de la biomasse. Après traitement aux micro-ondes à 90°C pendant 1h, 90% de la paille extraite prétraitée est récupérée par filtration. Par conséquent, 10% de la paille de blé a été solubilisé ou réduite en particule de diamètre inférieur à 100µm. La composition de la paille restante est analysée par la méthode Van Soest (Figure 59).

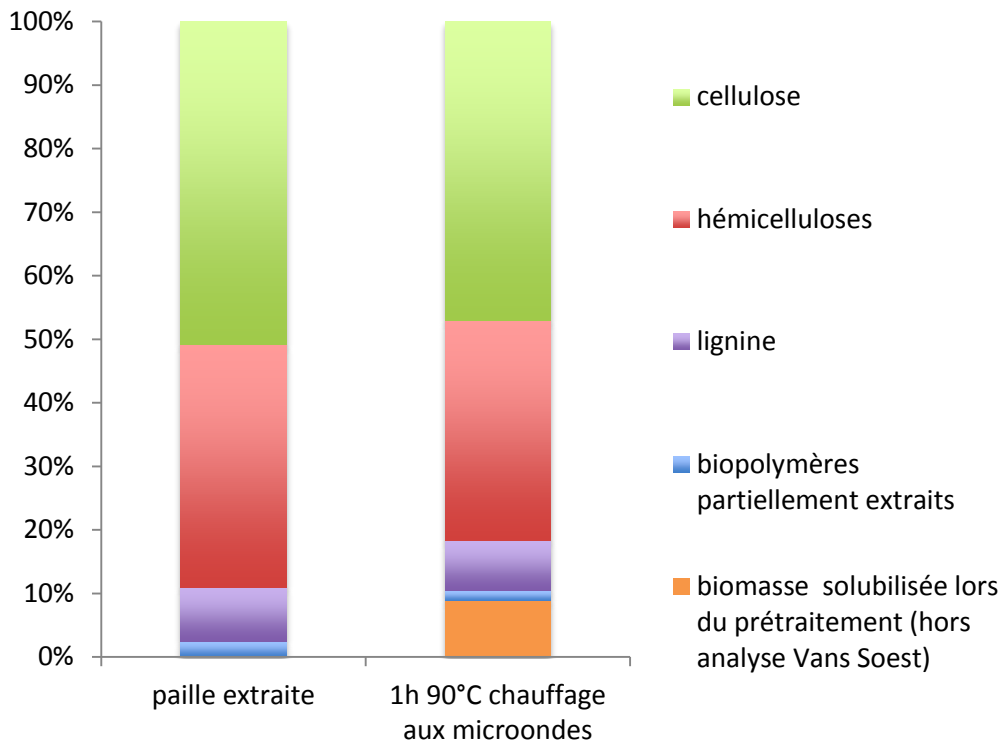


Figure 59 : Taux des différentes fractions de la paille extraite avant et après cuisson dans l'eau à 90°C pendant 1h par chauffage aux micro-ondes

Le taux d'extractibles résiduels dans la paille extraite est resté stable après cuisson aux micro-ondes à 90°C : 2%. Les taux d'hémicelluloses, cellulose et lignine ont légèrement diminué après chauffage aux micro-ondes : respectivement 38%, 35% pour les hémicelluloses ; 51%, 47% pour la cellulose et 8,5%, 7,9% pour la lignine.

Le traitement de la paille extraite, par cuisson aux micro-ondes dans l'eau à 90°C pendant 1h, n'entraîne qu'une très légère solubilisation de la fraction lignocellulosique de la paille de blé, en attaquant surtout la cellulose et les hémicelluloses.

2. Impact du prétraitement aux micro-ondes sur la paille

L'analyse du potentiel méthanogène de la paille prétraitée par exposition aux micro-ondes a été effectuée sur la fraction solide récupérée après prétraitement.

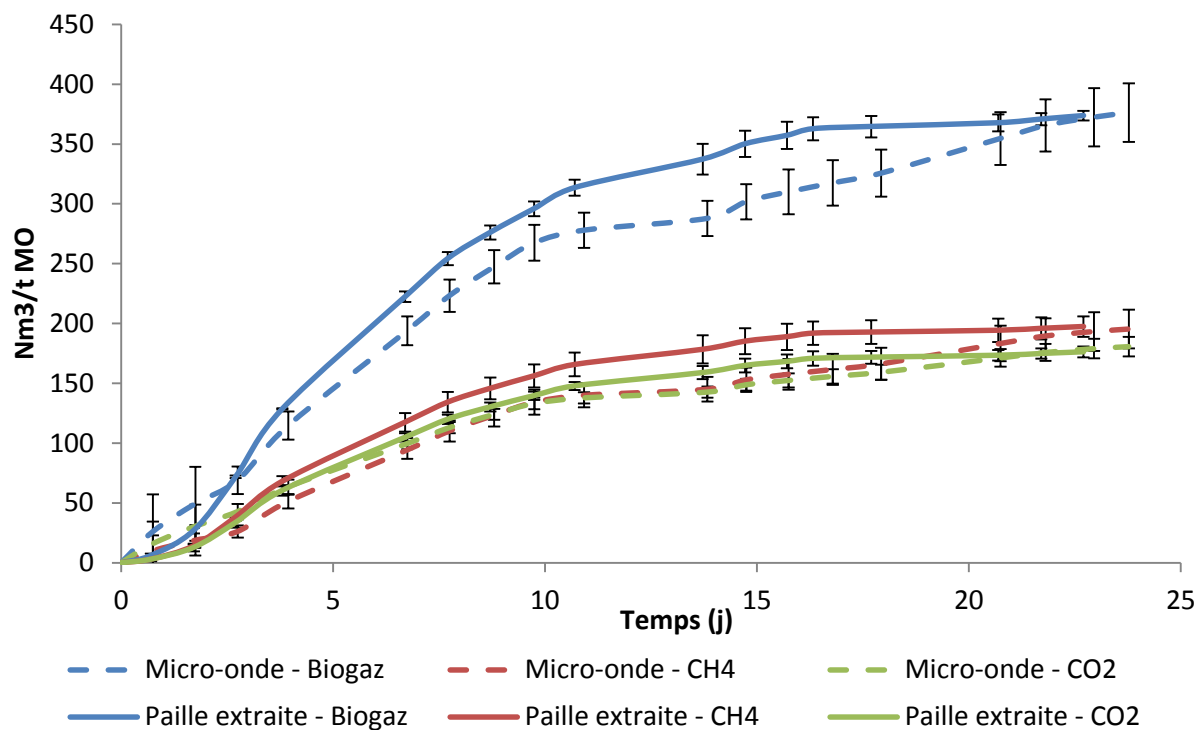


Figure 60 : Production de biogaz à partir de paille extraite et de paille traitée à 90°C pendant 1h (chauffage aux micro-ondes)

Au bout de 25j de méthanisation (Figure 60), les productions de biogaz total, CO₂ et CH₄ à partir de paille extraite sont respectivement 374 ; 176 et 197Nm³gaz/t.MSV, tandis qu'après prétraitement de la paille aux micro-ondes les productions sont respectivement 376 ; 179 et 195 Nm³gaz/t.MSV. Aucun changement significatif ne semble observable au niveau de la production de méthane, dioxyde de carbone ou biogaz total après le prétraitement thermique.

Ce prétraitement ne permet pas d'augmenter la production de méthane. D'un point de vue énergétique, il ne semble donc pas intéressant pour les biomasses lignocellulosique, de type paille de blé.

D'un point de vue cinétique, les productions de biogaz sont quasiment similaires avec ou sans prétraitement. Il n'y a donc pas d'intérêt à ce prétraitement pour diminuer la taille du digesteur.

F. Conclusion sur les prétraitements physiques

Les prétraitements physiques étudiés dans cette partie axés sur le raffinage, le chauffage, les ultrasons et les micro-ondes, n'apportent que peu ou pas d'amélioration, en termes de production de méthane, lors de la méthanisation de la fraction lignocellulosique de la paille de blé. D'un point de vue énergétique, ces prétraitements présentent donc un surcoût, qui n'est pas compensé par l'augmentation de la cinétique de méthanisation ou du potentiel final de production de méthane.

Ces prétraitements n'entraînent qu'une faible solubilisation de la fraction lignocellulosique de la paille de blé. Par contre, dans le cas du prétraitement thermique et du raffinage de la paille brute, la solubilisation de la majeure partie des extractibles est observée.

Néanmoins, l'absence de diminution de la production de biogaz, prouve que les molécules libérées par ces prétraitements ne sont pas des inhibiteurs, pouvant perturber la méthanisation, suite aux prétraitements physiques de la paille de blé.

Même si ces prétraitements physiques n'ont qu'un intérêt limité vis-à-vis de la méthanisation, ils peuvent augmenter l'impact de prétraitements chimiques. Le cas particulier du prétraitement alcalin, sera étudié au chapitre suivant (chapitre IV).

Chapitre IV : Prétraitements physico-chimiques

A. Introduction

Afin d'améliorer l'efficacité des prétraitements mécaniques, l'utilisation conjointe de produits chimiques semble la solution la plus adaptée. De même que pour les prétraitements mécaniques, le but des prétraitements chimiques est d'améliorer l'accessibilité de l'holocellulose aux enzymes responsables de leur hydrolyse en sucres.

Dans la mesure où le faible rendement et la faible cinétique de méthanisation de la paille de blé sont dus aux interactions lignine-holocellulose (chapitre I), le but des prétraitements chimiques est de dégrader ou de solubiliser la lignine. Deux types d'attaques chimiques ont été testés :

- Saponification des liaisons ester liant la lignine aux hémicelluloses par des traitements alcalins.
- Oxydation des cycles aromatiques au sein de la lignine pour la dégrader, en utilisant l'ozone.

Les premiers prétraitements visent donc à casser une partie des liaisons liant la lignine et l'holocellulose, entraînant la solubilisation d'une partie de la lignine. Tandis que le prétraitement oxydatif vise à dégrader la lignine de façon importante, tout en libérant dans le milieu liquide des « monomères » de lignine fortement oxydés. Ce dernier point est à prendre en compte puisqu'il a été montré (chapitre II) que certaines fractions de la lignine peuvent être de puissants inhibiteurs de la méthanisation.

L'impact des prétraitements alcalins sur la méthanisation et la composition de la paille a été évalué pour des prétraitements chimiques seuls (réaction à température ambiante sans agitation) ou en association avec des prétraitements physiques (chaleur, micro-onde, ultrasons). Deux réactifs alcalins ont été évalués : la soude et l'ammoniaque.

Une attention particulière a été portée au coût des produits chimiques liés aux prétraitements par rapport aux bénéfices liés à la production de méthane. De même une étude énergétique rapide a permis de fixer la limite énergétique à ne pas dépasser pour les prétraitements physiques associés aux prétraitements alcalins.

B. Prétraitements à la soude

Le traitement alcalin a été largement utilisé pour améliorer la digestibilité des matériaux lignocellulosiques par les ruminants (Datta 1981) ou pour la production de biocarburants. Le principal impact du traitement à la soude, sur la biomasse lignocellulosique, est la saponification des esters portés par les hémicelluloses (Datta 1981). Ces esters relient les hémicelluloses (associées à la cellulose) aux unités acétyles et hydroxycinnamique (Xu 2010) présentes dans la lignine, leur saponification entraîne donc un gonflement de la biomasse et l'augmentation de la taille des pores. La diffusion des enzymes permettant l'hydrolyse des polysaccharides est ainsi favorisée. Les substrats lignocellulosique peuvent donc être digérés en milieu anaérobie même si une partie de la lignine est encore présente.

Il a été montré que les prétraitements alcalins, à température élevée, entraînent la solubilisation de composés aromatiques dérivés de la lignine (Pavlostathis et Gossett 1985), qui peuvent agir comme des inhibiteurs de la méthanisation.

1. Limites fixées pour les prétraitements

Le prétraitement à la soude présente un coût lié aux installations (non pris en compte dans cette étude) mais aussi au réactif (la soude) et à l'énergie liée au chauffage. La concentration raisonnable pour la soude (en terme de prix) est estimée à 0,1 g.NaOH/g.paille extraite ce qui correspond à 0,05€ par kilogramme de paille traitée. Dans nos études, les prétraitements sont effectués en solution : 12g de paille dans 150mL de solution, la concentration en soude doit donc être de 0,2 mol/L.

L'énergie consommée par le chauffage lors du prétraitement, doit être contrôlée pour que le bilan énergétique de la méthanisation soit positif. Même si l'étude n'a pas été menée à l'échelle pilote et que le bilan énergétique est donc fortement simplifié, il m'a semblé nécessaire de tenir compte de l'énergie dépensée lors de certains traitements.

Tous les prétraitements présentés dans la suite de ce travail sont effectués sur de la paille extraite pour n'étudier que la fraction lignocellulosique de la paille de blé.

Pour fixer une limite énergétique pour le prétraitement de la paille de blé, il est nécessaire d'évaluer le gain de production de CH₄ raisonnablement attendu. Même si l'évolution de la qualité du biogaz (taux de CH₄ dans le biogaz) peut entraîner une variation du coût d'exploitation, du fait de sa purification, elle n'est pas prise en compte dans cette étude.

La formule de Buswell ne tenant pas compte du taux de matière minérale, le calcul est effectué sur la matière organique (MO) de la paille et non sur la paille brute. La production

maximale de biogaz à partir de paille est de $0,461 \text{ Nm}^3\text{CH}_4/\text{kg.paille}$ (MO). En considérant que la lignine de paille de blé ne peut être transformée en méthane, sa masse est retranchée à celle de la paille dans le calcul. La production de méthane théorique de la paille sans lignine est donc de $0,427\text{Nm}^3\text{CH}_4/\text{kg.paille}$ (MO). C'est ce chiffre qui est conservé pour le calcul du coût énergétique du prétraitement.

En se basant sur le pouvoir calorifique inférieur (PCI) du méthane ($50\text{MJ}/\text{kg.CH}_4$ soit $13,9\text{kWh}/\text{kg.CH}_4$), et la densité du méthane étant de $0,7\text{kg}/\text{Nm}^3$, la méthanisation de la paille peut libérer, au maximum $4,12\text{kWh}/\text{kg.paille}$ (MO). Pour tenir compte des dépenses énergétiques non prises en compte dans cette étude, la limite énergétique du prétraitement est fixée à la moitié de l'énergie libérable par la méthanisation de la paille de blé, soit $2\text{kWh}/\text{kg.paille}$ (MO).

2. Prétraitement à la soude à température ambiante (24°C)

a) Caractérisation de la biomasse selon la méthode Van Soest

Après le prétraitement de la paille extraite à la soude à température ambiante (24°C), 97,5% de la paille extraite prétraitée est récupérée par filtration, 2,5% de la paille de blé a donc été solubilisé ou réduite en particules de diamètre inférieur à $100\mu\text{m}$. La composition de la paille restante est analysée par la méthode Van Soest (Figure 61).

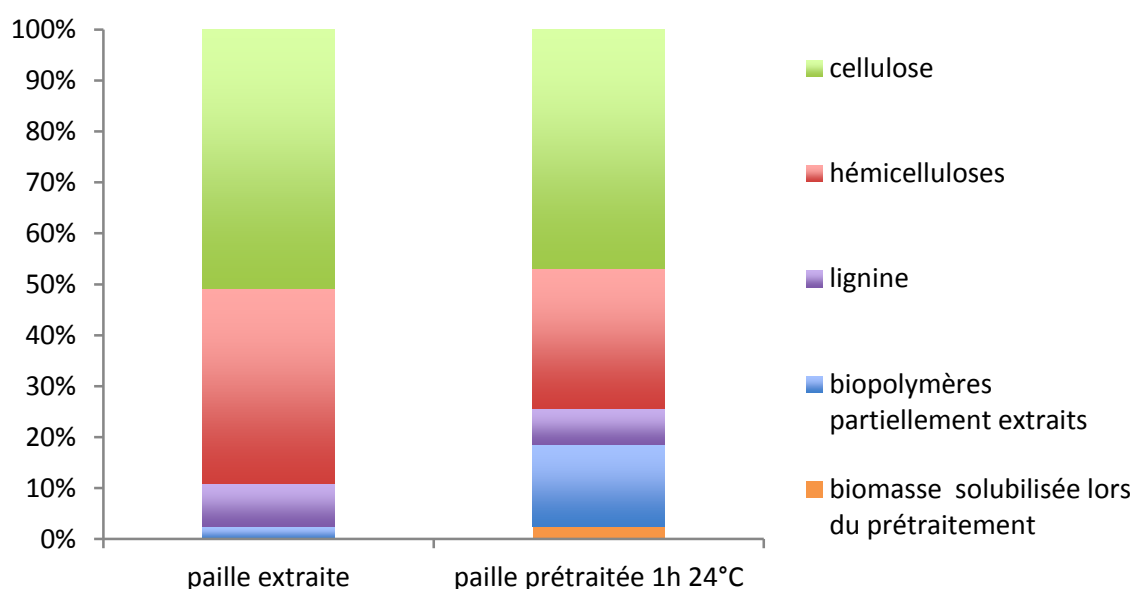


Figure 61 : Taux corrigés des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à la soude ($0,2\text{mol}/\text{L}$) pendant 1h à 24°C

Le taux d'extractibles résiduels après prétraitement est de 2% ce qui est négligeable. Comme le prétraitement est effectué sur de la paille extraite, la fraction retirée lors de l'étape NDF ne doit pas être constituée d'extractibles mais de petites fractions de lignine ou d'holocellulose partiellement extraites par le prétraitement. Cette fraction est donc nommée « biopolymères partiellement extraits » dans la suite de l'étude sur les prétraitements physico-chimiques.

Le taux de cellulose est resté relativement stable malgré une faible diminution : 51% avant prétraitement et 47% après prétraitement à température ambiante (24°C). Par contre, une diminution du taux d'hémicelluloses est nettement observée après traitement : il passe de 38% à 27%. Enfin le taux de lignine a légèrement diminué en passant de 8,5% à 7,1% ce qui représente une perte de 16% de la lignine. Les polymères partiellement dégradés se retrouvent dans la fraction apparentée aux extractibles. L'analyse des sucres et dérivés phénoliques (provenant de la lignine dégradée) dans cette fraction est cependant difficile en raison de la présence de beaucoup de produits, initialement présents dans la solution pour NDS.

Même si le prétraitement à la soude à température ambiante touche plus les hémicelluloses que la lignine, la porosité de la paille extraite a vraisemblablement augmenté. Cependant, comme montré au chapitre III cela est difficile à prouver, c'est donc avec les TPM que l'accessibilité à l'holocellulose sera évaluée. Par ailleurs, une fraction non négligeable des polysaccharides provenant des hémicelluloses a été solubilisée, et pourrait être un substrat d'intérêt pour la méthanisation. L'impact de l'injection de la fraction solubilisée dans le digesteur anaérobie doit donc être évalué. A cette fin, les TPM sont effectués sur la fraction solide résiduelle et sur la fraction solubilisée lors du prétraitement.

b) Potentiel méthanogène de la paille prétraitée

Deux TPM sont effectués sur de la paille extraite prétraitée pour évaluer l'impact du prétraitement à la soude à température ambiante (Figure 62). Pour un des deux TPM, la paille extraite prétraitée est mélangée à la fraction solubilisée lors du prétraitement (préalablement lyophilisée) ; pour l'autre, seule la fraction solide après prétraitement est analysée. Dans chaque cas, la concentration en matière organique est de 10 g.MO/L d'inoculum.

Il a été montré dans le chapitre I que la production de biogaz à partir de lignine extraite de la paille est nulle, mais que la lignine n'est pas inhibitrice vis-à-vis de la méthanisation. La

production théorique de la paille extraite est donc calculée selon la formule de Buswell, en retranchant la production théorique liée à la lignine. La paille extraite peut théoriquement permettre la production de biogaz, constitué de CO₂ et CH₄, respectivement 806 ; 379 et 427 Nm³gaz/t.MSV. Ces valeurs seront utilisées pour le reste de ce travail.

