

---

ACADEMIE DE MONTPELLIER



Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques

## THESE

Pour obtenir le grade de

**Docteur du Centre International d'Etudes  
Supérieures en Sciences Agronomiques**

Discipline : Sciences des procédés  
Ecole doctorale : Sciences des procédés – Sciences des Aliments

**Fractionnement par voie sèche de la biomasse ligno-cellulosique :  
Broyage poussé de la paille de blé et effets sur ses bioconversions**

Présentée et soutenue  
par

**Gabriela GHIZZI DAMASCENO DA SILVA**

le 8 décembre 2011

Jury :

Mme. Christine Francès	Directeur de Recherche, CNRS, LGC Toulouse	Rapporteur
M. Michael O'Donohue	Directeur de Recherche, INRA, LISBP Toulouse	Rapporteur
Mme. Marie-Françoise Devaux	Ingénieur de Recherche, INRA, BIA Nantes	Examineur
M. Bernard Cuq	Professeur, SupAgro, IATE Montpellier	Examineur
M. Stéphane Guilbert	Professeur, SupAgro, Agreenium Paris	Examineur
M. Xavier Rouau	Directeur de recherche, INRA, IATE Montpellier	Directeur de thèse



ACADEMIE DE MONTPELLIER



Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques

## THESE

Pour obtenir le grade de

**Docteur du Centre International d'Etudes  
Supérieures en Sciences Agronomiques**

Discipline : Sciences des procédés  
Ecole doctorale : Sciences des procédés – Sciences des Aliments

**Fractionnement par voie sèche de la biomasse ligno-  
cellulosique : Broyage poussé de la paille de blé et effets sur  
ses bioconversions**

Présentée et soutenue  
par

**Gabriela GHIZZI DAMASCENO DA SILVA**

le 8 décembre 2011

Jury :

Mme. Christine Francès	Directeur de Recherche, CNRS, LGC Toulouse	Rapporteur
M. Michael O'Donohue	Directeur de Recherche, INRA, LISBP Toulouse	Rapporteur
Mme. Marie-Françoise Devaux	Ingénieur de Recherche, INRA, BIA Nantes	Examineur
M. Bernard Cuq	Professeur, SupAgro, IATE Montpellier	Examineur
M. Stéphane Guilbert	Professeur, SupAgro, Agreenium Paris	Examineur
M. Xavier Rouau	Directeur de recherche, INRA, IATE Montpellier	Directeur de thèse





# REMERCIEMENTS



# REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements ...

...à Stéphane Guilbert, ancien directeur de l'UMR Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes (IATE), où ce travail a été conduit, et à Huug (Hugo) DeVries, directeur actuel, pour m'avoir accueillie pour le stage en 2006 et ensuite pour ce projet de thèse.

... à Xavier Rouau, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait l'honneur de me confier cette thèse, pour sa confiance, sa disponibilité et sa patience. De même, je remercie au co-encadrement initial fait par Stéphane Guilbert, directeur de l'Agreenium.

...aux organismes qui ont financé ce travail, la région Languedoc-Roussillon, le département CEPIA de l'INRA et l'UMR IATE.

...aux membres du jury, Christine Francès, Directeur de Recherche au CNRS de Toulouse et Michael O'Donohue, Directeur de Recherche à l'INRA de Toulouse, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse ; mais également Marie-Françoise Devaux, Ingénieur de Recherche à l'INRA de Nantes et Bernard Cuq, Professeur à SupAgro à Montpellier, pour avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

... aux chercheurs de l'IATE qui m'ont permis d'avancer dans mes recherches grâce à leurs précieux conseils et suivis : Cécile Barron, Bernard Cuq, Charles Ghommidh, Abdelkrim, Bruno Piriou, Agnès Duri, Marc Chaurand et Frédéric Mabile. De même, je remercie également les conseils et la participation du comité de pilotage de Catherine Lapierre (UMR 1318, Institut Jean-Pierre Bourgin à Grignon).