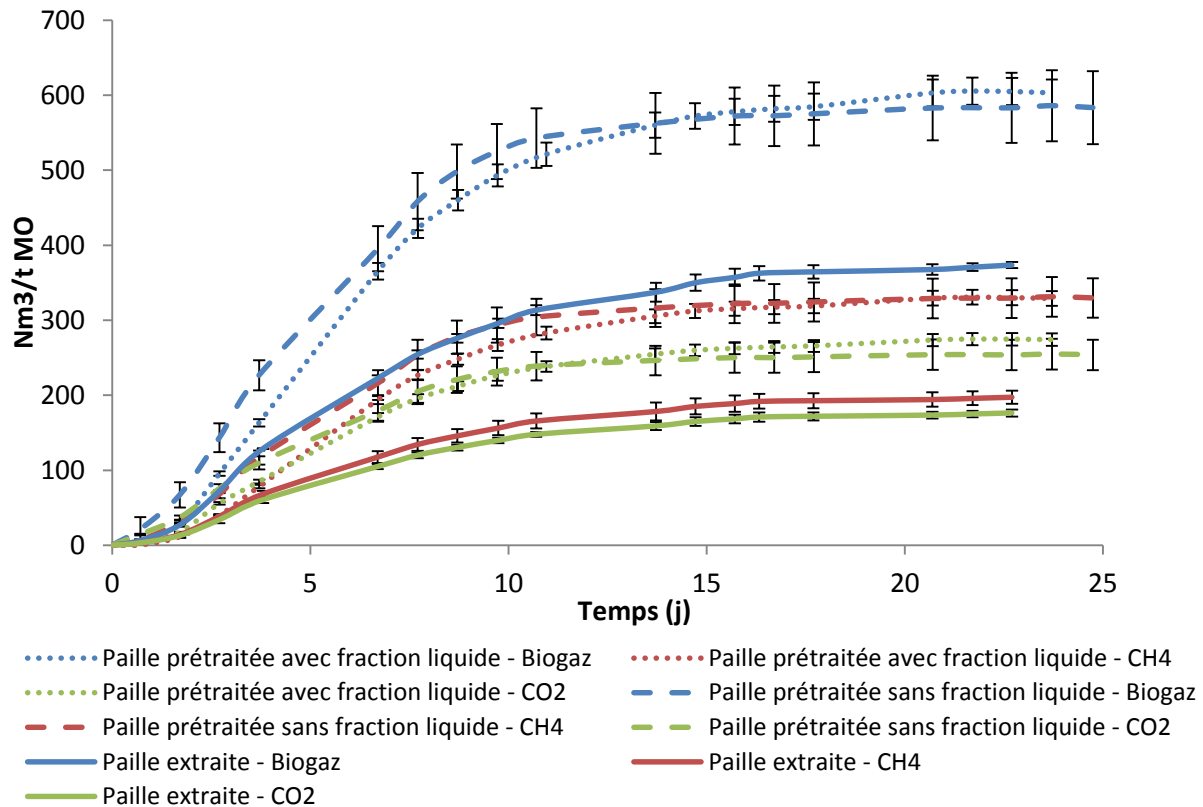


Figure 62 : Production de biogaz total, CH₄ et CO₂ pour : de la paille extraite, de la paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) à température ambiante avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement

Au bout de 23 jours de digestion anaérobie (Figure 62), les productions mesurées de biogaz total, CO₂ et CH₄ pour la paille extraite sont respectivement de 374 ; 176 et 197 Nm³gaz/t.MSV. Après prétraitement de la paille les productions sont respectivement de 586 ; 255 et 311 Nm³gaz/t.MSV pour la fraction solide seule et 605 ; 274 et 329 Nm³gaz/t.MSV pour la fraction solide associée à la fraction liquide. Soit un potentiel de production de biogaz correspondant à 75% de la production théorique de la paille extraite, pour le biogaz total, et 77% pour le méthane.

Les productions de biogaz, pour les deux fractions prétraitées sont identiques tant en terme de production finale que de cinétique initiale. La fraction liquide récupérée après le prétraitement n'est donc pas inhibitrice de la méthanisation, son potentiel de production de méthane est semblable à celui de la fraction solide.

Suite à ce prétraitement, le taux de CH₄ dans le biogaz a légèrement augmenté de 53% (biomasse non prétraitée) à 56% (biomasse prétraitée). Cette faible variation doit pouvoir s'expliquer par l'alcalinisation du milieu lié à la soude, favorisant la dissolution du CO₂ sous forme d'hydrogénocarbonate (HCO₃⁻).

Les TPM précédents montrent que le prétraitement à la soude à température ambiante pendant 1h, permet une augmentation de la production de méthane de 67%. Ce prétraitement permet d'obtenir 77% du méthane potentiel de la paille extraite, et peut donc être considéré comme efficace. Il faut 10 jours pour obtenir la majeure partie du méthane, contre 15 pour la paille extraite non prétraitée. Une augmentation de la cinétique est donc observée suite au prétraitement à la soude et ce phénomène pourrait être amplifié en appliquant ce prétraitement à chaud.

L'effet d'un prétraitement à la soude dans des conditions plus fortes (0,5 g.NaOH/g.paille pendant 24h) a donné des résultats positifs pour l'amélioration de la méthanisation (Pavlostathis et Gossett 1985). Suite au prétraitement, la production de méthane a été multipliée par 4. Par contre, la production obtenue à partir de paille brute correspond à un rendement de méthanisation de l'ordre de 15% (et de 58% après prétraitement). L'explication la plus probable à ce faible rendement est que, dans ce cas, l'inoculum n'était pas adapté à la méthanisation de la paille de blé. Pavlostathis & Gossett (1985) ont aussi testé le prétraitement à la soude dans des conditions plus douces (0,1 g.NaOH/g.paille pendant 24h) mais n'ont pas obtenu la même amélioration puisqu'ils ont observé un rendement de méthanisation de l'ordre de 29%.

3. Prétraitement à la soude associé à un chauffage « traditionnel »

Afin d'améliorer l'efficacité de la soude sans augmenter sa concentration (0,2mol/L) lors du prétraitement, un chauffage par convection (chauffage « traditionnel ») est effectué, en trempant le récipient dans un bain d'huile à 90°C.

a) Caractérisation de la biomasse selon la méthode Van Soest

Après prétraitement de la paille extraite à la soude à 90°C, 78% de la paille extraite est récupérée par filtration. Une partie de la paille de blé (22%) a donc été solubilisée ou réduite en particule de diamètre inférieur à 100µm. L'analyse Van Soest de la paille prétraitée, a permis de connaître sa composition (Figure 63).

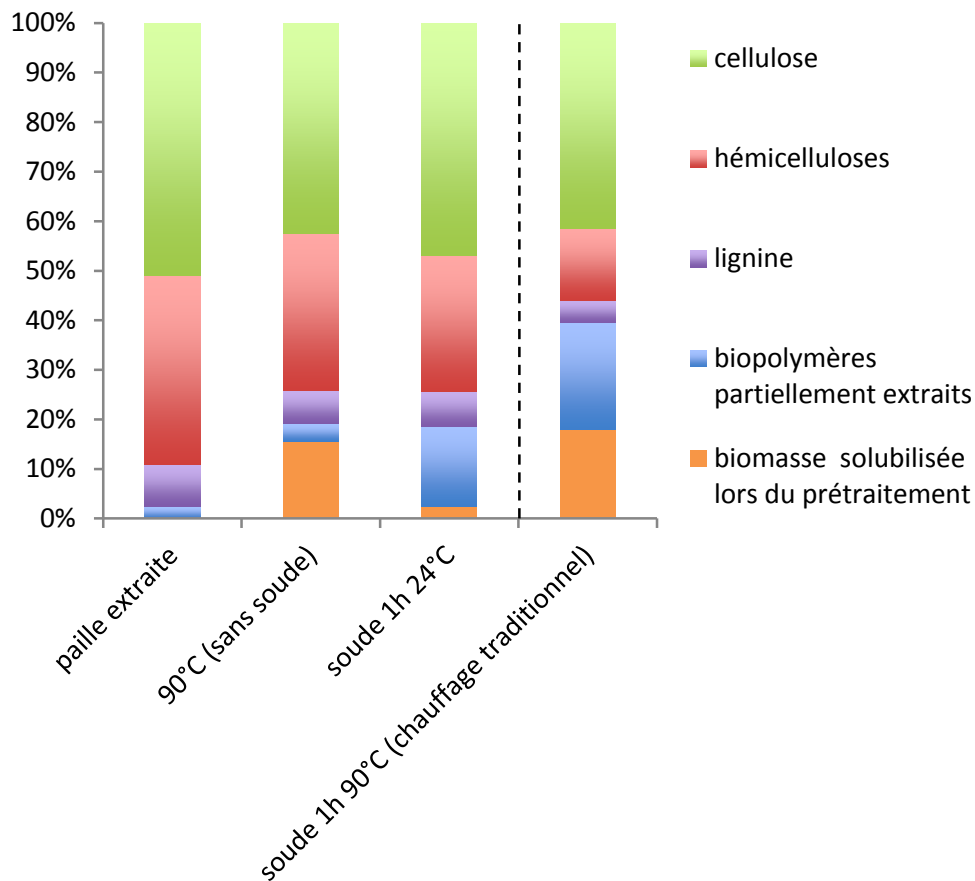


Figure 63 : Taux corrigés des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à 90°C dans l'eau ou à la soude (0,2mol/L) pendant 1h à 24°C ou 90°C avec un chauffage dit traditionnel (par convection)

Une fraction importante de la paille a donc été touchée par le prétraitement à la soude à chaud. Le taux de cellulose a diminué de 10% : 51% avant prétraitement et 41% après prétraitement à 90°C. Une chute importante du taux d'hémicelluloses est observée après traitement : il passe de 38% à 15%. Enfin le taux de lignine a aussi nettement diminué en passant de 8,5% à 4,5%. Cela représente donc des pertes en cellulose, hémicelluloses et lignine respectives de 20%, 61% et 47%.

Même si le prétraitement à la soude à 90°C a plus extrait les hémicelluloses que la lignine, une augmentation de la porosité de la paille est probable. Cependant, comme montré au chapitre III ce phénomène est difficile à prouver sur ce substrat. C'est donc avec les TPM que l'accessibilité à l'holocellulose sera évaluée. Comme précédemment, une fraction importante des polysaccharides de l'holocellulose a été solubilisée (37%), et doit pouvoir être injectée dans le digesteur anaérobie afin de les valoriser.

b) Potentiel méthanogène de la paille prétraitée

Comme dans les cas précédent, deux TPM sont effectués, l'un sur la paille extraite prétraitée associée à la fraction solubilisée lors du prétraitement ; l'autre sur la fraction solide seule obtenue après prétraitement. Dans chaque cas, la concentration en matière organique est de 10g.MO/L d'inoculum.

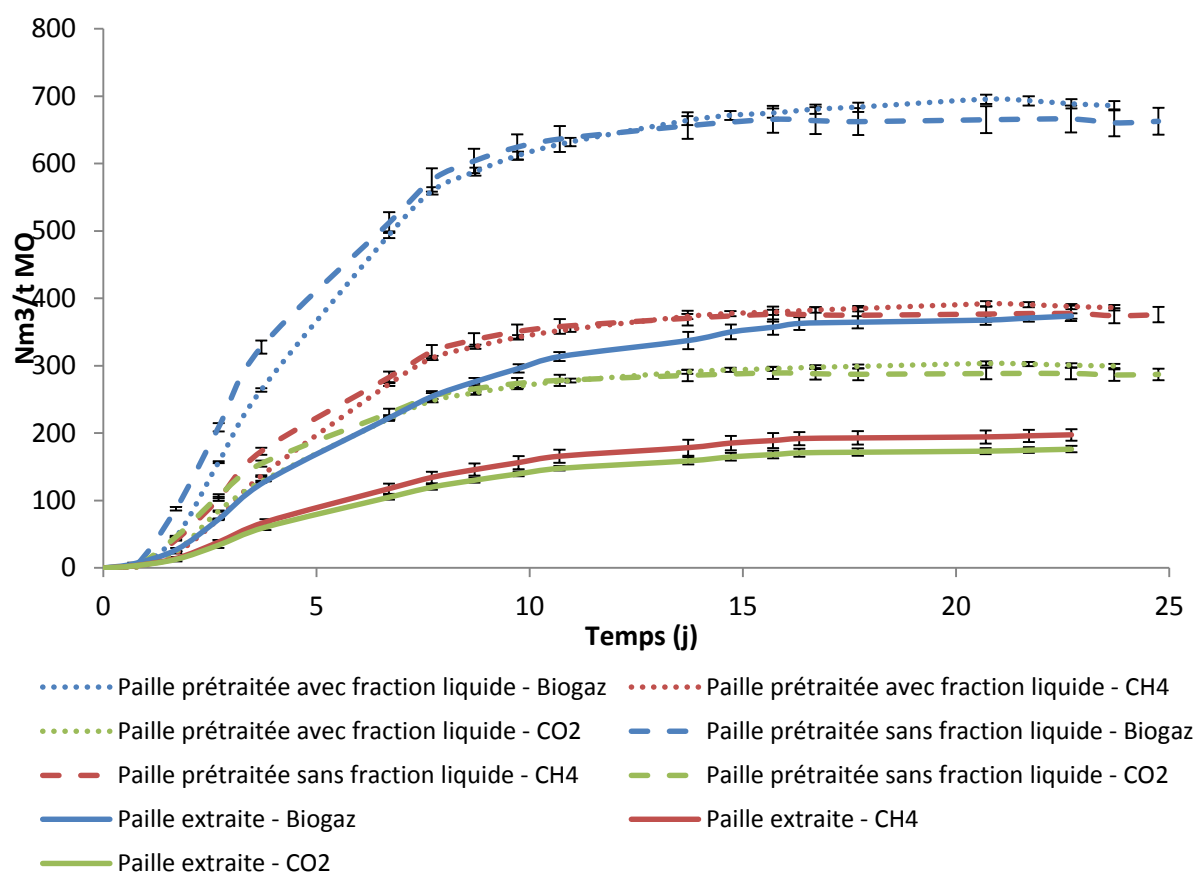


Figure 64 : Production de biogaz total, CH₄ et CO₂ pour : de la paille extraite, de la paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) à 90°C (chauffage traditionnel) avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement

Au bout de 23 jours de méthanisation (Figure 64), les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ pour la paille extraite sont respectivement de 374 ; 176 et 197 Nm³gaz/t.MSV. Tandis qu'après prétraitement de la paille à la soude (0,2mol/L) à 90°C, les productions sont respectivement de 663 ; 287 et 376 Nm³gaz/t.MSV pour la fraction solide seule et de 689 ; 300 et 388 Nm³gaz/t.MSV pour la fraction solide associée à la fraction liquide. Comme précédemment, les productions théoriques de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ à partir de paille extraite sont respectivement de 806 ; 379 et 427 Nm³gaz/t.MSV. Suite aux prétraitements, les

potentiels de production de biogaz correspondant à 85% de la production théorique de la paille extraite, pour le biogaz total, et 90% pour le méthane.

Les productions de biogaz, pour les deux fractions prétraitées sont identiques tant en terme de production finale que de cinétique initiale. La fraction liquide récupérée après le prétraitement n'est donc pas inhibitrice de la méthanisation, son potentiel méthane est semblable à celui de la fraction solide.

Le fait de chauffer à 90°C lors du prétraitement a permis d'augmenter la production de méthane de 18% (soit 59 Nm³gaz/t.MSV) par rapport au prétraitement à la soude à température ambiante. Ce chiffre est relativement faible mais attendu, vu que le prétraitement à la soude à température ambiante est déjà assez efficace.

Au regard des résultats obtenus, le prétraitement à la soude (0,2mol/L) à 90°C pendant 1h, conduit à une augmentation de la production de méthane de 97% par rapport à la paille extraite non prétraitée. Ce prétraitement permettant une libération de 90% du méthane potentiel de la paille extraite par méthanisation, il peut être considéré comme étant très efficace. De plus, la cinétique de méthanisation est élevée puisque 80% de la production totale de méthane sont atteints en 8 jours.

Cependant ce prétraitement nécessite un apport d'énergie important puisqu'il faut chauffer à 90°C pendant 1h. A moins d'être envisagé dans le cadre d'une méthanisation associée à de la production de chaleur par cogénération, le bilan énergétique de ce prétraitement est négatif puisqu'il consomme plus d'énergie que ce que la méthanisation ne peut fournir. Afin de diminuer la quantité d'énergie à apporter au prétraitement un chauffage de courte durée par exposition aux micro-ondes a été étudié.

4. Prétraitement à la soude associé à un chauffage par micro-ondes

Différentes modalités de chauffage ont été testées :

- Chauffage pendant 1 heure en contrôlant la température mais sans contrôler l'énergie apportée.
- Chauffage pendant 1 minute en apportant 125 W/g.paille puis 59min de réaction sans apport d'énergie.
- Chauffage pendant 5 minutes en apportant 25 W/g.paille puis 55min de réaction sans apport d'énergie.

Comme le montrent les courbes d'évolution de la température (Figure 65) les chauffages pendant 1 et 5 minutes permettent bien d'atteindre 90°C. Au bout d'une heure de prétraitement la température est redescendue à 41°C dans les réacteurs.

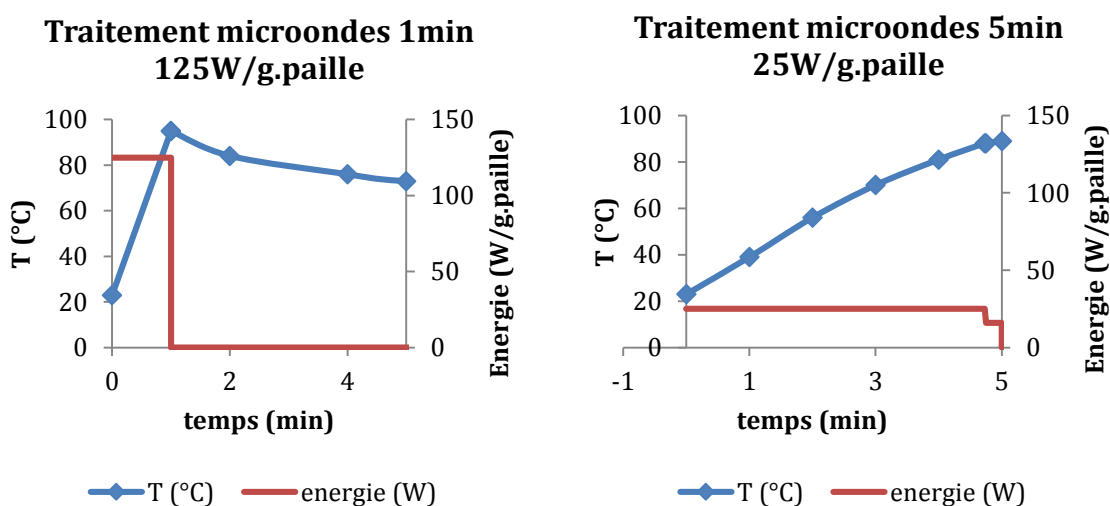


Figure 65 : Evolution de la température lors du prétraitement aux micro-ondes pour $t < 5\text{min}$

a) Caractérisation de la biomasse selon la méthode Van Soest

Après chauffage par exposition aux micro-ondes pendant 1h, 5min ou 1min, les fractions solides récupérées représentent respectivement 65%, 82% et 85%. Ce qui signifie que la paille de blé a été solubilisée ou réduite en particule de diamètre inférieur à $100\mu\text{m}$ à hauteurs respectives de 35%, 18% et 15%. Le chauffage aux micro-ondes pendant 1 heure entraîne donc une meilleure solubilisation de la paille extraite que le chauffage traditionnel, mais ce n'est pas le cas lors du chauffage de courte durée.

La paille restante a été analysée par la méthode Van Soest, afin d'en connaître la composition (Figure 66).

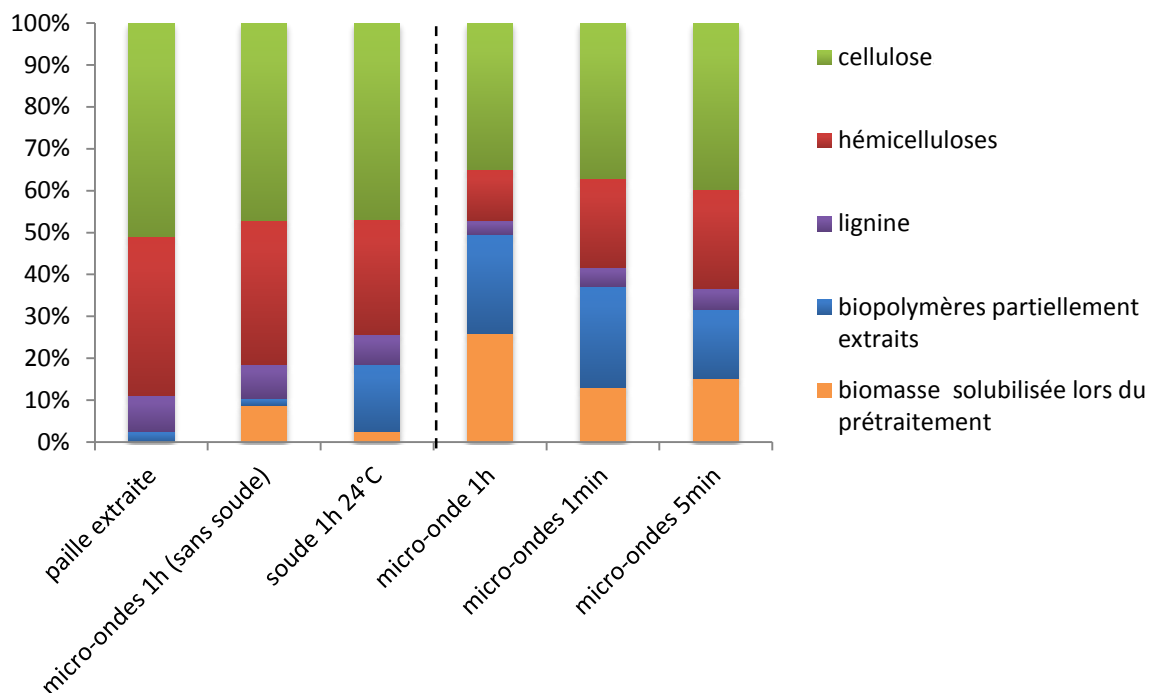


Figure 66 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à la soude (0,2mol/L) 90°C par chauffage aux micro-ondes pendant 1h, 1min ou 5min.

Le taux d'extractibles résiduels avant prétraitement est de 2% ce qui est négligeable. Les prétraitements aux micro-ondes pendant 1 heure, 1 minute ou 5 minutes ont permis l'extraction d'une partie de la cellulose dont le taux est passé de 51% pour la paille extraite à respectivement 35%, 37% et 40%. Les hémicelluloses sont aussi extraites, leurs taux sont passés de 38% dans la paille extraite à respectivement 12%, 21% et 24% dans la paille prétraitée aux micro-ondes. Enfin le taux de lignine est passé de 8,5% dans la paille extraite à respectivement 3,5%, 4,5% et 5,0% dans la paille prétraitée.

Le prétraitement par micro-onde le plus efficace est celui dont le chauffage dure 1 heure, entraînant ainsi une extraction de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine à hauteurs respectives de 31%, 68% et 59%. Le second traitement en termes d'efficacité est le chauffage pendant 1 minute, puisqu'il entraîne une extraction de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine de 27%, 45% et 47% respectivement. Le chauffage plus doux et plus lent (5min) entraînant la dégradation la moins élevée, de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine, respectivement 22%, 37% et 41%. Les polymères partiellement dégradés se

retrouvent dans la fraction apparentée aux extractibles (biomasse partiellement dégradée) et dans la fraction solubilisée.

En comparant ces chiffres à ceux du chauffage « traditionnel », cette étude met en évidence que, pour un même temps de chauffe (1h), le traitement par micro-ondes entraîne une meilleure solubilisation de la biomasse. Il faut cependant noter que le chauffage aux micro-ondes est effectué dans des réacteurs fermés hermétiquement, tandis que le chauffage « traditionnel » est effectué à pression atmosphérique. L'augmentation de la solubilisation de la biomasse lignocellulosique peut donc venir, de l'irradiation aux micro-ondes elle-même, ou de l'augmentation de la pression durant le prétraitement par rapport au chauffage « traditionnel ».

Comme précédemment les TPM sont nécessaires pour évaluer l'augmentation de l'accessibilité à l'holocellulose après prétraitement, ainsi que l'action potentiellement inhibitrice liée aux fractions solubilisées.

b) TPM

Afin d'améliorer la lisibilité des TPM, les productions de biogaz total (Figure 67), sont présentées séparément des productions de méthane (Figure 68).

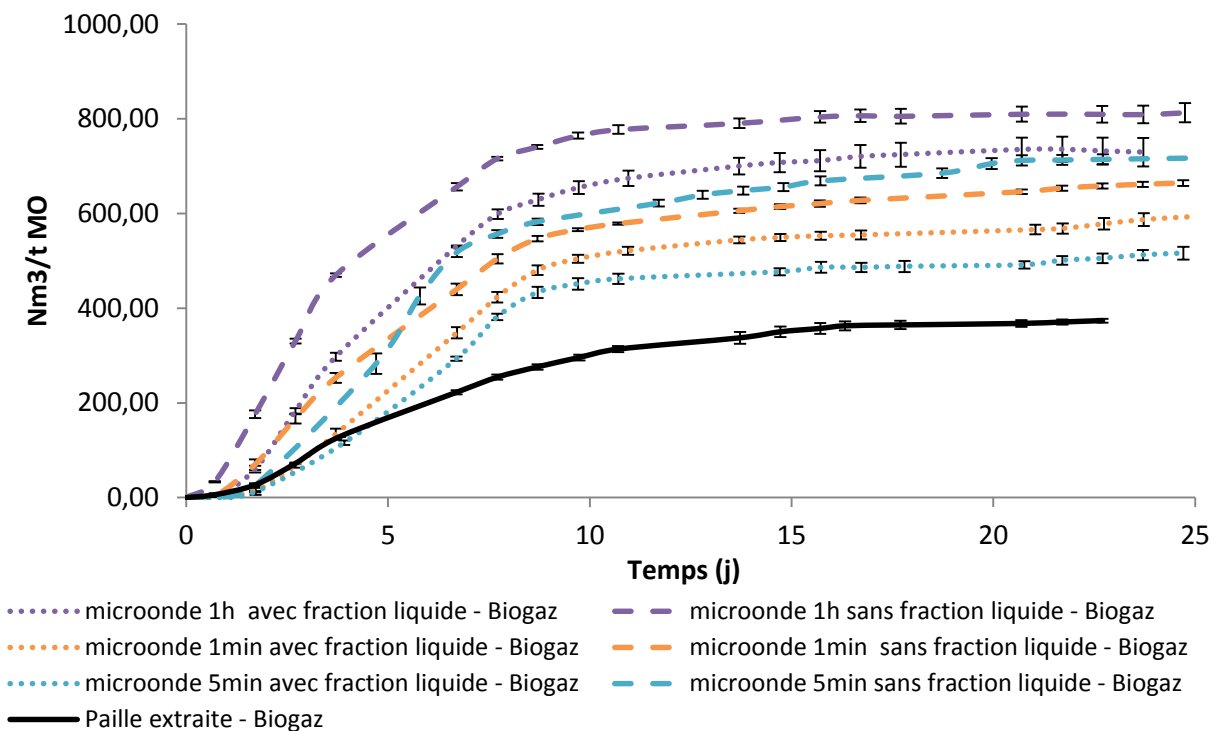


Figure 67 : Production de biogaz total, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à un chauffage par micro-ondes de 1h, 5min ou 1min ; pour chaque prétraitement les TPM sont effectués sur la fraction solide avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.

Au bout de 23 jours de méthanisation, les productions de biogaz (Figure 67) pour la paille extraite non traitée (371 Nm³gaz/t.MSV) ou prétraitée à la soude en association à un chauffage par micro-ondes pendant 1 heure, 5 minutes et 1 minute, sont respectivement de 809 ; 714 et 658 Nm³gaz/t.MSV quand seule la fraction solide est testée en TPM. Lorsque la fraction solubilisée est ajoutée, les productions de biogaz après prétraitements sont les suivantes : 731 ; 505 ; 578 Nm³gaz/t.MSV. L'ajout des fractions liquides entraîne donc une diminution du potentiel de production de biogaz de la biomasse.

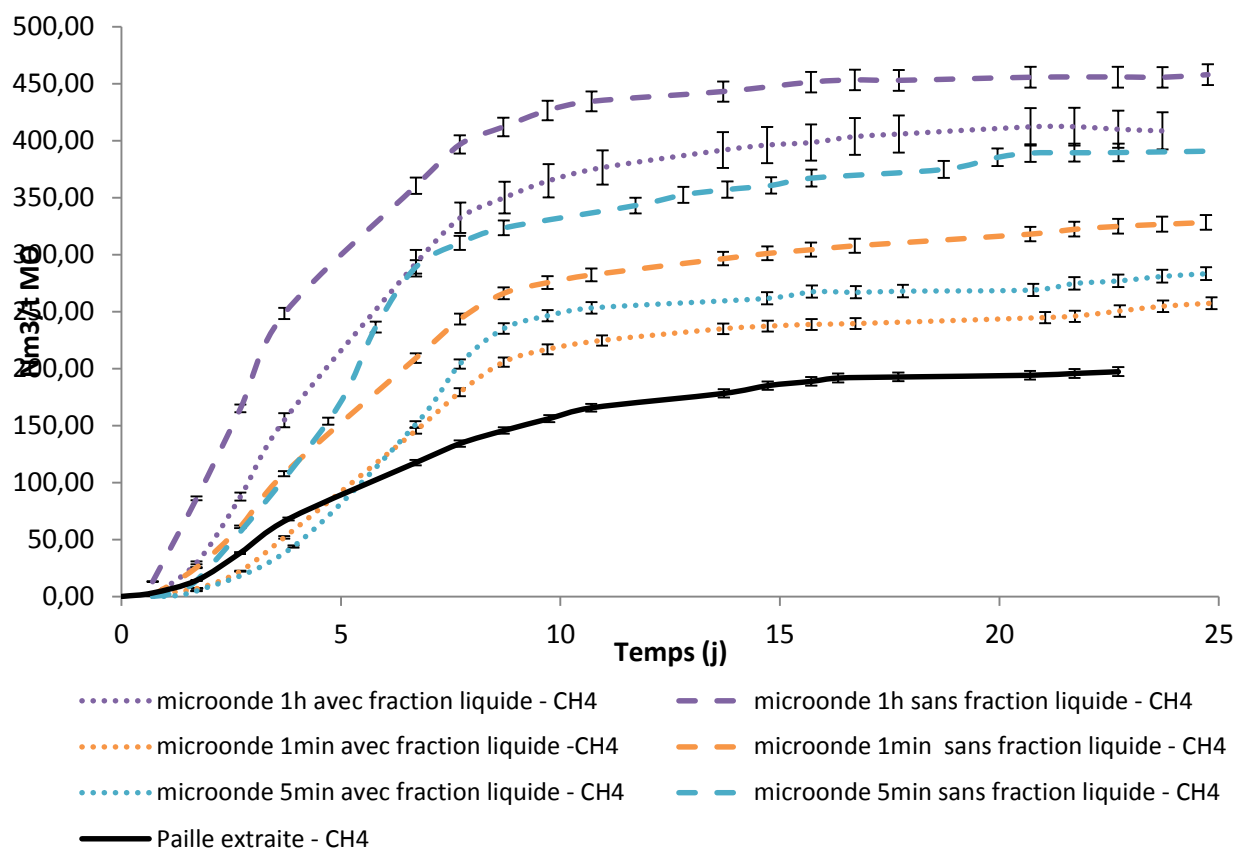


Figure 68 : Production de CH₄, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à un chauffage aux micro-ondes de 1h, 5min ou 1min ; pour chaque prétraitements les TPM sont effectués sur la fraction solide avec ou sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.

Les productions de méthane (Figure 68) pour la paille extraite non traitée (197 Nm³gaz/t.MSV) ou prétraitée à la soude associée à un chauffage par exposition aux micro-ondes pendant 1h, 5min ou 1min sont respectivement de 456 ; 389 et 325 Nm³gaz/t.MSV quand seule la fraction solide est testée en TPM. Lorsque la fraction solubilisée est ajoutée, les productions de méthane après prétraitements sont les suivantes : 412 ; 277 ; 251 Nm³gaz/t.MSV. De la même façon que pour le biogaz total, une diminution du potentiel

de production de méthane est observée en présence des fractions solubilisées de la paille prétraitée. Deux hypothèses semblent pouvoir expliquer ce phénomène :

- Des inhibiteurs de la méthanisation sont présents dans les fractions solubilisées.
- La fraction solubilisée présente un potentiel de production de méthane très inférieur à celui de la fraction solide ; ce qui entraîne la diminution du potentiel méthane du mélange fraction solide – fraction solubilisée.

Ces hypothèses ne sont pas incompatibles. En effet des molécules facilement méthanisables (type glucides) associées à des inhibiteurs de la méthanisation (certaines fractions de lignine) sont probablement présentes dans les fractions solubilisées. Cette association peut expliquer un faible potentiel méthane de ces fractions.

Afin de pouvoir comparer les potentiels réels de production du biogaz et du méthane, après prétraitement, au potentiel théorique corrigé du taux de lignine, il faut analyser la production du mélange fraction solide – fraction solubilisée. En effet, une fraction non négligeable de lignine et de polysaccharides se trouvant dans la fraction solubilisée, la comparaison n'est pas possible entre la production de biogaz et de méthane liée aux résidus solides et celle (théorique) calculée pour la paille extraite. Les productions de biogaz pour la paille extraite non traitée ou prétraitée à la soude associée à un chauffage par micro-ondes pendant 1 heure, 5 minutes et 1 minute correspondent respectivement à 46%, 91%, 63% et 72% de la production théorique liée à la paille extraite. La production de méthane correspond quant à elle respectivement à 46%, 95%, 65%, et 59%.

La comparaison des prétraitements à la soude (0,2mol/L) associés à un chauffage « traditionnel » pendant 1 heure ou à un chauffage par micro-ondes pendant 1 heure, montre que le chauffage par micro-ondes entraîne un rendement en méthane légèrement supérieur (+24 Nm³gaz/t.MSV). L'augmentation du rendement est plus importante si seule la fraction solide résiduelle est analysée en TPM (+80 Nm³gaz/t.MSV), la fraction solubilisée par micro-ondes ayant un potentiel de production de méthane moins important que la fraction solide. Lorsque le prétraitement à la soude est associé à un chauffage par micro-ondes pendant 5 minutes, il entraîne une augmentation de production de méthane uniquement pour la fraction solide (+60 Nm³gaz/t.MSV). Par contre le chauffage par micro-ondes pendant 1 minute est contre productif vis-à-vis de la production de méthane (-76 Nm³gaz/t.MSV pour la fraction solide associée à la fraction liquide).

En conséquence, le bénéfice du chauffage vis-à-vis de la production d'énergie à partir de paille de blé n'est pas avéré. En effet, le chauffage par micro-ondes pendant 1 heure entraîne une dépense énergétique plus élevée que ce que peut apporter la méthanisation. Si la fraction liquide liée au traitement est injectée dans le digesteur anaérobie, les chauffages par micro-ondes de courte durée (1 – 5 minutes) ne permettent pas d'augmenter la production de méthane, par rapport à un traitement à 24°C. Par contre, dans une optique industrielle, la séparation des fractions liées au prétraitement et leur méthanisation indépendantes, dans deux types de réacteurs différents, est envisageable et pourrait donner des résultats intéressants. Dans ce cas-là, l'option de l'utilisation de micro-ondes durant 5 minutes est la plus pertinente.

Dans une optique de diminution de la quantité de biomasse (lors du prétraitement de déchets lignocellulosique) ou d'extraction de molécules d'intérêt, le chauffage par micro-ondes permettrait une meilleure solubilisation de la paille de blé que le chauffage « traditionnel » ou que le traitement à température ambiante. Les molécules extraites doivent être des fractions phénoliques, ainsi que des hémicelluloses et de la cellulose plus ou moins hydrolysées. Ces fractions, après purification, pourraient être valorisées pour la production de biopolymères. Cependant, le prétraitement à la soude associé aux micro-ondes, libère une quantité importante de molécules différentes, rendant leur séparation et leur analyse délicate. Une séparation des différents constituants par chromatographie Flash suivie d'une analyse par RMN du proton a été essayée sans succès.

5. Prétraitement à la soude associé à un traitement aux ultrasons

Pour des raisons matérielles, seuls les ultrasons basses fréquences (20kHz) ont été testés, pour augmenter l'action de la soude (0,2 mol/L) lors du prétraitement de la paille de blé extraite. L'oxydation de la lignine par les radicaux libres doit donc être faible lors de ce prétraitement, mais les actions mécaniques de déstructuration de la biomasse doivent demeurer. Afin d'évaluer l'impact que pourrait avoir l'oxydation de la paille, l'analyse de prétraitements par ozonation est présentée au paragraphe D (p 186).

Les ultrasons entraînent une augmentation globale de la température du milieu liquide. Afin que ce prétraitement soit cohérent avec les autres prétraitements à la soude, la température limite du prétraitement est fixée à 90°C, et a été atteinte. Pour éviter que la température n'augmente trop, les prétraitements aux ultrasons sont effectués par « pulse »

de 5 minutes : alternance de phases d’ultrasons (5 min) et de phases sans ultrasons (5 min) ; deux modalités de traitement sont testées :

- Durée identique aux autres traitements à la soude : pendant 1 heure (en pulse de 5min)
- Traitement de courte durée : 5 minutes

a) Caractérisation de la biomasse selon la méthode Van Soest

Après sonication aux ultrasons pendant 1 heure et 5 minutes, les fractions solides récupérées représentent respectivement 75%, 82% de la masse de la paille extraite. Ce qui signifie qu’elle a été solubilisée ou réduite en particule de diamètre inférieur à 100µm à des taux respectifs de 25% et 18%. Le traitement aux ultrasons pendant 1 heure entraîne une meilleure solubilisation que celui durant 5 minutes. Ce dernier entraînant une meilleure solubilisation que le prétraitement à température ambiante (2,5%). Enfin, le traitement à la soude associée aux ultrasons pendant 5 minutes permet une solubilisation semblable au traitement assisté aux micro-ondes pendant 1 ou 5 minutes.

La paille restante a été analysée par la méthode Van Soest, afin de connaître sa composition (Figure 69).

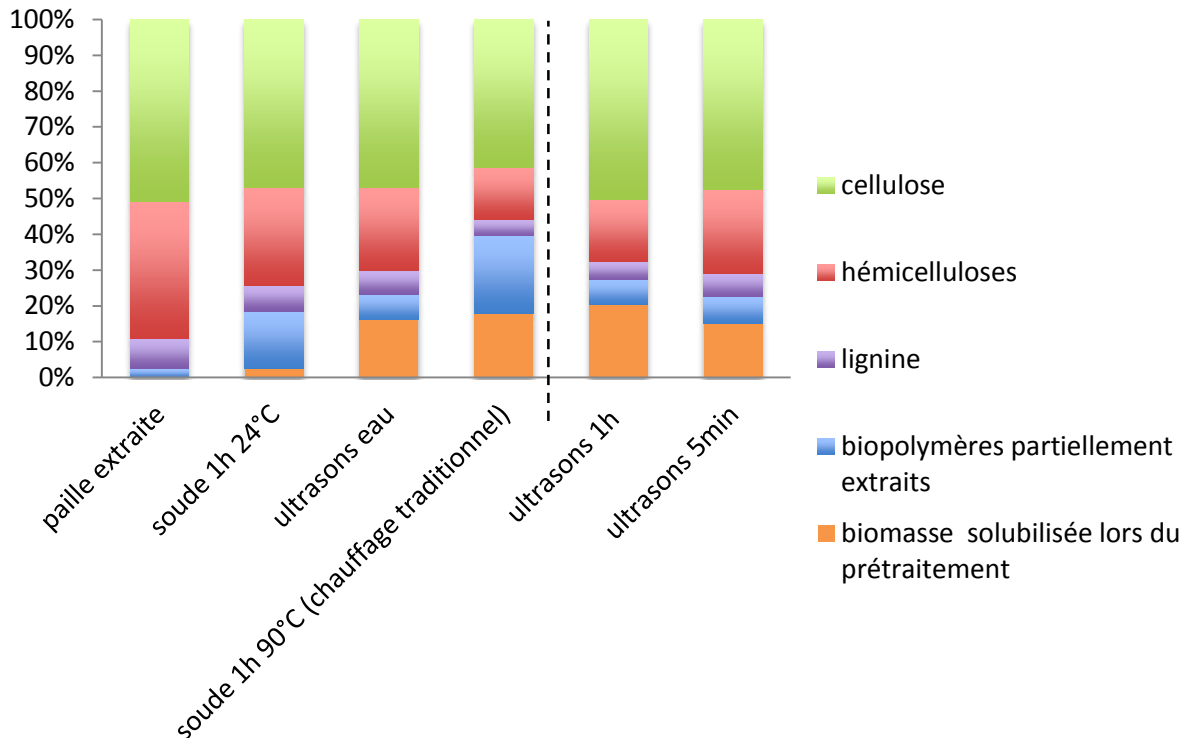


Figure 69 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraité à la soude (0,2mol/L) associée à un prétraitement aux ultrasons pendant 1h ou 5min.

Le taux d'extractibles résiduels avant prétraitement est de 2% ce qui est négligeable. Les prétraitements aux ultrasons pendant 1h ou 5min ont peu affecté la cellulose dont le taux est passé de 51% pour la paille extraite à respectivement 50% et 48%. Par contre les hémicelluloses sont extraites par ces prétraitements puisque leur taux est passé de 38% dans la paille extraite à respectivement 18% et 23% dans la paille prétraitée aux ultrasons. Enfin le taux de lignine est passé de 8,5% dans la paille extraite à respectivement 5% et 6,5% dans la paille prétraitée.

Cela confirme que le prétraitement aux ultrasons durant 1 heure est le plus efficace, en termes de déconstruction de la paille de blé. Il entraîne une extraction des hémicelluloses et de la lignine de respectivement 53% et 41%. Les polymères partiellement extraits se trouvent dans la fraction apparentée aux extractibles (biopolymères partiellement dégradés) et dans la fraction solubilisée.

La comparaison de ces résultats à ceux du chauffage « traditionnel », montre que, pour un même temps de réaction (1h), le traitement aux ultrasons entraîne une solubilisation légèrement supérieure à celui par chauffage « traditionnel ». Cependant en tenant compte de la fraction solubilisée et de la fraction constituée de polymères partiellement extraits (NDF), le chauffage « traditionnel » favorise une déconstruction de la paille plus importante que les ultrasons. Cela vient en particulier de l'extraction de la cellulose lors du traitement à chaud.

Par rapport au traitement à la soude à température ambiante, l'association de la soude et des ultrasons permet une augmentation de la déconstruction de la paille de 50%. Celle-ci est surtout liée à la dégradation de la lignine et des hémicelluloses.

Comme précédemment une augmentation de la porosité de la paille et de l'accessibilité à l'holocellulose doit avoir lieu. Ce dernier point sera étudié grâce aux TPM des fractions solides. Les TPM des fractions solubilisées permettront, quant à eux, de mettre en évidence leur pouvoir inhibiteur.

b) Potentiel méthanogène de la paille prétraitée

Afin d'évaluer l'impact des prétraitements à la soude (0,1g.NaOH/g.paille extraite - 0,2mol/L) associés aux ultrasons (20 kHz), sur de la paille extraite, deux TPM sont effectués sur de la paille extraite prétraitée, pour chaque temps de traitement (1h et 5min). Pour l'un des TPM la paille extraite prétraitée est mélangée à la fraction solubilisée (préalablement

lyophilisée) lors du prétraitement ; pour l'autre, seule la fraction solide après prétraitement est analysée. Afin d'améliorer la lisibilité, les productions de biogaz total (Figure 70), en fonction des différents temps de sonication, sont présentées séparément des productions de méthane (Figure 71).