... aux chercheurs qui ont permis le déroulement des diverses expérimentations en dehors de l'IATE : Claire Dumas du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement à Narbonne, Jean-Guy Berrin de l'UMR Biotechnologie des Champignons Filamenteux à Marseille, Sylvie Recous de l'UMR Fractionnement des Agroressources et Environnement à Reims, Alain Buléon et Luc Saulnier de l'UR Biopolymères Interactions Assemblages à Nantes, pour leur encadrement et les partenariats établis.

... à Yannick Mellerin, Aurélie Putois, Georges Maraval, Marc Chaurand, Clémence Medina et Nicolas Beaubras de Montpellier, Marie Couturier et David Navarro de Marseille, Olivier Delfosse de Reims et Bruno Pontoire de Nantes, pour leur excellente assistance technique et pour m'avoir fait part de leur savoir faire. Je remercie également Thérèse-Marie Lasserre, Joëlle Bonicel et Marie-Françoise Samson qui ont permis le bon déroulement des manip, sans oublier Anne-Marie Delmont et Christophe Duprat, pour

leur aide dans les nombreuses démarches administratives toujours avec leur sourire et bonne humeur.

... à tous mes collègues de l'IATE, les chercheurs, techniciens, doctorants et stagiaires qui ont intégré avec moi ce trajet de 5 ans depuis mon stage et puis la thèse. Je garderai un très bon souvenir de cette période grâce à vous ! En particulier, je souhaite remercier mes amies qui sont devenues ma petite famille à Montpellier : Mariana Ferreira, Milena Martelli, Natalia Rosa et Maud Petitot pour leur compagnie, nos voyages, les fou-rires, les discussions à propos de nos travaux et principalement pour tout le support qu'elles m'ont donné. Notre amitié m'a été une base très importante. Merci aussi à Fred Baudouin, mon dernier compagnon de bureau pour sa compagnie et les nombreuses pauses café. Je pourrais encore faire une très grande liste de tous ceux qui sont passés par le labo, ou qui y sont encore, qui ont participé aux nombreux moments de décontractions comme Emna, Moustafa, Mathilde, Marine, Miguel, Sana, Claire, Guilherme, Giselle, Rafael, Jean-Marie, Nathalia L., Marie-Amélie... Je n'oublie pas notre petit groupe d'amis à Montpellier : Pedro Geraldo, Gisa et Fernando Fontainha, Alessandra Scroccaro et Antonio Padilha (entre autres). Merci pour ces moments merveilleux entre les cafés, les pauses sur la pelouse, les repas et nombreuses soirées !

... à Michel pour son support constant pendant toute cette phase très importante de ma vie. Je tiens à remercier sa famille (Annie, Paul, Cathy, Saïda et Claire) et également ses amis (Pierre, Laure, Jacques, Patricia, Patrice, Mél, Steph et Nico) qui sont devenus aussi la mienne et les miens. Merci d'avoir fait partie de ma vie !

...à mes nouveaux colocataires Valérie, Daniel, Manu, Jérôme et Delphine qui, juste à la toute dernière ligne droite, sont devenus des amis avec qui je pouvais sortir un peu de la thèse et rafraichir la tête. Vous m'avez énormément aidé.

... à ma famille : ma mère, mon père, mon frère qui ont toujours cru que j'étais capable et mon motivée pendant tous les moments difficiles ; en particulier ma mère qui m'a donné un support plus qu'important par nos nombreuses appels téléphoniques. Je remercie également à tous mes oncles et cousins, j'aimerais pouvoir en faire une liste mais la famille est très grande (heureusement). De même, je remercie à mes amis au Brésil qui, avec ma famille, m'ont aidé de loin en envoyant des pensées positives pour que la thèse se passe bien : Merci, ça a marché !!

Je dédie ce travail à mes grand-mères qui sont parties pendant la dernière année et à mes parents avec beaucoup d'amour.