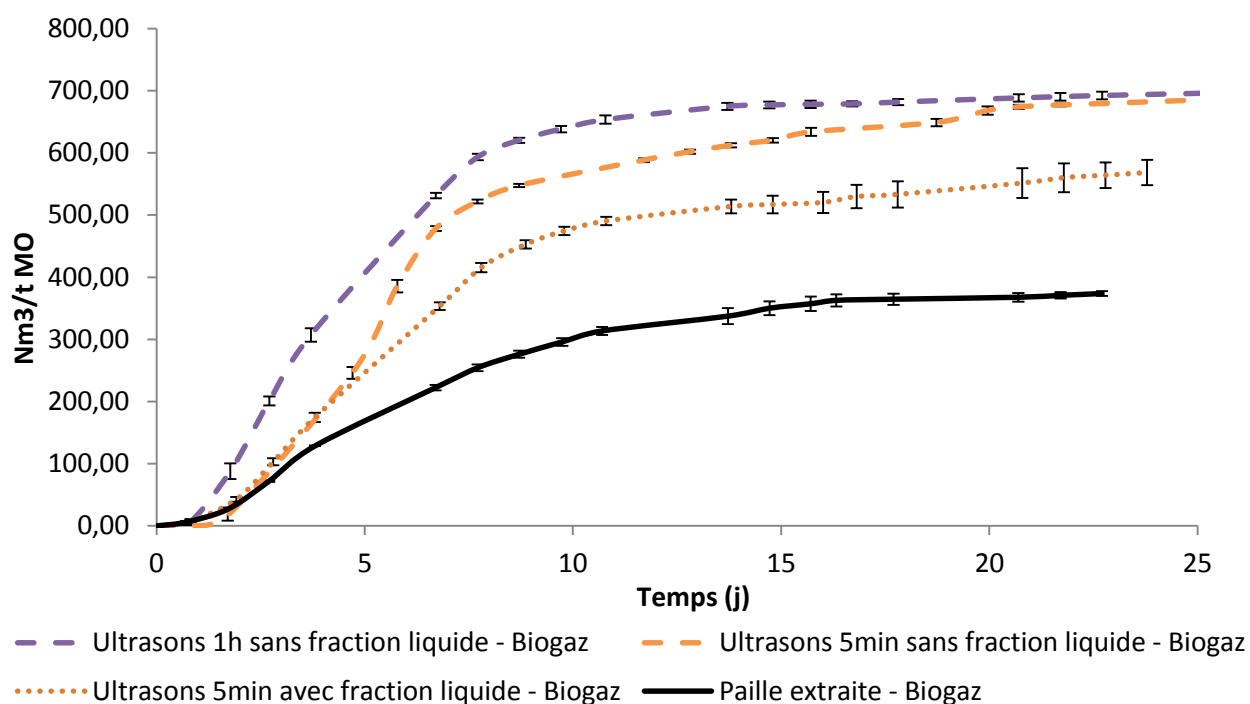


Figure 70 : Production de biogaz total, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à de la sonication aux ultrasons (20kHz) pendant 1h ou 5min ; pour chaque prétraitements les TPM sont effectués sur la fraction solide avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.

Au bout de 23 jours de méthanisation, les productions de biogaz (Figure 70) pour la paille extraite non traitée (371 Nm³gaz/t.MSV) ou prétraitée à la soude associée à la sonication aux ultrasons pendant 1 heure ou 5 minutes sont respectivement de 692 et 679 Nm³gaz/t.MSV quand seule la fraction solide est testée en TPM. Lorsque la fraction solubilisée est ajoutée, la production de biogaz après le prétraitement de 5 minutes est de 564 Nm³gaz/t.MSV. Les TPM sur la paille prétraitée aux ultrasons varient peu en fonction du temps de sonication, l'étude de la fraction liquide suite à 1 heure de sonication n'a pas été effectuée. Ces résultats montrent cependant que l'ajout des fractions liquides entraîne une diminution du potentiel de production de biogaz de la biomasse.

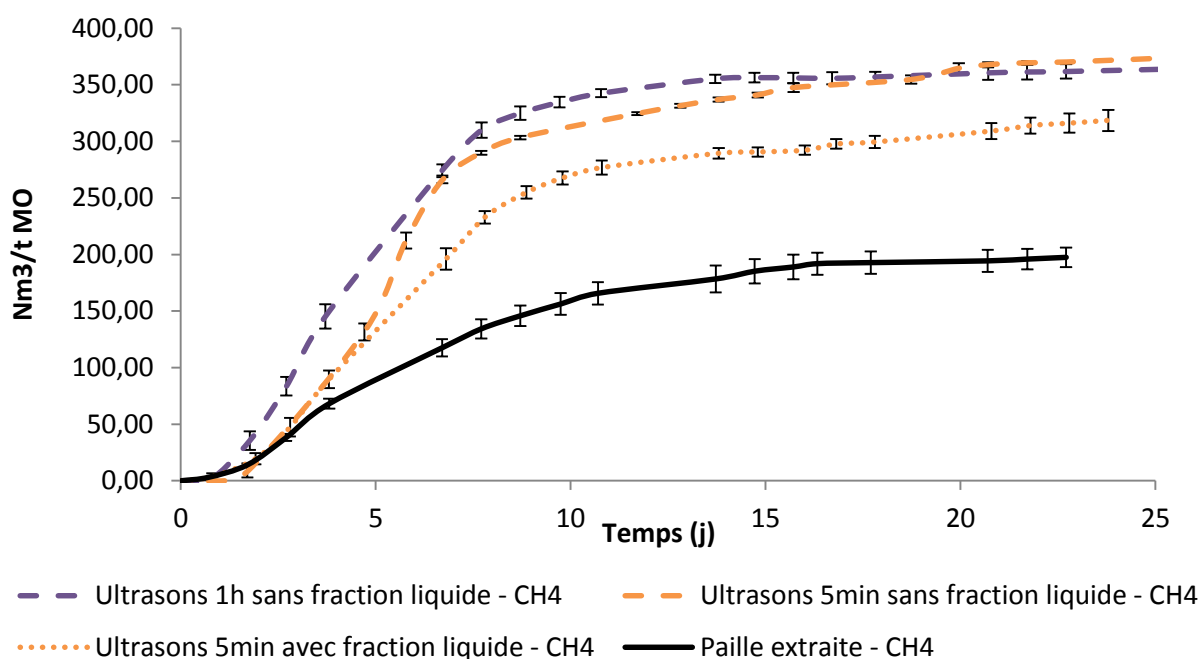


Figure 71 : Production de CH₄, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée NaOH (0,2mol/L) associé à de la sonication aux ultrasons (20kHz) pendant 1h ou 5min ; pour chaque prétraitements les TPM sont effectués sur la fraction solide avec et sans la fraction liquide récupérée après prétraitement.

Les productions de méthane (Figure 71) pour la paille extraite non traitée ou prétraitée à la soude associée à la sonication aux ultrasons pendant 1 heure ou 5 minutes sont respectivement de 197 ; 361 ; 370 Nm³gaz/t.MSV quand seule la fraction solide est testée en TPM. Lorsque la fraction solubilisée est ajoutée, la production de méthane après le prétraitement de 5 minutes est de 316 Nm³gaz/t.MSV. De la même façon que pour la production de biogaz total, une diminution du potentiel de production de méthane est observée en présence des fractions solubilisées de la paille prétraitée. De la même façon que pour le traitement à la soude associé au chauffage micro-ondes, deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- Des inhibiteurs de la méthanisation sont présents dans les fractions solubilisées.
- La fraction solubilisée présente un potentiel de production de méthane beaucoup plus faible que celui de la fraction solide, entraînant la diminution du potentiel méthane du mélange fraction solide – fraction solubilisée.

Afin de pouvoir comparer les potentiels réels de production du biogaz et de méthane, après prétraitement, au potentiel théorique corrigé du taux de lignine, il faut se baser sur la production du mélange fraction solide – fraction solubilisée. En effet, une fraction non négligeable de biopolymères (lignine, cellulose et hémicelluloses) se trouvant dans la fraction

solubilisée, la comparaison n'est pas possible entre la production de biogaz et de méthane liée aux résidus solides et celle (théorique) calculée pour la paille extraite. Les productions de biogaz, pour la paille extraite non traitée ou prétraitée à la soude avec sonication aux ultrasons pendant 5min, correspondent respectivement à 46% et 70% de la production théorique liée à la paille extraite. La production de méthane, correspond quant à elle à respectivement 46% et 74%.

En comparant les traitements à la soude (0,2 mol/L) seuls, à celui assisté par ultrasons pendant 1 heure, ce dernier entraîne un rendement en méthane légèrement supérieur (+32 Nm³gaz/t.MSV). Cependant le mélange fraction solide - fraction liquide n'ayant pas été testé par TPM pour le traitement ultrasons de 1 heure, la comparaison de ces deux chiffres ne semble pas évidente. Lorsque le prétraitement à la soude est de courte durée (5 min) et associé à des ultrasons, la production de méthane est légèrement plus faible que pour le traitement à la soude seul pendant 1 heure (-14 Nm³gaz/t.MSV). Le traitement aux ultrasons en association à la soude (0,2 mol/L) n'a visiblement pas amélioré la production de biogaz par rapport à celui à la soude (0,2 mol/L) à température ambiante. Par contre, il permet de diminuer nettement le temps de prétraitement en favorisant la pénétration de la solution alcaline au cœur de la biomasse.

L'énergie dépensée par le traitement aux ultrasons pendant 5 minutes est de 1,3 Wh/g de paille ce qui est inférieur aux 2,1 Wh/g de paille fixés comme limite énergétique à ne pas dépasser pour le prétraitement. Les ultrasons permettent donc d'accélérer fortement le prétraitement de la paille à la soude (0,2 mol/L), tout en présentant une dépense énergétique raisonnable, par contre ils ne permettent pas d'augmenter l'action de la soude vis-à-vis de la production de méthane.

6. Caractérisation des fractions solubilisées par chromatographie d'exclusion stérique

Une étude de la répartition des masses moléculaires, des molécules solubilisées au cours de certains prétraitements, a été effectuée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Cette étude a porté sur les prétraitements à la soude

- A température ambiante
- Associés à un chauffage « traditionnel »
- Associés à un chauffage par micro-ondes pendant 1 minute

Les chromatogrammes obtenus sont présentés ci-dessous (Figure 72).

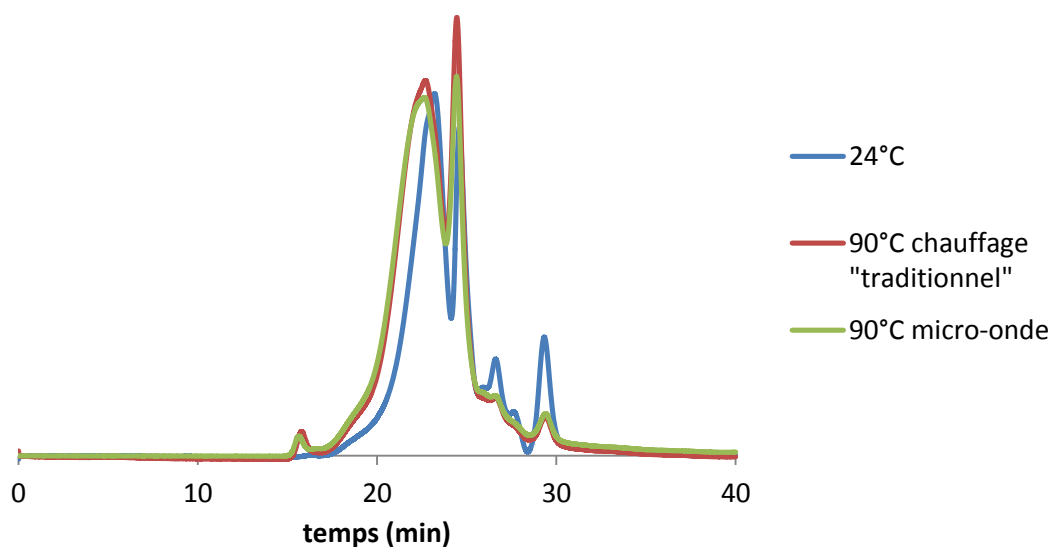


Figure 72 : Chromatogramme d'exclusion stérique (déttection UV) des fractions solubilisées par les prétraitements à la soude (0,2mol/L) à température ambiante ou associé à un chauffage traditionnel ou par micro-ondes

Les résultats sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau 23)

Tableau 23 : Récapitulatif des masses moléculaires (M_w) mesurées par SEC sur les fractions solubilisées de trois prétraitements à la soude (étalonnage par polystyrènes sulfonés)

Prétraitement	M_w 1 (g/mol)
NaOH – température ambiante	401
NaOH – chauffage « traditionnel »	911
NaOH – micro-onde	991

Il est nécessaire de préciser que la colonne d'exclusion stérique ne supportant pas de pH supérieur à 12, les pH des solutions ont été ajustés avant analyse, ce qui a entraîné la formation de précipités dont les masses moléculaires n'ont pas pu être analysées. Il est donc possible que des fractions de masse molaire supérieures à 900 g/mol aient été solubilisées lors des prétraitements, sans que cela soit vérifiable.

Grâce à ces mesures il est possible d'observer que les fractions solubilisées par les prétraitements à chaud sont semblables en termes de masse et d'encombrement, puisque

leurs spectres sont semblables. Par contre, le prétraitement à température ambiante entraîne la libération de molécules de masses moléculaires plus faibles.

Dans les trois cas, plusieurs fractions séparées par la colonne d'exclusion stérique apparaissent, en particulier, des fractions dont la masse moléculaire est de l'ordre de 900 à 400 g/mol. Bien que l'étalonnage soit réalisé à l'aide de polystyrènes sulfonés de masses connues, ces résultats sont à considérer avec précaution, car les tailles des oligomères observés sont plus faibles que celle de l'étalon de plus faible masse. Il est cependant possible d'observer au moins deux populations de masse distinctes, quel que soit le type de prétraitement à la soude. Elles peuvent être attribuées à des fractions phénoliques provenant de la lignine puisqu'elles sont détectées par un détecteur UV à 280nm.

7. Caractérisation des fractions solubilisées par infrarouge à transformée de Fourier

Suite aux prétraitements à la soude à température ambiante ou après chauffage à 90°C, les fractions solubilisées ont été lyophilisées puis analysées par FT-IR. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 73).

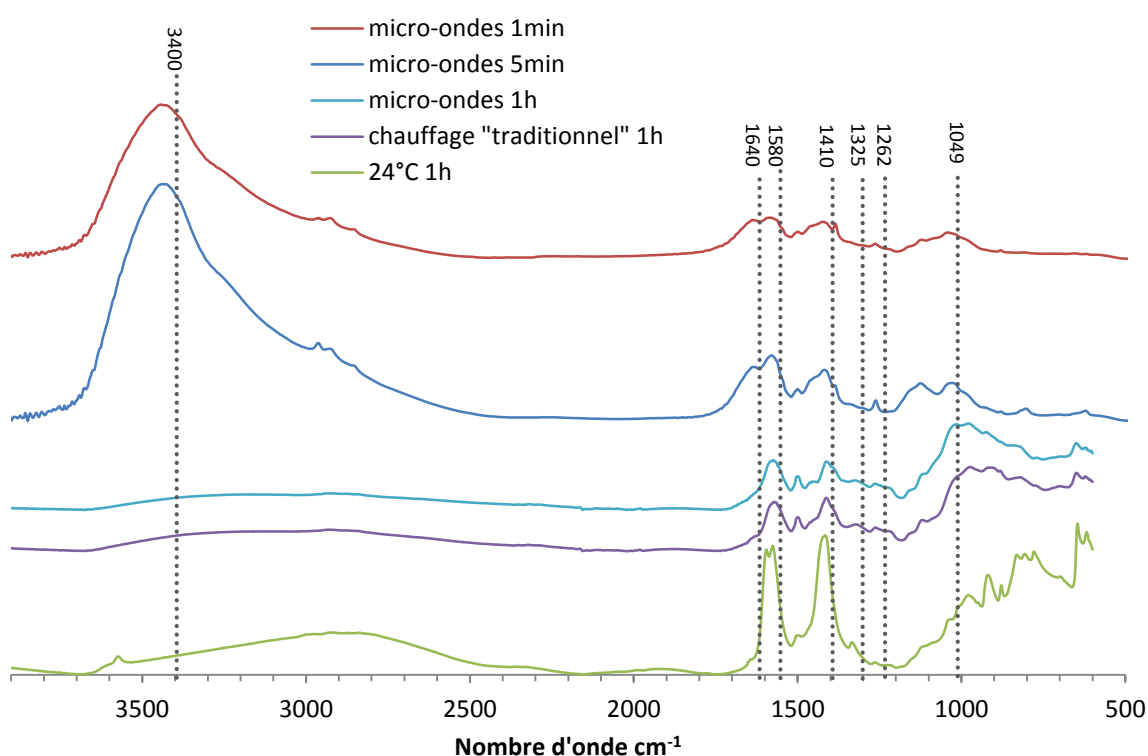


Figure 73 : Spectre FT-IR des fractions solubilisées suite aux traitements à la soude à 90°C ou à température ambiante

Les spectres correspondants aux traitements de courte durée sont semblables entre eux, de même pour les spectres correspondant aux prétraitements à 90°C pendant 1 heure. Cependant, la superposition des bandes d'absorbance, liée à la multitude de types de liaisons des différentes molécules, rend leur analyse incertaine.

Les bandes à 3400 cm⁻¹ sont caractéristiques de vibrations d'élongation O-H. Les absorptions entre 2840 et 3100 cm⁻¹ sont caractéristiques des vibrations d'élongation C-H des structures aliphatiques et aromatiques qui doivent correspondre à la lignine. Cependant, du fait de la superposition probable de plusieurs bandes, les spectres ne présentent pas les bandes caractéristiques du squelette aromatique de la lignine à 1600, 1515 et 1470 cm⁻¹ (Fengel et Wegener 1983). Ce qui peut aussi être un marqueur de l'absence de « grand » fragment de lignine. Les bandes des groupes syringyle et guaïacyle condensés sont observées à 1263 et 1330 cm⁻¹ mais leurs intensités sont faibles. Enfin la bande large observée autour de 1049 cm⁻¹ est typique des xylanes (RunCang Sun 2003) et correspond aux vibrations d'élongation C-C et C-O ainsi qu'aux liaisons glycosidiques ν (C-O-C).

Par ailleurs, certaines bandes peuvent être associées à des fonctions chimiques particulières :

- L'absorption à 1640 cm⁻¹ doit correspondre peut être attribuée à la vibration d'élongation des alcènes conjugués (1652 cm⁻¹), cette bande d'absorption est donc liée à la lignine.
- La bande apparaissant à 1410 cm⁻¹ pourrait correspondre à la vibration d'élongation, de la liaison O-H, de la fonction hydroxyle des acides carboxyliques. Cependant, la bande d'absorption devant correspondre aux vibrations d'élongation de la liaison C=O (1700 – 1730 cm⁻¹) n'apparaît sur aucun spectre, ce qui met en doute la présence de fonction acide carboxylique. L'acide carboxylique doit donc être sous forme ionisée (carboxylate), ainsi la bande apparaissant à 1580 cm⁻¹ est attribuée à la vibration de valence de la liaison C=O.

Au vue des résultats, les fractions solubilisées lors des prétraitements alcalins contiennent des glucides (dont des xylanes) et des molécules aromatiques provenant de l'hydrolyse de la lignine.

C. Prétraitements à l'ammoniaque

L'utilisation de l'ammoniaque comme solution alcaline, est testée pour trouver une alternative à la soude lors du prétraitement. Un coproduit de l'agriculture, au même titre que la paille de blé, pourrait ainsi être utilisé pour favoriser la méthanisation de cette dernière. De plus, l'apport d'une quantité de soude trop importante lors du prétraitement peut, dans certains cas, remettre en cause la valorisation ultérieure du digestat (coproduit de la méthanisation). En effet il doit être épandu sur les sols agricoles pour être valorisé, or certains sols ne supportent pas l'ajout de soude. Enfin, en fonction du milieu récepteur visé, l'ajout d'ammoniaque au digestat peut être un atout pour sa valorisation en augmentant sa concentration en azote organique, plus facilement assimilable par les plantes que l'azote inorganique. De même que pour la soude, le substrat prétraité est de la paille de blé sans extractible (paille extraite) et la concentration en ammoniaque est de 0,2mol/L.

En considérant les résultats précédents, trois modalités de traitements ont été testées (dans chaque cas la paille extraite est mélangée à de l'ammoniaque) :

- 1 heure à température ambiante (24°C).
- Chauffage aux micro-ondes pendant 1 minute en apportant 125 W/g.paille puis 59 minutes de réaction sans apport d'énergie.
- Sonication aux ultrasons (20kHz) pendant 1 heure par « pulse » de 5 minutes (5 minutes d'ultrasons - 5 minutes sans ultrasons).