# SOMMAIRES



# TABLE DE MATIERES

<b>I</b>	<b>Introduction générale .....</b>	<b>3</b>
<b>II</b>	<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>9</b>
<b>1</b>	<b>La paille de blé .....</b>	<b>9</b>
1.1	Les constituants pariétaux – niveau moléculaire .....	9
1.2	La paroi cellulaire – niveau ultrastructural .....	15
1.3	Les cellules et tissus – niveau microscopique .....	16
1.4	Anatomie –niveau macroscopique .....	18
1.5	Structure et propriétés mécaniques des végétaux.....	19
1.6	Barrières aux attaques enzymatiques.....	20
<b>2</b>	<b>Bioconversions enzymatiques.....</b>	<b>23</b>
2.1	Hydrolyse enzymatique.....	23
2.2	Dégradation anaérobie – fermentation éthanolique .....	27
2.3	Dégradation anaérobie (biogaz).....	28
2.4	Dégradation aérobie: décomposition dans le sol.....	30
<b>3</b>	<b>Bioraffinerie .....</b>	<b>32</b>
3.1	Prétraitements mécaniques : le broyage.....	37
3.2	Broyage comme un prétraitement végétal et aspects énergétiques .....	42
	<b>Conclusions du chapitre II.....</b>	<b>46</b>
<b>III</b>	<b>Characterisation of wheat straw.....</b>	<b>49</b>
<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>49</b>
2.1	Starting material .....	49
2.2	Composition of raw material .....	49
2.3	Microscopic observations .....	50
2.4	Grindability tests.....	50
<b>3</b>	<b>Results and discussion .....</b>	<b>50</b>
3.1	Composition of raw material .....	51
3.2	Composition of wheat anatomic parts –Macroscopic structure .....	52
3.3	Microscopic structure.....	54
3.4	Grindability of anatomic parts .....	56
	<b>Conclusions du chapitre III.....</b>	<b>57</b>
<b>IV</b>	<b>Size-reduction processes.....</b>	<b>61</b>
	<b>Grinding methods .....</b>	<b>61</b>
➤	Sieve-based grindings .....	63
➤	Ball milling.....	63
➤	Air-jet milling .....	64

<b>IV.1 Article 1: Morphological modulation of heterogeneous biomass powders by dry grinding</b> .....	<b>67</b>
<b>Keywords</b> .....	<b>67</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>67</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>67</b>
<b>2 Strategy</b> .....	<b>68</b>
<b>3 Materials and methods</b> .....	<b>69</b>
3.1 Raw material.....	69
3.2 Grinding methods .....	69
3.3 Particle size measurements by laser diffraction .....	70
3.4 Morphological analyses by image analysis of microscopic views.....	70
3.5 Multiblock statistical analysis - Multiple co-inertia analysis (MCoA) .....	74
<b>4 Results</b> .....	<b>75</b>
4.1 Qualitative analysis of particle morphologies .....	75
4.2 Size distribution data: Image analysis vs. Laser diffraction.....	79
4.3 Quantitative analysis of particle morphologies by MCoA .....	81
<b>5 Discussion – grinding mechanisms</b> .....	<b>86</b>
5.1 Successive centrifugal grinding .....	87
5.2 Ball milling processing .....	88
5.3 Jet milling processing .....	88
5.4 Particle size reduction .....	88
<b>Conclusions</b> .....	<b>89</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>90</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>90</b>
<b>Supplementary data</b> .....	<b>90</b>
<b>IV.2 Article 2. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw</b> .....	<b>95</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>95</b>
<b>Graphical abstract</b> .....	<b>95</b>
<b>Keywords</b> .....	<b>95</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>96</b>
<b>2 Experimental</b> .....	<b>97</b>
2.1 Sample preparations .....	97
2.2 Compositional analyses.....	98
2.3 Microscopic observations.....	99
<b>3 Results and Discussion</b> .....	<b>99</b>
3.1 Anatomic composition of wheat straw.....	99
3.2 Behaviour of the major straw components upon centrifugal grinding .....	100
3.3 Distribution of major components in fine straw powder .....	102
<b>Conclusions</b> .....	<b>103</b>
<b>Acknowledgements</b> .....	<b>104</b>
<b>IV.3 Note: Cryogenic grinding (intermediate steps)</b> .....	<b>105</b>
<b>1 Introduction</b> .....	<b>105</b>
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>105</b>



3	<b>Results and discussion</b> .....	105
4	<b>Conclusions</b> .....	108
	<b>Conclusions du chapitre IV</b> .....	110
<b>V</b>	<b>Biodégradations</b> .....	113
<b>V.1</b>	<b>Article 3. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw</b> .....	117
	<b>Abstract</b> .....	117
	<b>Highlights</b> .....	117
	<b>Keywords</b> .....	117
	<b>1 Introduction</b> .....	118
	<b>2 Materials and methods</b> .....	119
	2.1 Starting material .....	119
	2.2 Grinding methods - Particle size reduction .....	120
	2.3 Particle size measurements .....	120
	2.4 Relative crystallinity .....	120
	2.5 Enzymatic hydrolyses.....	121
	2.6 Statistical Analysis.....	122
	<b>3 Results</b> .....	122
	3.1 Composition of raw materials .....	122
	3.2 Particle size reduction .....	123
	3.3 Effects of particle size reduction on the kinetics of enzymatic degradability ..	126
	3.4 Enzymatic saccharification of ground wheat straw .....	127
	3.5 Cellulose structure .....	130
	<b>4 Discussion</b> .....	132
	4.1 Overall effect of grinding on enzymatic hydrolysis .....	132
	4.2 Main effect of rapid grindings: effect of particle size until a threshold of carbohydrate release .....	132
	4.3 Ball milling: further effect on structure .....	133
	4.4 Grinding vs. steam explosion: similar enzymatic carbohydrate solubilisation .	134
	<b>Conclusion</b> .....	134
	<b>Acknowledgements</b> .....	135
	<b>Appendix A. Supplementary methodology</b> .....	135
	<b>Supplementary Materials and Methods</b> .....	136
	Supplementary methodology 1. Compositional analyses .....	136
	Supplementary methodology 2. Grinding methods - Particle size reduction.....	136
<b>V.2</b>	<b>Article 4. Bioconversion of ultra-finely ground wheat straw: anaerobic degradation and decomposition in soil</b> .....	141
	<b>1 Introduction</b> .....	141
	<b>2 Materials and methods</b> .....	142
	2.1 Starting material .....	142
	2.2 Composition of raw material .....	142
	2.3 Grinding methods and particle size measurements .....	143
	2.4 Behaviour in water and water-extractable carbohydrates.....	144

2.5	Enzymatic hydrolyses.....	145
2.6	Bioconversions.....	146
2.7	Statistical Analyses.....	147
<b>3</b>	<b>Results.....</b>	<b>148</b>
3.1	Characteristics of ground wheat straw.....	148
3.2	Biomethane production.....	151
3.3	Decomposition in soil.....	155
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>157</b>
4.1	Main effect of particle size on both bioconversions: comparison between grinding intensities and processes.....	157
4.2	Comparison of anaerobic and aerobic degradations.....	159
	<b>Conclusions.....</b>	<b>161</b>
	<b>Acknowledgements.....</b>	<b>162</b>
	<b>Conclusions du chapitre V.....</b>	<b>162</b>
<b>VI</b>	<b>Discussion générale.....</b>	<b>165</b>
	Eléments de contexte et objectifs.....	165
	Démarche employée.....	165
	Caractéristiques de la paille de blé.....	166
	Synthèse des résultats et interaction des différents facteurs : propriétés des poudres vs. bioconversions.....	166
	Effet du broyage sur les caractéristiques morphologiques des particules.....	170
	Effet du broyage sur la distribution des composés ligno-cellulosiques.....	174
	Effet du broyage sur l'état des polymères et comportements des poudres en contact avec l'eau.....	175
	Effets du broyage sur les biodégradations.....	177
<b>VII</b>	<b>Conclusions et perspectives.....</b>	<b>185</b>
	Faisabilité Technique.....	185
	Hétérogénéité de la biomasse associée à la complexité des mécanismes de broyages.....	185
	Modes de broyage : rôle important sur les particules/poudres.....	185
	Conséquences sur les attaques enzymatiques.....	185
	Comportement de la biomasse lors des broyages.....	186
	Procédés - Broyages et autres traitements simultanés ou préliminaires.....	187
	Technique d'étude morphologique.....	188
	Bioconversions.....	188
	<b>References.....</b>	<b>191</b>
	<b>Annexe 1 L'analyse de co-inertie multiple - MCoA.....</b>	<b>207</b>
	<b>Communications issues de cette these.....</b>	<b>210</b>