Ces prétraitements à l'ammoniaque sont effectués selon les mêmes modalités que les prétraitements à la soude

a) Caractérisation de la biomasse selon la méthode Van Soest

Après prétraitement de la paille extraite à l'ammoniaque (0,2mol/L) pendant 1h, la fraction solide prétraitée est récupérée par filtration sous vide (fritté n°2). Après traitement à température ambiante, chauffage par micro-ondes ou sonication, les fractions solides récupérées représentent respectivement 98%, 96% et 90%. Les prétraitements ont donc entraîné la solubilisation de la paille, ou sa réduction en particule de diamètre inférieur à 100µm, à hauteur de 2%, 4% et 10%. Le chauffage aux micro-ondes pendant 1h entraîne donc une meilleure solubilisation de la paille extraite que le chauffage traditionnel en présence d'ammoniaque, tandis que le traitement aux ultrasons pendant 1h reste le meilleur moyen de solubiliser une partie de la paille en présence d'ammoniaque. Pour une même concentration

en réactif, les taux de solubilisation de la paille extraite en présence d'ammoniaque restent cependant très inférieurs à ceux obtenus en présence de soude.

La paille restante a été analysée par la méthode Van Soest, afin de connaître sa composition (Figure 74).

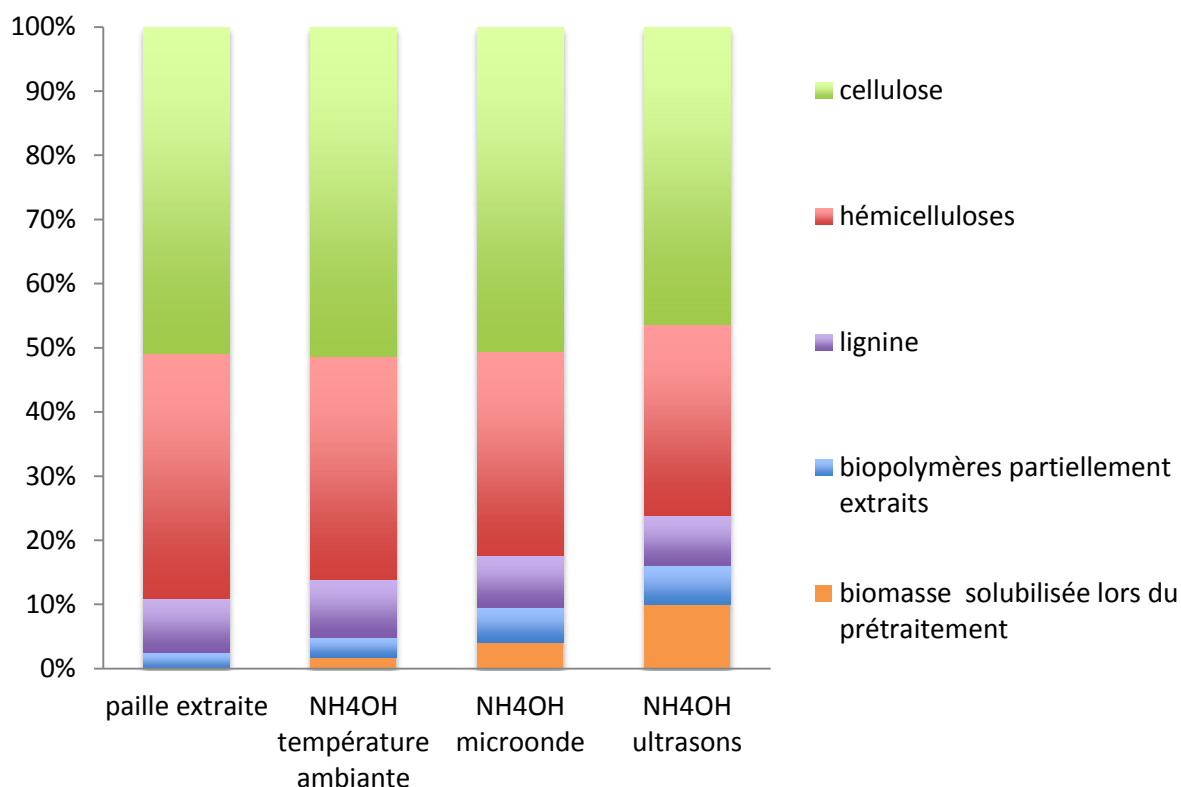


Figure 74 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraitée à l'ammoniaque (0,2mol/L) pendant 1h, à température ambiante, ou associé à un chauffage par micro-ondes pendant 1min, ou à de la sonication pendant 1h.

Le taux d'extractibles résiduels avant prétraitement est de 2% ce qui est négligeable. Les prétraitements à température ambiante, par micro-ondes ou aux ultrasons ont permis la dégradation d'une partie des hémicelluloses dont le taux est passé de 38% pour la paille extraite à respectivement 35%, 32% et 30%. La lignine et la cellulose sont peu altérées par les prétraitements mettant en jeu de l'ammoniaque. Le taux de lignine est resté supérieur ou égale à 8% après prétraitement, tandis que celui de la cellulose est resté supérieur à 50%. Ce n'est que dans le cas du prétraitement aux ultrasons que le taux de cellulose a atteint 46%.

En comparant ces chiffres à ceux des traitements alcalins en présence de soude il apparaît que, pour les mêmes types de prétraitements physiques associés, l'ammoniaque (0,2mol/L) entraîne une solubilisation moins importante que la soude (0,2mol/L).

Une étude complémentaire a été réalisée avec une concentration en ammoniacque plus élevée (1,44mol/L) afin d'atteindre un pH de 12,3 semblable à celui de la soude à 0,2mol/L. Dans ces conditions et en présence d'ultrasons, la solubilisation reste faible (10%). Le pH n'est donc pas le seul facteur favorisant la déconstruction de la paille lors des prétraitements alcalins.

Aux vus des résultats de solubilisation et de dégradation de la paille extraite, l'ammoniacque est donc nettement moins efficace que la soude comme prétraitement pour augmenter l'accessibilité à l'holocellulose de la paille de blé.

b) Potentiel méthanogène de la paille prétraitée

L'ajout d'ammoniacque dans le digestat étant un des intérêts visé de ce prétraitement, les TPM (Figure 75) ont été effectués avec les fractions liquides liées aux prétraitements. Dans chaque cas, la concentration en matière organique est de 10 g.MO/L d'inoculum.

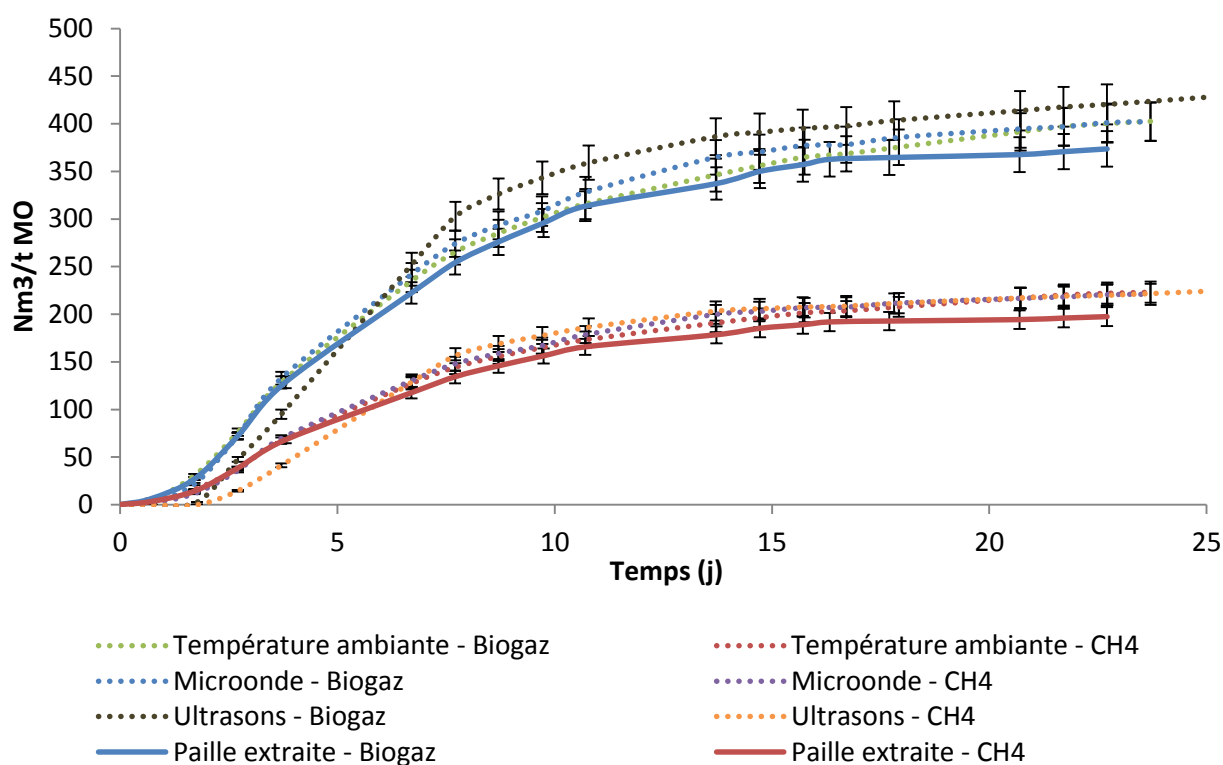


Figure 75 : Production de biogaz total et CH₄, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée avec NH₄OH (0,2mol/L) à température ambiante ou associé à un chauffage par micro-ondes (90°C) pendant 1h ou à de la sonication pendant 1h.

Au bout de 23 jours de méthanisation, les productions de biogaz (Figure 67) pour la paille extraite (371 Nm³gaz/t.MSV) non traitée ou prétraitée à l'ammoniacque à température ambiante ou associé à un chauffage par micro-ondes ou à la sonication sont respectivement

de 401 ; 401 et 420 Nm³gaz/t.MSV. Les productions de méthane, quant à elles, sont respectivement de 197 Nm³gaz/t.MSV pour la biomasse non prétraitée et de 219 Nm³gaz/t.MSV après tout prétraitement.

En conséquence l'ajout d'ammoniaque à cette concentration, quel que soit le prétraitement physique associé, lors du prétraitement de la paille de blé, n'a aucun effet sur sa méthanisation. Du point de vue de la production d'énergie à partir de biomasse lignocellulosique, l'ammoniaque n'a donc aucun intérêt. Par contre, la valorisation du digestat après compostage pourrait être augmentée grâce à un taux d'azote plus important.

D. Prétraitement oxydatif à l’ozone

Afin de favoriser l’accessibilité de l’holocellulose aux enzymes permettant son hydrolyse, la fragmentation de la lignine et sa solubilisation sont des approches intéressantes. Précédemment, la saponification des liaisons ester a été envisagée, en utilisant des solutions alcalines. Avec le prétraitement à l’ozone c’est l’oxydation, et par conséquent la dégradation, des noyaux aromatiques de la lignine qui est ciblée.

L’oxydation poussée de la biomasse lignocellulosique a été testée par (Lissens et al. 2004) en utilisant la méthode d’oxydation en voie humide, qui consiste à traiter la biomasse avec une pression d’oxygène de 12 bars à une température supérieure à 185°C pendant 15 minutes. Cette méthode permet de multiplier la production de méthane issu de déchets verts par deux. Cependant les températures exigées semblent incompatibles avec la production raisonnée de méthane à partir de paille de blé. L’oxydation de la lignine par ozonolyse a donc été la voie choisie dans ce travail. L’ozone est un agent oxydant puissant, qui cible en priorité les doubles liaisons carbone = carbone, par attaque électrophile, et entraîne la formation de groupements carbonyle. Le mécanisme d’ozonolyse est le suivant (Figure 76) :

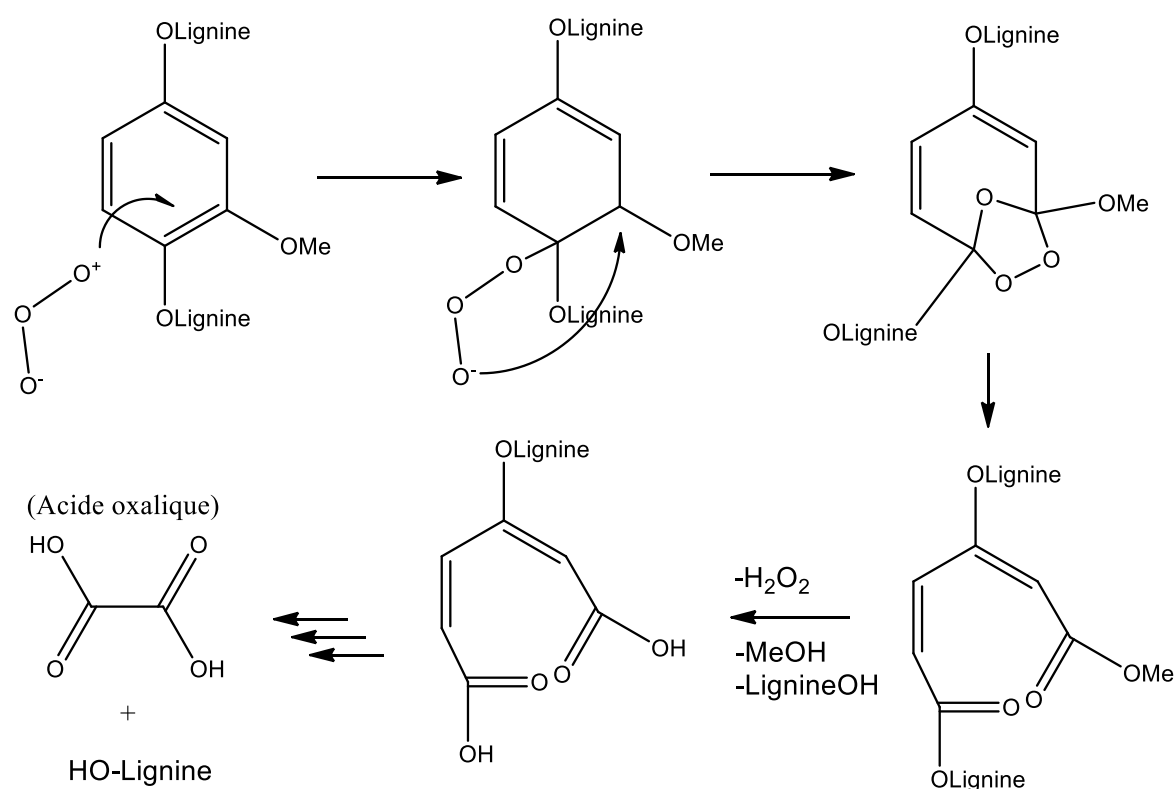


Figure 76 : Mécanisme d'ozonolyse d'un noyau aromatique au sein de la lignine

L'action poussée de l'ozone entraîne la formation d'acide oxalique qui est un chélatant de certains ions chargés positivement tels que Ca^{++} , Na^+ ou Fe^{++} . Or certains de ces éléments métalliques sont nécessaires au bon déroulement de la digestion anaérobie, et en particulier le fer, le cobalt, le nickel ou le zinc qui sont indispensables aux organismes méthanogènes (René Moletta et Verstraete 2011). L'impact de l'acide oxalique sur la méthanisation doit donc être analysé par TPM.

D'un point de vue pratique, l'ozonolyse de la paille de blé a été effectuée selon deux méthodes :

- Dissolution de l'ozone dans un milieu liquide contenant de la paille en suspension (ozonolyse en voie liquide).
- Réaction de l'ozone sur de la maille humidifiée (MS = 30%) (ozonolyse en voie humide).

1. Impact de l'acide oxalique sur la méthanisation

D'après la formule de Buswell, la méthanisation de l'acide oxalique entraîne la production de CO_2 et CH_4 respectivement 458 et 62 $\text{Nm}^3\text{gaz/t.MSV}$, soit 520 $\text{Nm}^3\text{gaz/t.MSV}$ de biogaz total. Le faible taux de production de méthane est dû à la proportion importante d'atome d'oxygène dans la molécule.

Afin d'évaluer sa capacité à être méthanisé en milieu anaérobie, l'acide oxalique a été mis en tant que substrat seul dans un digesteur anaérobie (5g/L d'inoculum).

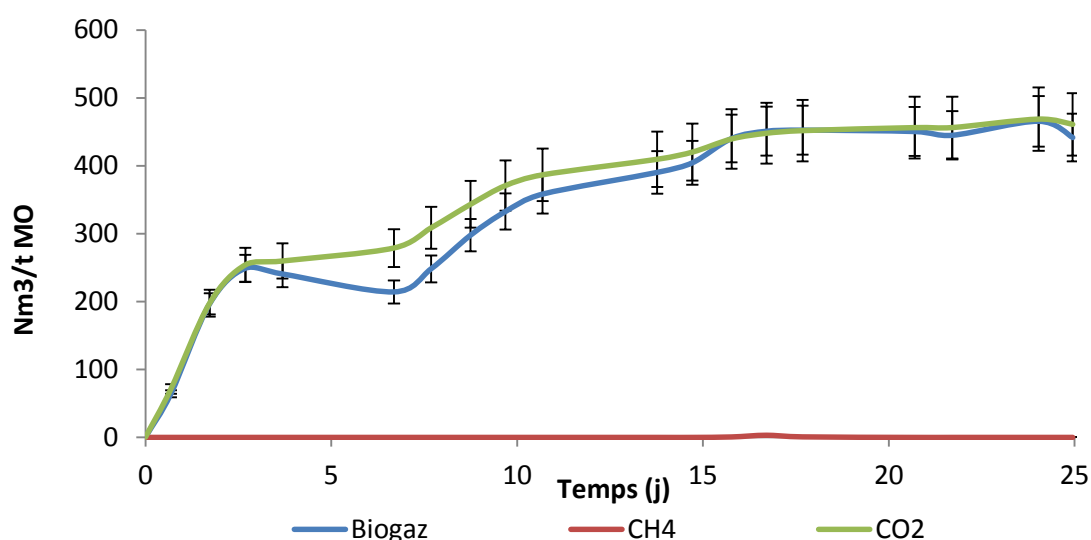


Figure 77 : Production de biogaz, CH_4 et CO_2 à partir d'acide oxalique (5g.MO/L d'inoculum)

Au bout de 25j de méthanisation (Figure 41), les productions de biogaz total, de CO₂ et de CH₄ à partir d'acide oxalique sont respectivement de 466 ; 469 et 0 Nm³gaz/t.MSV. La production de méthane étant nulle, une inhibition de l'étape de méthanogenèse est possible. Elle doit s'expliquer par la baisse de la concentration en éléments métalliques dans le milieu. La baisse de la production de biogaz total observée entre le 2^{ème} et le 7^{ème} jour va aussi dans le sens d'une inhibition de la digestion anaérobie.

Malgré une légère inhibition observée en présence d'acide oxalique, son impact ne semble pas majeur, vue la production de CO₂ qui correspond à celle prévue par la formule de Buswell. Cette étude ne remet donc pas en cause l'utilisation de l'ozone comme prétraitement de la paille de blé en vue de sa méthanisation.

2. Impact de l'ozone sur la composition de la paille extraite (selon Van Soest)

Après prétraitement de la paille extraite à l'ozone pendant 30min en milieu liquide, la fraction solide prétraitée est récupérée par filtration. Dans le cas du prétraitement en voie humide, la fraction solide est lavée à l'eau chaude (≈100°C) ou avec une solution de soude diluée (0,2mol/L) sur verre fritté (n°2). Après le prétraitement en voie liquide ou voie humide lavée à l'eau ou à la soude, les fractions solides récupérées représentent respectivement 94%, 94% et 80%. La paille de blé a donc été solubilisée ou réduite en particule de diamètre inférieur à 100 µm à hauteur de 6%, 6% et 20%. Le lavage à la soude diluée permet donc une bonne solubilisation des fractions dégradées pendant le prétraitement à l'ozone.

L'analyse Van Soest a été réalisée sur les fractions solides restantes afin de connaître leurs compositions (Figure 78).

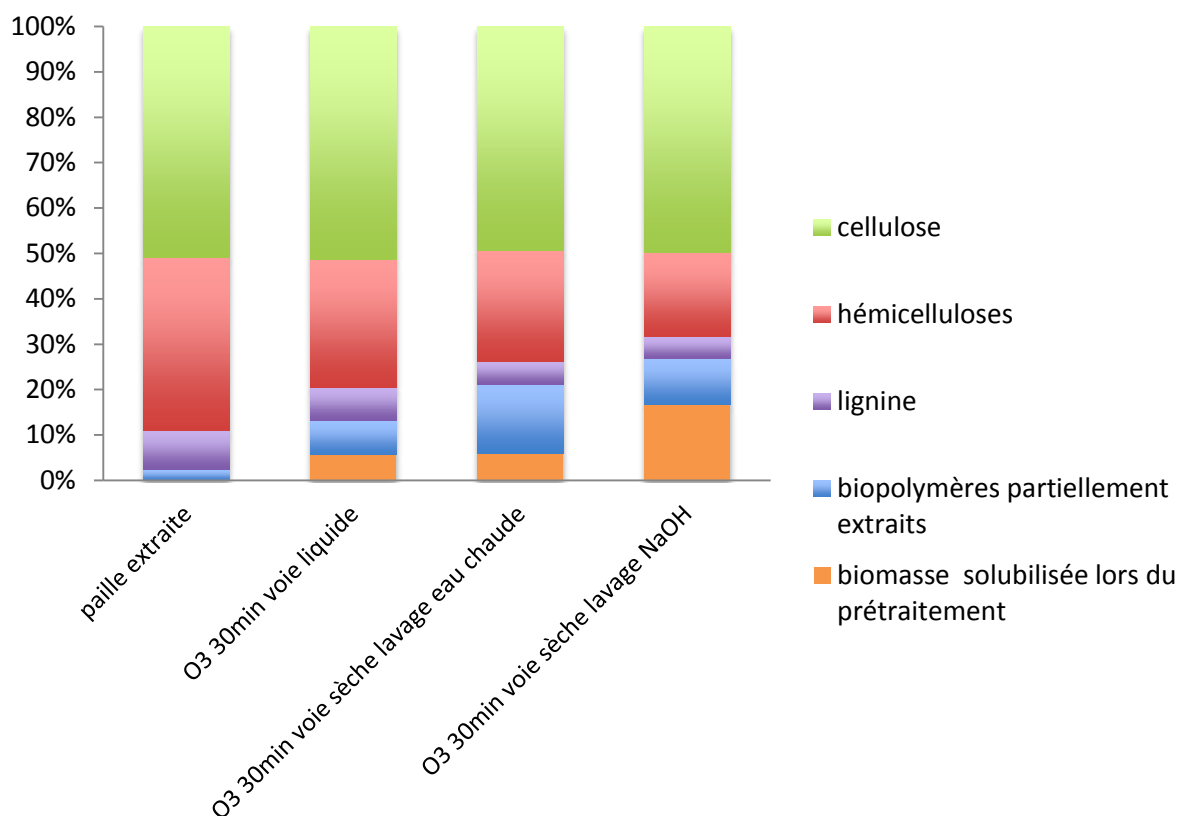


Figure 78 : Taux des différentes fractions de la paille extraite sans prétraitement ou prétraitée à l’ozone pendant 30min, en voie liquide ou solide suivi d’un lavage à l’eau chaude ou à la soude.

Les prétraitements à l’ozone en voie liquide ou solide suivis d’un lavage à l’eau chaude ou à la soude ont permis la dégradation d’une partie des hémicelluloses dont le taux est passé de 38% pour la paille extraite à respectivement 28%, 24% et 19%. La lignine est aussi fortement dégradée par l’ozone puisque son taux chute, respectivement à 7,3%, 5,1% et 4,7%. Par contre, la cellulose est peu touchée par les prétraitements à l’ozone puisque son taux reste compris entre 49% et 51%.

Notons que le traitement en voie liquide est le moins efficace à tout point de vue pour la dégradation de la paille extraite. Après prétraitement en voie sèche le lavage le plus efficace reste celui à la soude, tant pour la solubilisation de la paille que pour l’extraction de la lignine partiellement dégradée.

L’ozone est efficace pour dégrader la lignine dans la paille extraite, mais entraîne aussi une dégradation des hémicelluloses. Cependant les sucres - substrat d’intérêt pour la méthanisation - restent peut être méthanisables dans la fraction solubilisée après lavage. Enfin, la dégradation de la lignine a pu créer des inhibiteurs de la méthanisation. Ainsi, même si l’accessibilité à l’holocellulose doit être améliorée par les prétraitements à l’ozone, il faut

vérifier par TPM qu'ils sont bien associés à une amélioration du potentiel de production de méthane de la paille extraite.

3. Potentiel méthanogène de la paille prétraitée

Des TPM ont été effectués sur de la paille extraite après prétraitements à l'ozone en voie liquide ou solide suivies d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude. Afin d'éviter l'inhibition liée aux fractions dérivées de la lignine, produites par l'ozonolyse, les TPM (Figure 79) sont effectués uniquement sur les fractions solides récupérées après prétraitement. Un TPM a aussi été effectué sur de la paille traitée à l'ozone en voie humide et sans lavage. Ainsi l'effet inhibiteur des fractions dégradées de la paille peut être pris en compte.

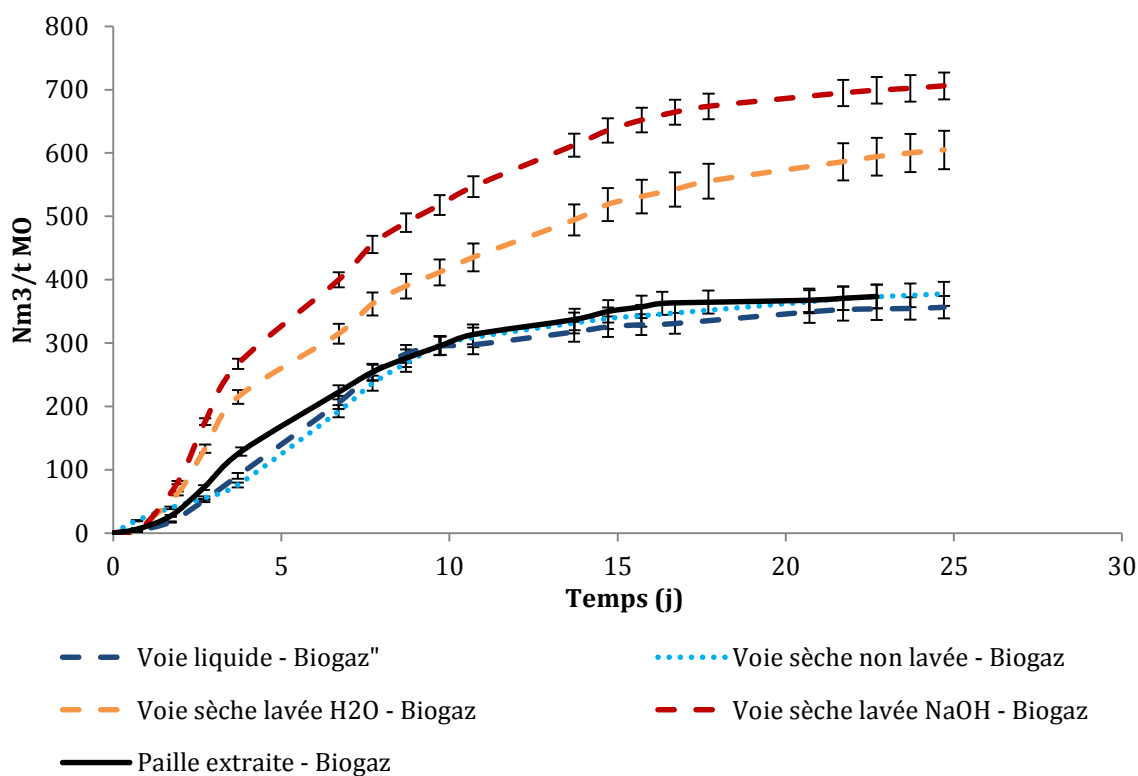


Figure 79 : Production de biogaz total, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée avec O₃ pendant 30min en voie liquide ou solide suivi ou non d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude.

Après 23 jours de méthanisation, les productions de biogaz (Figure 79) pour la paille extraite non traitée (371 Nm³gaz/t.MSV) ou prétraitée à l'ozone en voie liquide ou solide suivies ou non d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude, sont respectivement de 354 ; 373 ; 594 et 699 Nm³gaz/t.MSV quand seule la fraction solide est testée en TPM.

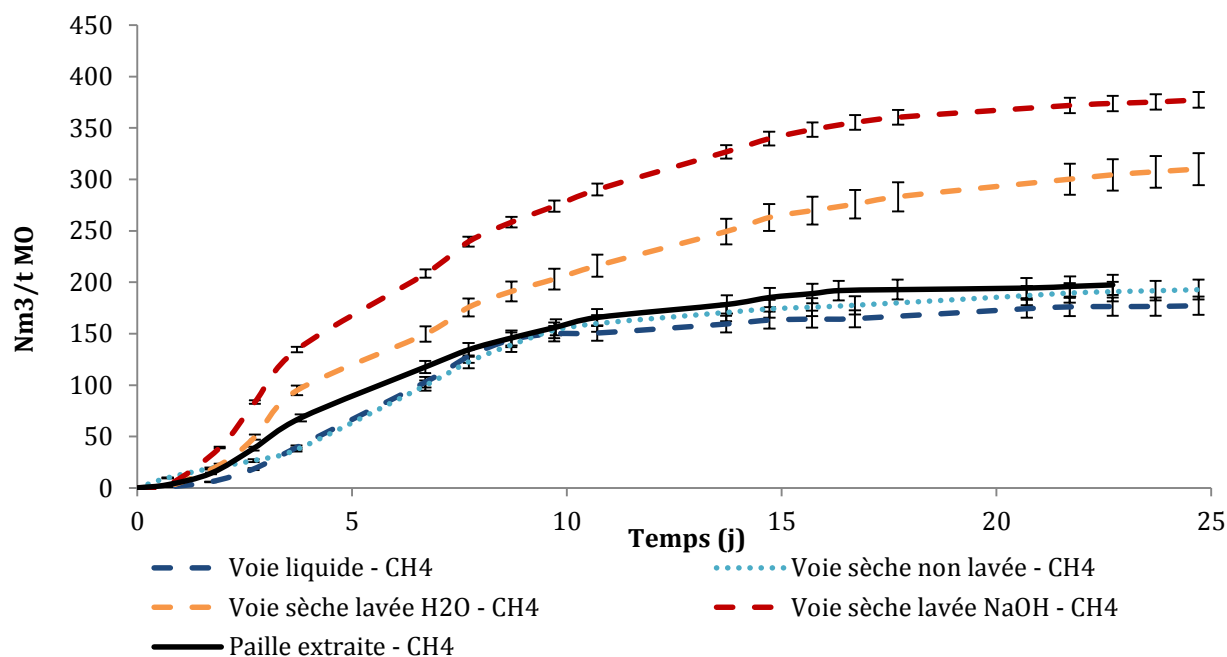


Figure 80 : Production de CH₄, des TPM de la paille extraite et de paille extraite prétraitée avec O₃ pendant 30min en voie liquide ou solide suivi ou non d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude.

Les productions de méthane (Figure 80) pour la paille extraite non traitée (197 Nm³gaz/t.MSV) ou prétraitée à l'ozone en voie liquide ou solide suivies ou non d'un lavage à l'eau chaude ou à la soude, sont respectivement de 176 ; 191 ; 304 et 374 Nm³gaz/t.MSV. Les rendements de production de méthane sont donc de 41%, 45%, 71% et 88%.

Le prétraitement à l'ozone en voie liquide ou en voie sèche sans lavage ne semble donc avoir aucun intérêt vis-à-vis de la méthanisation. Par contre si ce prétraitement est associé à un lavage à l'eau ou à la soude diluée, la production de biogaz est améliorée de 60% à 88% tandis que la production de méthane est améliorée de 54% à 90%. Cela confirme le fait que les fractions oxydées de la lignine, présentent des effets inhibiteurs sur la méthanisation. Leurs actions inhibitrices sont contrebalancées par la meilleure transformation en méthane de la fraction holocellulosique rendue plus accessible par les prétraitements à l'ozone. Ces résultats sont à rapprocher des études montrant que la lignine solubilisée par le prétraitement à l'ozone est un inhibiteur de l'activité enzymatique des cellulases, xylanases et glucosidases (Taherzadeh et Karimi 2008; Berlin et al. 2006; J. Wu, Ein-Mozaffari, et Upreti 2013).

Le prétraitement à l'ozone suivi d'un lavage à la soude est, par conséquent, efficace pour la production de méthane par méthanisation. Par contre il pose la question de la valorisation ou du traitement de l'effluent liquide impropre à la méthanisation.

Afin d'ouvrir la voie à la valorisation de la fraction liquide après lavage de la paille traitée à l'ozone la caractérisation de ses composants chimiques est nécessaire. Cependant, la multitude de ses composants rend leur analyse difficile.

4. Analyse de la fraction liquide par RMN-H après séparation par chromatographie Flash

Après rinçage à la soude, la fraction liquide a été analysée par chromatographie liquide (HPLC) sur un gel de silice greffé C-18 (hydrophobe). Cela a permis de mettre en évidence la présence de composés non répertoriés dans la base de données (interne au LCPO) associée à cette colonne. Une analyse plus poussées de ces fractions a semblé nécessaire.

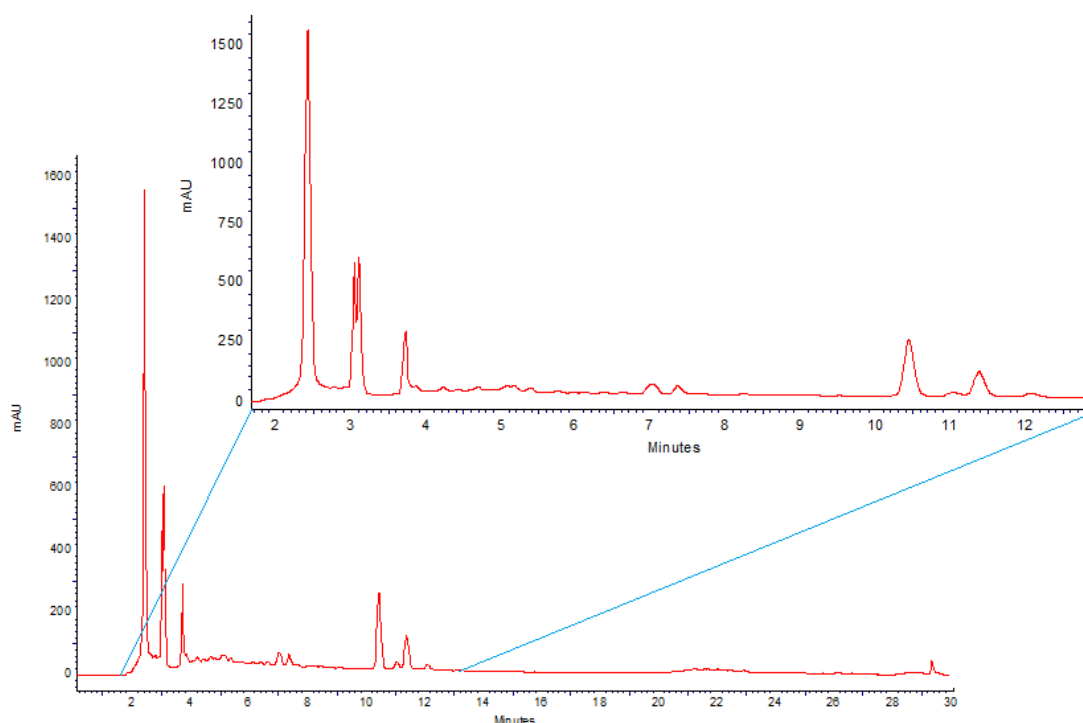


Figure 81 : Chromatogramme lié à l'analyse par HPLC de la fraction solubilisée par le prétraitement à l'ozone suivie d'un lavage à la soude.

a) Séparation par chromatographie Flash

Afin d'étudier la composition de cette fraction par RMN, une séparation par chromatographie Flash a été effectuée en utilisant les données de la HPLC pour calculer le gradient de la phase mobile. Trois fractions distinctes ont été repérées et récupérées (Figure 82).

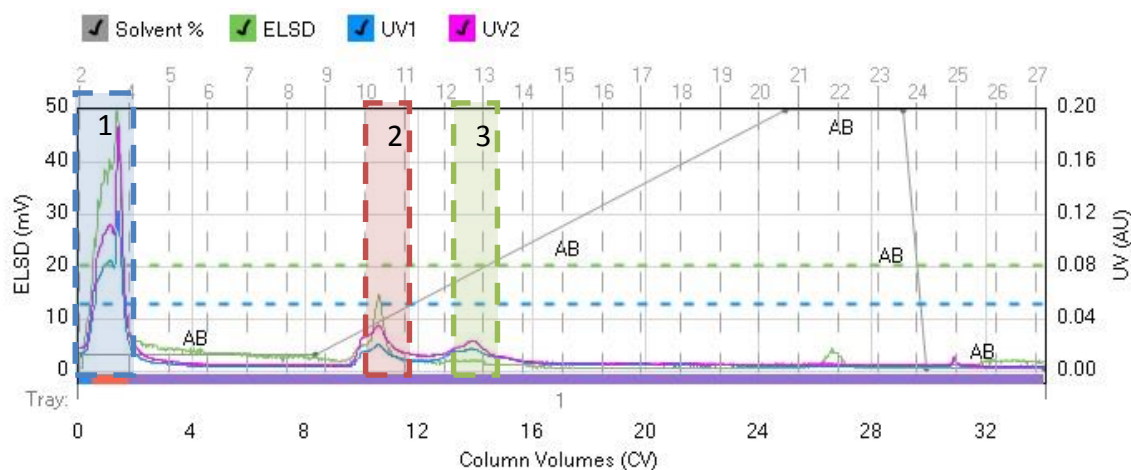


Figure 82 : Chromatogramme de la première séparation par chromatographie Flash

La fraction 1 (69% de la masse) a été réinjectée dans la chromatographie Flash pour un deuxième cycle de séparation, tandis que les fractions 2 (10%) et 3 (8%) ont été lyophilisées pour analyse RMN. Néanmoins la resolubilisation de la fraction 3 n'a pas été possible, seule la fraction 2 a donc pu être analysée.

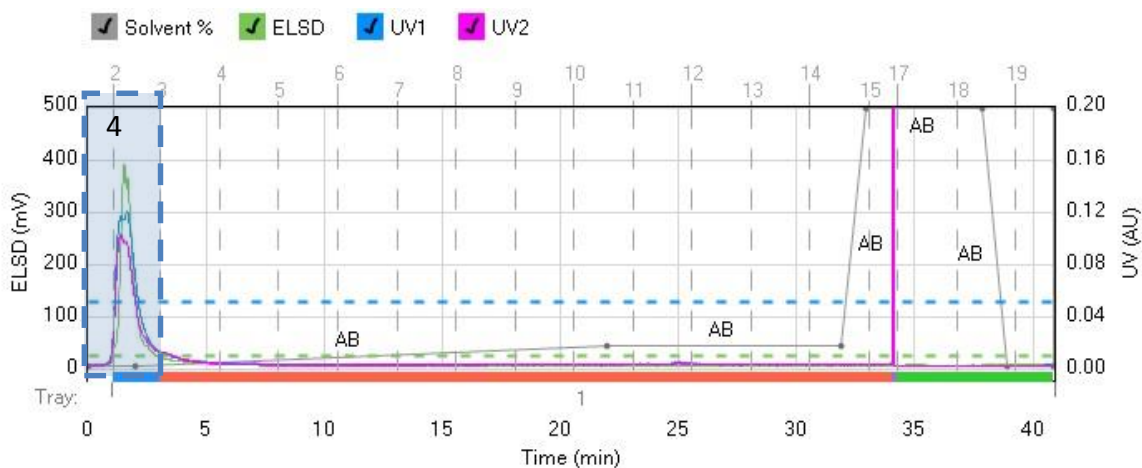


Figure 83 : Chromatogramme de la seconde séparation par chromatographie Flash

Suite à la seconde purification par chromatographie Flash avec un gradient différent (Figure 83), un seul pic apparaît. La fraction associée a donc été récupérée puis lyophilisée pour analyse par RMN-H, elle est nommée fraction 4.

b) RMN-H

Après solubilisation dans D₂O, l'analyse de la fraction 4 par RMN-H a donné le spectre suivant (Figure 84) :

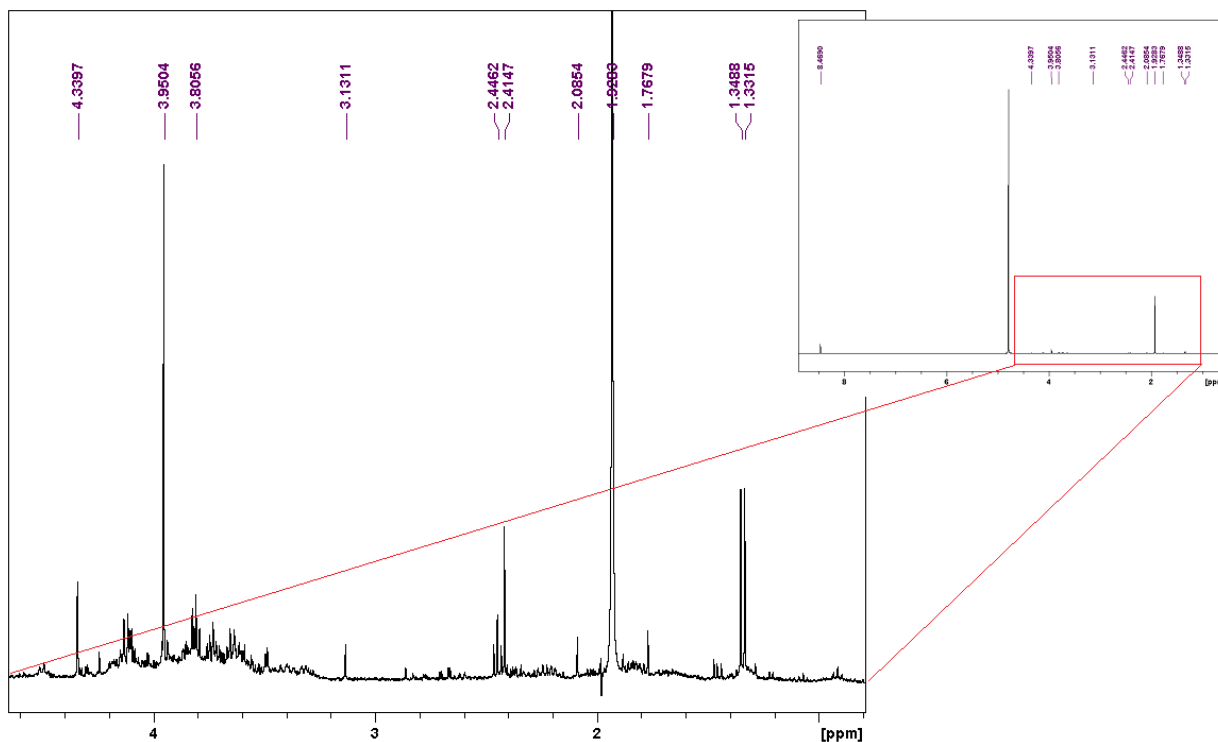


Figure 84 : Spectre de l'analyse RMN-H de la fraction n°4

Le grand nombre de signaux sur le spectre RMN de la fraction 4 rend son analyse impossible. Ce phénomène doit être dû à la présence d'une variété importante de molécules différentes au sein du mélange. Malgré cela, il semble que les signaux compris entre 3 et 4,5 ppm correspondent à ceux d'un sucre.