# LISTE DE TABLEAUX

## Chapitre II. Synthèse bibliographique

Tab. 1 Procédés de prétraitements de la biomasse ligno-cellulosique (adapté de Taherzadeh & Karimi, 2008).....	36
Tab. 2 Résumé des études de broyage grossier de la biomasse ligno-cellulosique (tiré de Tabil et al., 2011).....	43

## Chapitre III. Characterisation of wheat straw

Tab. 3 Composition of wheat straw expressed as dry matters. ....	51
--	----

## Chapitre IV. Size-reduction processes

Tab. 4 Macroscopic shape descriptors as illustrated in Fig. 30.....	73
Tab. 5 Covariance analysis between image analysis and laser diffraction datasets and MCoA compromise on both first MCoA axes (CC1 and CC2). ....	79
Tab. 6 Similarities (RV coefficients) between the different datasets from morphological image analysis of ground-wheat straw samples as investigated by MCoA.....	82
Tab. 7 Covariance analysis between the different dataset from morphological image analysis of ground-wheat straw samples on MCoA components (CC1 to CC4). ....	84
Tab. 8 Median particle size ( $\mu\text{m}$ ) and span of size distribution of wheat straw by impact grinding.....	106
Tab. 9 Effect of cryogenic grinding CM2mm in a lab-scale ball mill (MM400, Retsch, GE).	107

## Chapitre V. Biodégradations

Tab. 10. Grinding conditions used for the preparation of wheat straw powders and their principles. ....	121
Tab. 11 Composition of wheat straw expressed as dry matters. ....	143
Tab. 12 Characteristics of ground wheat straw samples before degradation.....	150
Tab. 13. Carbohydrate composition of released liquid fraction after enzymatic hydrolysis by <i>T.reseei</i> secretome. ....	154

## **Chapitre VI. Discussion générale**

Tab. 14 Propriétés morphologiques des broyats de paille de blé. La morphologie est représentée par les valeurs médianes des distributions.....	172
Tab. 15 Propriétés des broyats de paille de blé sur l'état des polysaccharides et leur comportement en contact avec l'eau.....	175
Tab. 16 Résultats des biodégradations des broyats de paille de blé. ....	178