L'analyse de la fraction n°2 (solubilisée dans le D₂O) par la méthode DOSY (Figure 85) permet de mettre en évidence la présence de deux familles distinctes. Une analyse plus poussée par RMN est donc possible. L'observation du spectre du proton associé à l'analyse DOSY met en évidence le fait que les environnements chimiques des protons des deux molécules sont semblables. Seule la présence d'un multiplet dont la résonance est proche de 4,6 ppm différencie les deux molécules.

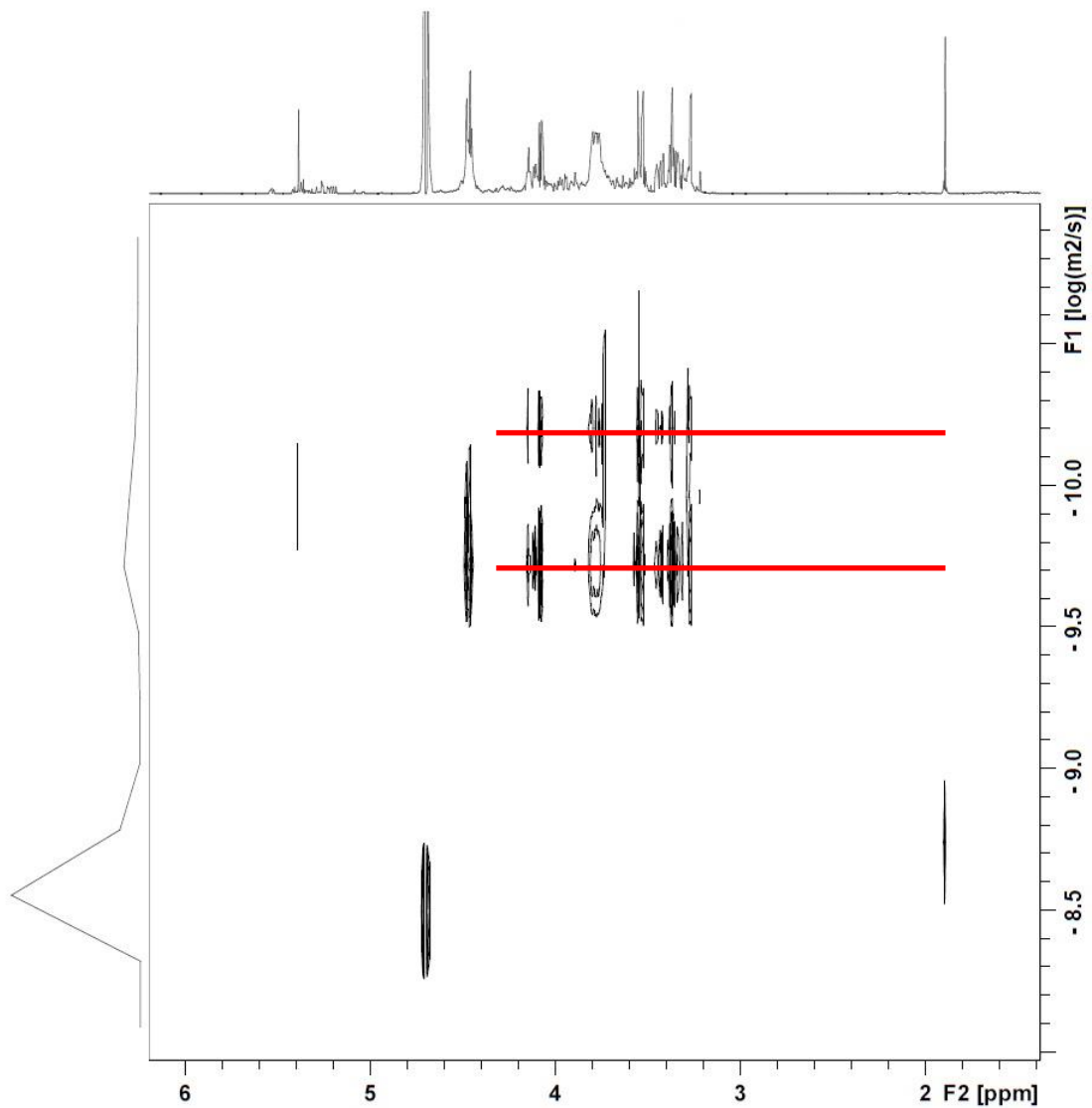


Figure 85 : Spectre de RMN-H Dosy de la fraction n°2

Le spectre ressemble à celui d'un sucre, afin de mieux caractériser ces molécules une analyse par RMN proton-carbone (HSQC) a été nécessaire (Figure 86). Plusieurs études portant sur la caractérisation des hémicelluloses (Bian et al. 2012; Xue et al. 2012; Bian et al. 2014) ont permis d'interpréter ce spectre.

La fraction majoritaire récupérée après lavage de la paille prétraitée à l'ozone, pouvant être analysée, est constituée d'arabinose et de xylose. Cette fraction devrait donc être facilement méthanisable

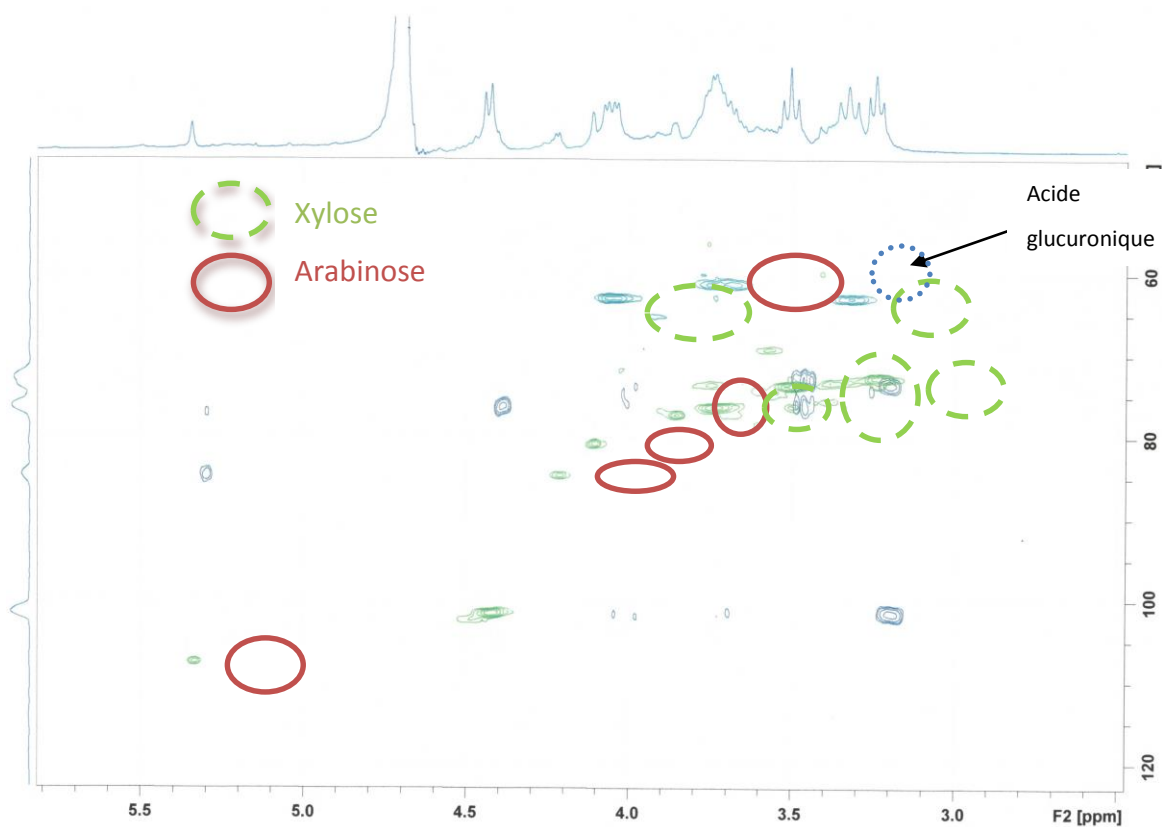


Figure 86 : Spectre de RMN HSQC effectué sur la fraction n°2

Les fractions issues de l'oxydation de la lignine ne sont pas présentes dans la fraction n°2, leur analyse n'a donc pas été possible. Elles sont probablement dans la fraction 3.

E. Conclusion sur les prétraitements physico-chimiques

Plusieurs prétraitements physico-chimiques ont été étudiés dans cette partie, mettant en jeu différents réactifs : la soude, l'ammoniaque et l'ozone. Les prétraitements à la soude sont les plus efficaces vis-à-vis de la déconstruction de la paille de blé et de l'augmentation du rendement et de la cinétique de sa méthanisation. Ainsi après un prétraitement nécessitant une consommation en soude de l'ordre de 0,1g/g de paille, le rendement de méthanisation de la paille peut atteindre 95% lorsque la soude est associée à une irradiation aux micro-ondes pendant 1 heure.

Cependant, en tenant compte de l'énergie supplémentaire, fournie par la méthanisation de la paille après prétraitement, et des dépenses énergétiques nécessaires aux prétraitements physiques associés à la soude, le bilan n'est pas en faveur des prétraitements physico-chimiques. D'un point de vue énergétique, le traitement à la soude à température ambiante reste le plus efficace, tout en permettant un rendement de production de méthane (77%) nettement supérieur à celui obtenu sans prétraitement (46%).

Enfin le traitement aux ultrasons pendant 5 minutes, même s'il engage de l'énergie sans permettre d'augmenter le rendement de production de biogaz par rapport au traitement à température ambiante pendant 1 heure, a le mérite d'en réduire considérablement la durée. D'un point de vue industriel, ce traitement court (5 min) peut donc être intéressant.

Notons que les prétraitements associant soude et micro-ondes ou soude et ultrasons libèrent des inhibiteurs de la méthanisation, diminuant les rendements finaux de production de méthane dans cette étude. La méthanisation des fractions liquide et solide dans deux réacteurs anaérobie différents, dimensionnés spécialement pour chaque type de fraction, pourrait résoudre ces problèmes, et ouvrir la voie à ces prétraitements physico-chimiques.

Le prétraitement à l'ammoniaque n'apporte aucune amélioration à la méthanisation et est donc à abandonner. Cependant, aucune inhibition de la méthanisation n'est observée, cette étude prouve donc que la présence d'ammoniaque associée à un substrat lignocellulosique n'est pas un frein à sa méthanisation.

Enfin le traitement à l'ozone, même s'il entraîne la modification d'une partie de la lignine, ne permet pas d'améliorer le rendement de méthanisation de la paille si celle-ci n'est pas lavée suite à l'ozonolyse. Après rinçage de la paille à l'eau chaude ou à la soude, les rendements atteignent respectivement 71% et 88%, ce qui prouve qu'il y a formation d'inhibiteurs de la méthanisation, lors de l'oxydation de la paille à l'ozone.

CONCLUSION GENERALE

L'amélioration de la digestibilité de la biomasse lignocellulosique en milieu anaérobie pour la production de méthane est une des voies pour la substitution des ressources fossiles. La mise en place de prétraitements réalistes constitue le verrou pour le déploiement de cette voie de valorisation. Le choix s'est porté sur la paille de blé qui est une biomasse représentative en termes de potentiel méthanogène et disponible rapidement et en grande quantité pour cette biotransformation. Afin de faire le lien entre les prétraitements et leurs impacts sur la méthanisation de la paille, différentes études ont été menées pour appréhender les variations de composition de la paille prétraitée. En particulier l'analyse selon Van Soest, a permis de mesurer des variations de taux de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Les prétraitements testés ont été de nature physique ou physico-chimique. Les meilleurs résultats en termes de production de méthane et de cinétique de méthanisation ont été obtenus suite à des prétraitements alcalins faisant intervenir la soude. Par ailleurs, afin de mieux cibler les prétraitements, leurs impacts sur la structure et la composition de la biomasse ont été appréhendés. Une étude sur les différentes fractions de la paille de blé (extractibles, cellulose, hémicelluloses et lignine) a été menée pour évaluer leur potentiel méthanogène respectif et l'impact des interactions lignine-holocellulose sur la méthanisation. Le rôle particulier de la lignine lors de la méthanisation de la paille a été abordé et en particulier les effets de la libération de certains composés dérivés lors des prétraitements.

Dans la première partie, l'étude de la paille de blé et de ses différentes fractions (extractibles, holocellulose, cellulose et lignine) a permis de les caractériser et d'évaluer leurs impacts sur la méthanisation, ainsi que ceux liés aux interactions qu'elles ont entre elles au sein de la paille. Sans aucun prétraitement, la paille de blé est transformée en méthane à hauteur de 42% après 21 jours de digestion anaérobie. Bien que la lignine extraite de la paille de blé ne soit pas méthanisable en 21 jours, elle n'est pas inhibitrice de la méthanisation. Par contre, les rendements de méthanisation de l'holocellulose et de la cellulose sont importants (respectivement 59% et 72%) et celui des extractibles est du même ordre que celui de la paille (39%). L'impact négatif de la cristallinité, sur la cinétique de méthanisation lors des trois premiers jours de digestion anaérobie, a été montré par l'étude sur l'holocellulose et la cellulose. L'impact des interactions a été montré par l'étude d'une paille « théorique », constituée d'un mélange de lignine et d'holocellulose pures. Ainsi, la cinétique de production de biogaz a été améliorée de 40% après 7 jours de méthanisation. Enfin, l'analyse de la lignine

par RMN-³¹P a mis en évidence un taux important d'unités guaïacyle, syringyle et p-hydroxyphényle (proportion 2/1/1), ce qui est cohérent avec une lignine de plante annuelle.

La seconde partie, a permis d'évaluer les impacts de différentes molécules phénoliques dérivées de la lignine, sur la méthanisation, dans des conditions relativement concentrées (5g/L.inoculum). Dans le cas de structures phénoliques présentant un acide carboxylique comme l'acide vanillique ou l'acide férulique porté par une chaîne carbonée (respectivement 1 et 3 carbones) en position para de l'hydroxyle phénolique, la méthanisation est efficace (rendement en méthane 78% et 64%). Un temps de « latence » important (respectivement 10 et 15 jours) est cependant observé avant que la production de méthane n'apparaisse. Par contre, la vanilline est un inhibiteur de la méthanisation à partir de 5g/L d'inoculum, ce qui n'est plus le cas pour des concentrations plus faible. Enfin les autres molécules testées (isoeugénol, alcool vanillique, alcool vératrylique et créosol) sont toutes des inhibiteurs de la méthanisation.

Les molécules aromatiques présentant une fonction phénolique sont donc majoritairement des inhibiteurs de la méthanisation. Cependant, la présence d'une fonction oxydée, et à plus forte raison d'une fonction acide carboxylique, en para semble rendre ces molécules fortement biodégradables (~75% de biodégradation). Une hypothèse qui reste à valider serait que cette fonction permette la reconnaissance de la molécule aromatique par une enzyme spécifique permettant son hydrolyse. Le temps de latence important (10 à 15 jours) avant le début d'une production de biogaz rapide, va dans le sens d'une adaptation du milieu liée à la production de cette/ces enzyme(s).

La troisième partie est axée sur les prétraitements physiques de la paille, pour améliorer la production de méthane par digestion anaérobie. L'intensité de ces prétraitements a été choisie dans une gamme compatible avec le gain espéré pour la production de biogaz. Le raffinage, dont le but est d'augmenter l'accessibilité à l'holocellulose et de diminuer sa cristallinité, a été effectué à l'aide d'un raffineur de laboratoire (pile Valley). La cristallinité de la paille a bien diminué suite au raffinage, mais les rendements de méthanisation n'ont pas changé significativement, l'accessibilité à l'holocellulose pour les enzymes permettant son hydrolyse n'a donc pas évolué. D'autres prétraitements ont été évalués : les ultrasons et le chauffage à 90°C par convection et par exposition aux micro-ondes. Leurs impacts sont négligeables, tant sur le rendement de méthanisation, que sur la solubilisation de la fraction lignocellulosique de la paille.

Ces prétraitements physiques ont ensuite été associés à des réactifs chimiques dans la quatrième partie, mettant en jeu différents réactifs connus pour déconstruire la biomasse : la soude, l'ammoniaque et l'ozone. L'utilisation de soude à raison de 0,1g/g.paille a donné de bons résultats tant en termes de solubilisation de la fraction lignocellulosique que pour la méthanisation de la paille. Un rendement de 95% est observé quand la soude est associée à une irradiation aux micro-ondes pendant 1 heure. Des prétraitements de courte durée (5 minutes) ont aussi été testés, en présence de soude et de micro-ondes ou d'ultrasons. Ils ont apporté une amélioration de la méthanisation du même ordre que le prétraitement à température ambiante pendant 1 heure (rendement en méthane = 77%) tout en permettant de réduire le temps de prétraitement. Par contre, les prétraitements faisant intervenir des micro-ondes ou des ultrasons libèrent des inhibiteurs de la méthanisation dans la fraction solubilisée, alors que ce n'est pas le cas pour le chauffage « traditionnel » par convection. Par ailleurs, malgré son caractère alcalin, l'ammoniaque n'a permis aucune amélioration de la méthanisation.

Enfin le seul prétraitement à l'ozone n'a pas permis d'augmenter le rendement de méthanisation, alors même qu'il a entraîné une oxydation d'une partie de la lignine. Pour que ce prétraitement soit efficace, la paille prétraitée a dû être lavée suite à l'ozonolyse. En effet, après rinçage à l'eau chaude ou à l'aide d'une solution de soude, les rendements de méthanisation sont respectivement de 71% et 88%. La formation d'inhibiteurs de la méthanisation est due à l'ozonolyse de la lignine, or l'analyse de la fraction solubilisée a mis en évidence la présence de différentes molécules, mais seuls deux polysaccharides de faibles masses moléculaires ont pu être identifiés.

Ces travaux ont mis en avant l'influence positive de l'utilisation des prétraitements à la soude, pour solubiliser une partie des hémicelluloses et de la lignine de la paille, améliorant ainsi sa capacité à être transformée en méthane par digestion anaérobie. La fraction solubilisée doit contenir des oligomères qui, après purification, pourraient être valorisés par d'autres voies. Cependant, cela nécessite une meilleure connaissance des composés solubilisés et les tentatives de caractérisation menées par RMN, FT-IR et HPLC n'ont pas conduit à des résultats pertinents.

Par ailleurs, une étude de type « pilote » sur de la paille prétraitée à la soude à 90°C en présence de micro-ondes ou d'ultrasons, permettrait de mieux évaluer les dépenses énergétiques liées à ces traitements et d'effectuer un bilan énergétique plus précis. Cette

étude permettrait aussi d'envisager une analyse de cycle de vie (ACV) de ces prétraitements afin de les comparer entre eux.