# LISTE DE FIGURES

## Chapitre I. Introduction générale

Fig. 1 Démarche générale des travaux .....	4
--	---

## Chapitre II. Synthèse bibliographique

Fig. 2 Molécule de cellulose.....	10
Fig. 3 Structure détaillée de la paroi cellulaire .....	10
Fig. 4 A) Les principaux sucres des parois cellulaires végétales .....	11
Fig. 5 Unités p-hydroxyphénylpropanes constitutives des lignines. ....	12
Fig. 6 Principales structures et liaisons inter-monomériques rencontrées dans les macromolécules de lignines .....	13
Fig. 7 Exemple de liaisons entre polymères pariétaux via les acides phénoliques .....	14
Fig. 8 Vue en perspective d'une paroi végétale montrant les différentes assises cellulaires .....	15
Fig. 9 Schémas des principaux tissus végétaux .....	17
Fig. 10 Schéma de la morphologie du blé.....	18
Fig. 11 Mécanisme de l'amorphogénèse/dépolymérisation par les cellulases .....	24
Fig. 12 Représentation schématique de l'amorphogénèse des fibres de celluloses.....	25
Fig. 13 Sites d'attaque par les enzymes xylanolytiques.....	26
Fig. 14 Diagramme des procédés pour la production de bioéthanol.....	27
Fig. 15 Etapes de la dégradation anaérobie en biogaz .....	29
Fig. 16 Représentation schématique des cycles couplés du carbone et de l'azote dans les sols agricoles (conditions aérobies). ....	31
Fig. 17 Bioraffineries : .....	32
Fig. 18 Facteurs qui affectent la réduction de la particule .....	38
Fig. 19 Déplacement de la courbe granulométrique .....	39
Fig. 20 Schémas d'équipements pour broyage :.....	40
Fig. 21 Types de mouvement à l'intérieur d'un broyeur à boulets: (a) en cascade, (b) en cataracte et (c) centrifuge (Bernotat & Schönert, 1988). ....	41
Fig. 22 Système de broyage à jet d'air (Hemery et al., 2007). ....	41

### Chapitre III. Characterisation of wheat straw

Fig. 23 Wheat straw as received.....	51
Fig. 24 Percent mass distributions of wheat plant parts (on top) and their biochemical compositions .....	53
Fig. 25 Number distributions of wheat internode diameter. ....	54
Fig. 26 Histology of wheat straw anatomic parts. ....	55
Fig. 27 Grindability of wheat-straw anatomic parts.....	56

### Chapitre IV. Size-reduction processes

Fig. 28 Grinding wheat straw: diagrams of sample production and sample names. ....	62
Fig. 29 Morphological modulation of wheat straw powders .....	70
Fig. 30 Shape descriptor definitions.....	73
Fig. 31 Main routine of image analysis and data processing developed on Labview plataform.....	74
Fig. 32 Examples of 4x4-assembled light micrographs of ground wheat-straw sample....	77
Fig. 33 Analysis of co-structure using MCoA of the equivalent diameter distributions ...	81
Fig. 34 Number-based distributions of circularity (on top) and convexity (at bottom) factors.....	83
Fig. 35 MCoA model: similarity map (compromises) of ground wheat-straw samples .....	85
Fig. 36 Cumulated area-based distribution of equivalent diameter.....	89
Supplementary fig. 1 Details of the image processing subroutine (VI) on Labview platform.....	91
Supplementary fig. 2 Schematic image processing steps .....	92
Fig. 37 Working steps to size reduction and fraction preparations of wheat straw. ....	97
Fig. 38 Mechanism of size reduction by cutting milling and centrifugal grinding.....	98
Fig. 39 a) Biochemical composition of wheat straw. b) Percent mass distributions of wheat plant parts and their c) biochemical compositions .....	100
Fig. 40 Median size (D50 value) of particle and dispersion index (DI).....	101
Fig. 41. a) Compositions of fine fractions (<50 $\mu\text{m}$ ) of wheat straw successively ground and b) component recoveries.....	101
Fig. 42 Scanning electron micrographs of 0.12mm-screen ground wheat straw. ....	102
Fig. 43 Size distribution by sieving intervals in mass percentage of 0.12 mm-screen ground wheat straw. ....	103
Fig. 44 Median particle size as a function of moisture content.....	108