Enfin, une meilleure compréhension des phénomènes intervenant dans la méthanisation des molécules phénoliques, pourrait ouvrir la voie à de nouveaux prétraitements, permettant de dégrader des molécules jusqu'alors considérées comme inaptes à la méthanisation. Les points à éclaircir sont la compréhension du temps de « latence » dans le cas de l'acide vanillique et de l'acide férulique et l'explication de l'impact de la fonction acide carboxylique sur la méthanisation des molécules phénoliques. Une étude de l'expression des enzymes, liées à la dégradation de ces molécules, pourrait peut-être donner un éclairage nouveau sur la compréhension de la méthanisation des molécules phénoliques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ADEME. 1998. « résidus de culture paille de cereale. Etude AGRICE ».
- . 2012. « Les installations de traitement des ordures ménagères ».
- Allerdings, Ella, John Ralph, Paul F. Schatz, Diana Gniechwitz, Hans Steinhart, et Mirko Bunzel. 2005. « Isolation and structural identification of diarabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre ». *Phytochemistry* 66 (1): 113-124. doi:10.1016/j.phytochem.2004.10.026.
- Almeida, Joao R. M., Tobias Modig, Anneli Petersson, Bärbel Hähn-Hägerdal, Gunnar Liden, et Marie F. Gorwa-Grauslund. 2013. « Increased Tolerance and Conversion of Inhibitors in Lignocellulosic Hydrolysates by *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82 (4): 340-349.
- Amann, R.I., W. Ludwig, et K.-H. Schleifer. 1995. « Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation ». *Microbiological Reviews* 59 (1): 143-169.
- Amon, T., B. Amon, V. Kryvoruchko, A. Machmüller, K. Hopfner-Sixt, V. Bodiroza, R. Hrbek, et al. 2007. « Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations ». *Bioresource Technology* 98 (17): 3204-3212.
- Araújo, José D. P., Carlos A. Grande, et Alírio E. Rodrigues. 2010. « Vanillin production from lignin oxidation in a batch reactor ». *Chemical Engineering Research and Design* 88 (8): 1024-1032.
- Argyropoulos, Dimitris S. 1994. « Quantitative Phosphorus-31 NMR Analysis of Lignins, a New Tool for the Lignin Chemist ». *Journal of Wood Chemistry and Technology* 14 (1): 45-63.
- Aspinall, G.O. 1959. *Structural Chemistry of the Hemicelluloses*. Vol. 14.

B

- Barakat, Abdellatif, Florian Monlau, Jean-Philippe Steyer, et Hélène Carrere. 2012. « Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production ». *Bioresource Technology* 104: 90-99.
- Béguin, Pierre, et Jean-Paul Aubert. 1994. « The Biological Degradation of Cellulose ». *FEMS Microbiology Reviews* 13 (1): 25-58.
- Berger, Sylvaine, et Christian Couturier. 2011. « La méthanisation en milieu rural ». In *La méthanisation*, by René Moletta, 2e édition [entièrement actualisée]. Paris: Éd. Tec & doc ;Lavoisier.
- Berlin, Alex, Mikhail Balakshin, Neil Gilkes, John Kadla, Vera Maximenko, Satoshi Kubo, et Jack Saddler. 2006. « Inhibition of Cellulase, Xylanase and Beta-Glucosidase Activities by Softwood Lignin Preparations ». *Journal of Biotechnology* 125 (2): 198-209.
- Bernet, Nicolas, et Pierre Buffière. 2011. « Caractérisation de la mise en oeuvre de la méthanisation ». In *La méthanisation*, by René Moletta, 2e édition [entièrement actualisée]. Paris: Éd. Tec & doc ;Lavoisier.

- Bhattacharya, Deepanjan, Louis T. Germinario, et William T. Winter. 2008. « Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse ». *Carbohydrate Polymers* 73 (3): 371-377.
- Bian, Jing, Feng Peng, Pai Peng, Feng Xu, et Run-Cang Sun. 2014. « Chemical Composition and Structural Feature of Populus Gansuensis Hemicellulosic Polymers ». *Journal of Applied Polymer Science* 124 (4): 3154-3164.
- Bian, Jing, Feng Peng, Xiao-Peng Peng, Feng Xu, Run-Cang Sun, et John F. Kennedy. 2012. « Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties ». *Carbohydrate Polymers* 88 (2): 638-645.
- Bodineau, Luc, et Jean-Christophe Pouet. 2006. « Etude bibliographique sur la combustion de produits issus de cultures annuelles (blé, paille, maïs) ». ADEME.
- Bunzel, M., A. Schüßler, et G. Tchetseubu Saha. 2011. « Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (23): 12506-12513.
- Buswell, A. M., et H. F. Mueller. 1952. « Mechanism of Methane Fermentation ». *Industrial & Engineering Chemistry* 44 (3): 550-552.

C

- Carrère, Hélène. 2011. « Co-traitements physico-chimiques ». In *La méthanisation*, by René Moletta, 2e édition [entièrement actualisée]. Paris: Éd. Tec & doc ;Lavoisier.
- Chandler, J.A., W.J. Jewell, et J.M. Gossett. 1980. « Predicting methane fermentation biodegradability ». *Biotechnology Bioengineering Symposium* NO.10 (10): 93-107.
- Chaudhry, A. S., et E. L. Miller. 1996. « The effect of sodium hydroxide and alkaline hydrogen peroxide on chemical composition of wheat straw and voluntary intake, growth and digesta kinetics in store lambs ». *Animal Feed Science and Technology* 60 (1): 69-86.

D

- Datta, Rathin. 1981. « Acidogenic Fermentation of Corn Stover ». *Biotechnology and Bioengineering* 23 (1): 61-77.
- Delgenes, J.P., R. Moletta, et J.M. Navarro. 1996. « Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae* ». *Enzyme and Microbial Technology* 19 (3): 220-225.
- Delmer, D. P., et Y. Amor. 1995. « Cellulose Biosynthesis. » *The Plant Cell Online* 7 (7): 987-1000.
- Dron, Dominique. 2007. *Bilan énergétique de la France pour 2006*. ReferenceS. Service de l'observation et des statistiques. Direction Générale de l'Énergie et des Matières Premières Observatoire de l'Énergie.
- . 2010. *Bilan énergétique de la France pour 2009*. ReferenceS. Service de l'observation et des statistiques. Commissariat général au développement durable.
- . 2011. *Bilan énergétique de la France pour 2010*. ReferenceS. Service de l'observation et des statistiques. Commissariat général au développement durable.

———. 2013. *Bilan énergétique de la France pour 2012*. ReferenceS. Service de l'observation et des statistiques. Commissariat général au développement durable.

F

- Fang, J. M., R. C. Sun, J. Tomkinson, et P. Fowler. 2000. « Acetylation of wheat straw hemicellulose B in a new non-aqueous swelling system ». *Carbohydrate Polymers* 41 (4): 379-387.
- Fedorak, Phillip M., et Steve E. Hrudehy. 1984. « The effects of phenol and some alkyl phenolics on batch anaerobic methanogenesis ». *Water Research* 18 (3): 361-367.
- Femenias, Alain, Jean-Claude Gazeau, et Pierre Palat. 2010. « Le méthane, un gaz à effet de serre: mesures de réduction et de valorisation des émissions anthropiques ». 006993-01. CONSEIL GÉNÉRAL DE L'ENVIRONNEMENT ET DU DEVELOPPEMENT DURABLE.
- Fengel, Dietrich, et Gerd Wegener. 1983. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter.
- Fernandes, T.V., G.J. Klaasse Bos, G. Zeeman, J.P.M. Sanders, et J.B. van Lier. 2009. « Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass ». *Bioresource Technology* 100 (9): 2575-2579.
- Fontaine, Nicole. 2003. *Livre blanc sur les énergies*. Vol. débat national sur les énergies. Ministère de l'économie des finances et de l'industrie.
- Food and Agricultural Organisation. 2013. « Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO Cereal Supply and Demand Brief ». <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>.

G

- Garcia, J.L. 1990. « Taxonomy and ecology of methanogens ». *FEMS Microbiology Letters* 87 (3-4): 297-308.
- GIE ARVALIS/ONIDOL. 2009. « conférence de presse REGIX ». juin 29. http://www.google.fr/url?sa=t&source=web&cd=3&ved=0CCUQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.arvalisinstitutduvegetal.fr%2Ffr%2Fichier%2Fcommuniqu%2F573_Annexes.pdf&rct=j&q=gisement%2Opaille&ei=eE5vTpzKLsvEswbl2IWnBw&usg=AFQjCNHDyBKlKamy-yqoCbmq3z2jieJbcg&cad=rja.
- Godon, Jean-Jacques. 2011. « Aspects biochimiques et microbiologiques de la méthanisation ». In *La méthanisation*, by René Moletta, 2e édition [entièrement actualisée]. Paris: Éd. Tec & doc ;Lavoisier.
- Guillou, Marion, et René Moletta. 2011. *La méthanisation*. 2e édition [entièrement actualisée]. Paris: Éd. Tec & doc.
- Gujer, W., et A.J.B. Zehnder. 1983. « Conversion processes in anaerobic digestion ». *Water Science and Technology* 15 (8-9): 127-167.

H

- Ha, Marie-Ann, David C. Apperley, Boyd W. Evans, I. Max Huxham, W. Gordon Jardine, Remco J. Viëtor, Danièle Reis, Brigitte Vian, et Michael C. Jarvis. 1998. « Fine Structure in Cellulose Microfibrils: NMR Evidence from Onion and Quince ». *The Plant Journal* 16 (2): 183-90.
- Han, Guangping, James Deng, Shuyin Zhang, Paul Bicho, et Qinglin Wu. 2010. « Effect of steam explosion treatment on characteristics of wheat straw ». *Industrial Crops and Products* 31 (1): 28-33.
- Hawken, Paul, Amory B Lovins, et Lovins. 2000. *Natural Capitalism: Creating the next Industrial Revolution*. Boston: Little, Brown and Co.
- Hernandez, J.E., et R.G.J. Edyvean. 2008. « Inhibition of biogas production and biodegradability by substituted phenolic compounds in anaerobic sludge ». *Journal of Hazardous Materials* 160 (1): 20-28.

J

- Jackowiak, D., D. Bassard, A. Paus, et T. Ribeiro. 2011. « Optimisation of a microwave pretreatment of wheat straw for methane production ». *Bioresource Technology* 102 (12): 6750-6756.
- Jackowiak, David. 2011. *Prétraitement de biomasses lignocellulosiques par microondes pour l'amélioration du procédé de biométhanisation*. Compiègne.
- Jackson, M. G. 1977. « Review article: The alkali treatment of straws ». *Animal Feed Science and Technology* 2 (2): 105-130.
- Jung, H.-J.G., V.H. Varel, P.J. Weimer, et J. Ralph. 1999. « Accuracy of Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Methods as Assessed by Bomb Calorimetry ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (5): 2005-2008.

K

- Kirk, T.K., et R.L. Farrell. 1987. « Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. » *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Klinke, H.B., B.K. Ahring, A.S. Schmidt, et A.B. Thomsen. 2002. « Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw ». *Bioresource Technology* 82 (1): 15-26.
- Kögel-Knabner, Ingrid. 2002. « The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter ». *Soil Biology and Biochemistry* 34 (2): 139-162.
- Kuhad, R.C., A. Singh, et K.E. Eriksson. 1997. « Microorganisms and Enzymes Involved in the Degradation of Plant Fiber Cell Walls. » *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology* 57: 45-125.

L

- Lecourt, Michael, Jean-Claude Sigoillot, et Michel Petit-Conil. 2010. « Cellulase-assisted refining of chemical pulps: Impact of enzymatic charge and refining intensity on energy consumption and pulp quality ». *Process Biochemistry* 45 (8): 1274-1278.
- Lin, Yunqin, Dehan Wang, Shaoquan Wu, et Chunmin Wang. 2009. « Alkali pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge ». *Journal of Hazardous Materials* 170 (1): 366-373.
- Lissens, G., A.B. Thomsen, L. De Baere, W. Verstraete, et B.K. Ahring. 2004. « Thermal wet oxidation improves anaerobic biodegradability of raw and digested biowaste ». *Environmental Science and Technology* 38 (12): 3418-3424.
- Liu, Chuan-Fu, et Run-Cang Sun. 2010. « Chapter 5 - Cellulose ». In *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, 131-167.
- Lu, Fachuang, et John Ralph. 2010. « Chapter 6 - Lignin ». In *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, 169-207.

M

- McInerney, J.O., M. Wilkinson, J.W. Patching, T.M. Embley, et R. Powell. 1995. « Recovery and phylogenetic analysis of novel archaeal rRNA sequences from a deep-sea deposit feeder ». *Applied and Environmental Microbiology* 61 (4): 1646-1648.
- McInerney, M.J., R.I. Mackie, et M.P. Bryant. 1981. « Syntrophic association of a butyrate-degrading bacterium and *Methanosarcina* enriched from bovine rumen fluid ». *Applied and Environmental Microbiology* 41 (3): 826-828.
- Microsolution. 2013. « Feuille (Epinard) ». Consulté le septembre 22. <http://www.microresolution.net/popup.php?ID=131&aID=39#>.
- Mohsenzadeh, Abas, Azam Jeihanipour, Keikhosro Karimi, et Mohammad J. Taherzadeh. 2012. « Alkali Pretreatment of Softwood Spruce and Hardwood Birch by NaOH/thiourea, NaOH/urea, NaOH/urea/thiourea, and NaOH/PEG to Improve Ethanol and Biogas Production ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 87 (8): 1209-14.
- Moletta, R. 1993. « Anaerobic processing: From the smallest to the largest ». *Biofutur* (119): 16-25.
- Moletta, René, et Willy Verstraete. 2011. « La méthanisation dans la problématique énergétique et environnementale ». In *La méthanisation*, by René Moletta, 2e édition [entièrement actualisée]. Paris: Éd. Tec & doc ;Lavoisier.
- Mosier, Nathan, Charles Wyman, Bruce Dale, Richard Elander, Y.Y. Lee, Mark Holtzapple, et Michael Ladisch. 2005. « Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass ». *Bioresource Technology* 96 (6): 673-686.
- Mshandete, A., L. Björnsson, A.K. Kivaisi, M.S.T. Rubindamayugi, et B. Mattiasson. 2006. « Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste ». *Renewable Energy* 31 (14): 2385-2392.

N

- Nakamura, Y., et G. Mtui. 2003. « Anaerobic fermentation of woody biomass treated by various methods ». *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8 (3): 179-182.
- Nimz, H.H., D. Robert, O. Faix, et M. Nemr. 1981. « Carbon-13 NMR Spectra of Lignins, 8. Structural Differences between Lignins of Hardwoods, Softwoods, Grasses and Compression Wood ». *Holzforschung* 35 (1): 16-26.

O

- Observ'ER (France). 2010. *État des énergies renouvelables en Europe*.
- . 2013. *État des énergies renouvelables en Europe*.
- OUYANG, Xiping, Zaixiong LIN, Yonghong DENG, Dongjie YANG, et Xueqing QIU. 2010. « Oxidative Degradation of Soda Lignin Assisted by Microwave Irradiation ». *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18 (4): 695-702.

P

- Palmqvist, E, H Grage, N Q Meinander, et B Hahn-Hägerdal. 1999. « Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and P-Hydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeasts ». *Biotechnology and Bioengineering* 63 (1): 46-55.
- Palmqvist, Eva, et Bärbel Hahn-Hägerdal. 2000. « Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition ». *Bioresource Technology* 74 (1): 25-33.
- Pavlostathis, Spyros G, et James M Gossett. 1985. « Alkaline Treatment of Wheat Straw for Increasing Anaerobic Biodegradability ». *Biotechnology and Bioengineering* 27 (3): 334-344.
- Peinemann, S., V. Müller, M. Blaut, et G. Gottschalk. 1988. « Bioenergetics of methanogenesis from acetate by *Methanosarcina barkeri*. » *Journal of Bacteriology* 170 (3): 1369-1372.
- Peng, Pai, Jing Bian, et Run-Cang Sun. 2010. « Chapter 3 - Extractives ». In *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, 49-72.
- Peng, Yunyun, et Shubin Wu. 2010. « The structural and thermal characteristics of wheat straw hemicellulose ». *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 88 (2): 134-139.

R

- Reece, Jane B, et Neil A Campbell. 2012. *Campbell biologie*. Paris: Pearson.
- Ren, Jun-Li, et Run-Cang Sun. 2010. « Chapter 4 - Hemicelluloses ». In *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, 73-130.
- Reynaud, C. 2013. « Amélioration des propriétés papetières par traitement enzymatique des fibres lignocellulosiques ».

RunCang Sun, Jeremy Tomkinson. 2003. « Characterization of hemicelluloses isolated with tetraacetylenediamine activated peroxide from ultrasound irradiated and alkali pre-treated wheat straw ». *European Polymer Journal* (4): 751-759.

S

Sambusiti, C., E. Ficara, F. Malpei, J. P. Steyer, et H. Carrère. 2013. « Benefit of sodium hydroxide pretreatment of ensiled sorghum forage on the anaerobic reactor stability and methane production ». *Bioresource Technology* 144: 149-155.

Sambusiti, C., F. Monlau, E. Ficara, H. Carrère, et F. Malpei. 2013. « A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates ». *Applied Energy* 104: 62-70.

Sarwar, M., M. Nisa, Z. Hassan, et M.A. Shahzad. 2006. « Influence of urea molasses treated wheat straw fermented with cattle manure on chemical composition and feeding value for growing buffalo calves ». *Livestock Science* 105 (1-3): 151-161.

Segal, L., J. J. Creely, A. E. Martin, et C. M. Conrad. 1959. « An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer ». *Textile Research Journal* 29 (10): 786-794.

Solagro méthanisation. 2011. « Biogaz - méthanisation: énergie utile - SOLAGRO, initiatives pour l'énergie, l'environnement, l'agriculture ». Consulté le novembre 14. <http://www.solagro.org/site/407.html>.

Sun, R., J.M. Lawther, et W.B. Banks. 1996. « Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses ». *Carbohydrate Polymers* 29 (4): 325-331.

Sun, Runcang, J. M. Lawther, et W. B. Banks. 1997. « A tentative chemical structure of wheat straw lignin ». *Industrial Crops and Products* 6 (1): 1-8.

Sun, Runcang, J. Mark Lawther, et W. B. Banks. 1998. « Isolation and characterization of hemicellulose B and cellulose from pressure refined wheat straw ». *Industrial Crops and Products* 7 (2-3): 121-128.

Sun, Ye, et Jiayang Cheng. 2002. « Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review ». *Bioresource Technology* 83 (1): 1-11.

Syrota, J. 2008. *Perspectives énergétiques de la France à l'horizon 2020-2050: Rapports des groupes de travail de la commission énergie*. Vol. 2. La Documentation Française.

T

Taherzadeh, Mohammad J., et Keikhosro Karimi. 2008. « Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review ». *International Journal of Molecular Sciences* 9 (9): 1621-1651.

Take, H., Y. Andou, Y. Nakamura, F. Kobayashi, Y. Kurimoto, et M. Kuwahara. 2006. « Production of methane gas from Japanese cedar chips pretreated by various delignification methods ». *Biochemical Engineering Journal* 28 (1): 30-35.

Talebniya, Farid, Dimitar Karakashev, et Irini Angelidaki. 2010. « Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation ». *Bioresource Technology* 101 (13): 4744-4753.

- Thiele, J.H., W.-M. Wu, M.K. Jain, et J.G. Zeikus. 1990. « Ecoengineering high rate anaerobic digestion systems: Analysis of improved syntrophic biomethanation catalysts ». *Biotechnology and Bioengineering* 35 (10): 990-999.
- Tholen, A., et A. Brune. 1999. « Localization and in situ activities of homoacetogenic bacteria in the highly compartmentalized hindgut of soil-feeding higher termites (*Cubitermes* spp.) ». *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10): 4497-4505.
- Tiehm, A., K. Nickel, M. Zellhorn, et U. Neis. 2001. « Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization ». *Water Research* 35 (8): 2003-2009.

W

- Wang, G., H.N. Gavala, I.V. Skiadas, et B.K. Ahring. 2009. « Wet explosion of wheat straw and codigestion with swine manure: Effect on the methane productivity ». *Waste Management* 29 (11): 2830-2835.
- Ward, A.J., P.J. Hobbs, P.J. Holliman, et D.L. Jones. 2008. « Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources ». *Bioresource Technology* 99 (17): 7928-7940.
- Wu, Jiangning, Farhad Ein-Mozaffari, et Simant Upreti. 2013. « Effect of ozone pretreatment on hydrogen production from barley straw ». *Bioresource Technology* 144: 344-349.
- Wu, S., et D.S. Argyropoulos. 2003. « An Improved Method for Isolating Lignin in High Yield and Purity ». *Journal of Pulp and Paper Science* 29 (7): 235-240.
- Wu, W. M, R. F. Hickey, et J. G. Zeikus. 1991. « Characterization of Metabolic Performance of Methanogenic Granules Treating Brewery Wastewater: Role of Sulfate-Reducing Bacteria ». *APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,

X

- Ximenes, Eduardo, Youngmi Kim, Nathan Mosier, Bruce Dien, et Michael Ladisch. 2010. « Inhibition of cellulases by phenols ». *Enzyme and Microbial Technology* 46 (3-4): 170-176.
- Xu, Feng. 2010. « Structure, Ultrastructure, and Chemical Composition ». In *Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, 9-47.
- Xue, Bai-Liang, Jia-Long Wen, Feng Xu, et Run-Cang Sun. 2012. « Structural Characterization of Hemicelluloses Fractionated by Graded Ethanol Precipitation from *Pinus Yunnanensis* ». *Carbohydrate Research* 352: 159-165.

Z

- Zaldivar, J, A Martinez, et L O Ingram. 1999. « Effect of Selected Aldehydes on the Growth and Fermentation of Ethanologenic *Escherichia Coli* ». *Biotechnology and Bioengineering* 65 (1): 24-33.
- Zeikus, J.G. 1982. « Microbial intermediary metabolism in anaerobic digestion. » *Anaerobic digestion 1981. Proc. symposium, Travemunde*: 23-35.

- Zhu, J.Y., et X.J. Pan. 2010. « Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation ». *Bioresource Technology* 101 (13): 4992-5002.
- zu-shan, Cai, et Laszlo Paszner. 1988. « Salt Catalyzed Wood Bonding with Hemicellulose ». *Holzforschung* 42 (1): 11-20.