## Chapitre V. Biodégradations

Fig. 45. Median particle sizes (A) and span of particle size distributions (B) as a function of operating conditions (when appropriate).....	124
Fig. 46. Improvements allowed by (finer-than-2 mm) grindings on time-dependent enzymatic hydrolysis.....	126
Fig. 47. Saccharification of wheat straw prepared by sieve-based grindings. ....	127
Fig. 48. Total releases and hydrolysis yields of reducing sugars (A) and glucose (B) after enzymatic hydrolysis carried out for 48h.....	129
Fig. 49. A) Crystallinity indexes of wheat straw samples. B) WAXS diffractograms .....	131
Fig. 50 Production of wheat straw powders: A) Processing diagram and samples names and B) breaking mechanisms of particles during these processes.....	144
Fig. 51 Biological methane potential of ground wheat straw.....	151
Fig. 52 Biological methane potential in solid-state anaerobic digestion of ground wheat straw.....	153
Fig. 53 Wheat straw degradation in soil: carbon mineralisation.....	156
Fig. 54 Results of fitting first kinetic equation as a function of median particle size .....	158
Fig. 55 Carbon mineralisation and methane production from wheat straw degradation	160

## Chapitre VI. Discussion générale

Fig. 56 Graphique de similarités issues de l'analyse en composantes principales .....	169
Fig. 57 Evolution morphologique lors des broyages de la particule « type ».....	173
Fig. 58 Corrélations entre les variables analysées .....	177
Fig. 59 Bioconversions en fonction de l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes .	180





# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



# I Introduction générale

La biomasse ligno-cellulosique (pailles céréalières, cultures dédiées : miscanthus, taillis à courte rotation, et les résidus de bois) est une ressource renouvelable alternative au pétrole ou au charbon pour la production de bioénergie, biomatériaux et biomolécules. La raffinerie du végétal, par analogie avec la raffinerie pétrolière, est un ensemble de technologies qui permet l'utilisation de la totalité de cette biomasse en différentes fractions pouvant être utilisées à destination d'une ou plusieurs de ces productions. La production d'énergie à partir de biomasse est possible par la combustion directe, par des procédés thermochimiques ou par des procédés biologiques tels que la fermentation éthanolique et les dégradations anaérobies produisant du biogaz ou du biohydrogène. Dans le contexte de la bioraffinerie végétale, notamment pour la production d'énergie, des prétraitements sont nécessaires pour augmenter la réactivité de la biomasse ligno-cellulosique vis-à-vis des procédés de conversion enzymatique/biologique. La fragmentation mécanique, en particulier par voie sèche, est une étape quasi-incontournable de cette raffinerie. Conventionnellement, la biomasse est grossièrement réduite (quelques mm) pour permettre sa manipulation et sa mise en œuvre, principalement pour augmenter son accessibilité aux enzymes. Plusieurs études ont montré que les bioconversions étaient directement affectées par le broyage. Cela est dû à l'augmentation de la surface spécifique (par la réduction de la taille des particules), par la dissociation des différents tissus et/ou des différentes couches de parois cellulaires et finalement par la déstructuration interne du réseau ligno-cellulosique (par ex. par la réduction de la cristallinité de la cellulose). Selon le mode de sollicitation mécanique et les conditions de broyage, la finesse finale ainsi que la structure interne des particules sont affectées différemment. Par conséquent, la réactivité de la biomasse végétale est potentiellement augmentée par les broyages fins et notamment dans le cas des ultrafins ( $< 20 \mu\text{m}$ ).

Cette thèse s'insère dans une thématique dont l'objectif général est d'établir les bases d'une raffinerie du végétal incluant notamment des procédés par voie sèche en amont des applications finales (bioénergies, biomatériaux ou biomolécules). Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux procédés de broyage qui sont, en général, les premières étapes du traitement ligno-cellulosique, et aux bioprocédés énergétiques. Les objectifs de cette de thèse ont été : i) développer un diagramme de fractionnement mécanique de la biomasse en utilisant différents procédés poussés de broyage (du grossier à l'ultrafin) et comprendre leur action ; et ii) par la suite, évaluer leur effet sur la réactivité vis-à-vis des procédés de bioconversions, incluant différents niveaux de complexité d'attaque

enzymatique et biologique (hydrolyse enzymatique en suspension liquide, digestion anaérobie en milieu liquide et solide, et décomposition aérobie dans le sol).

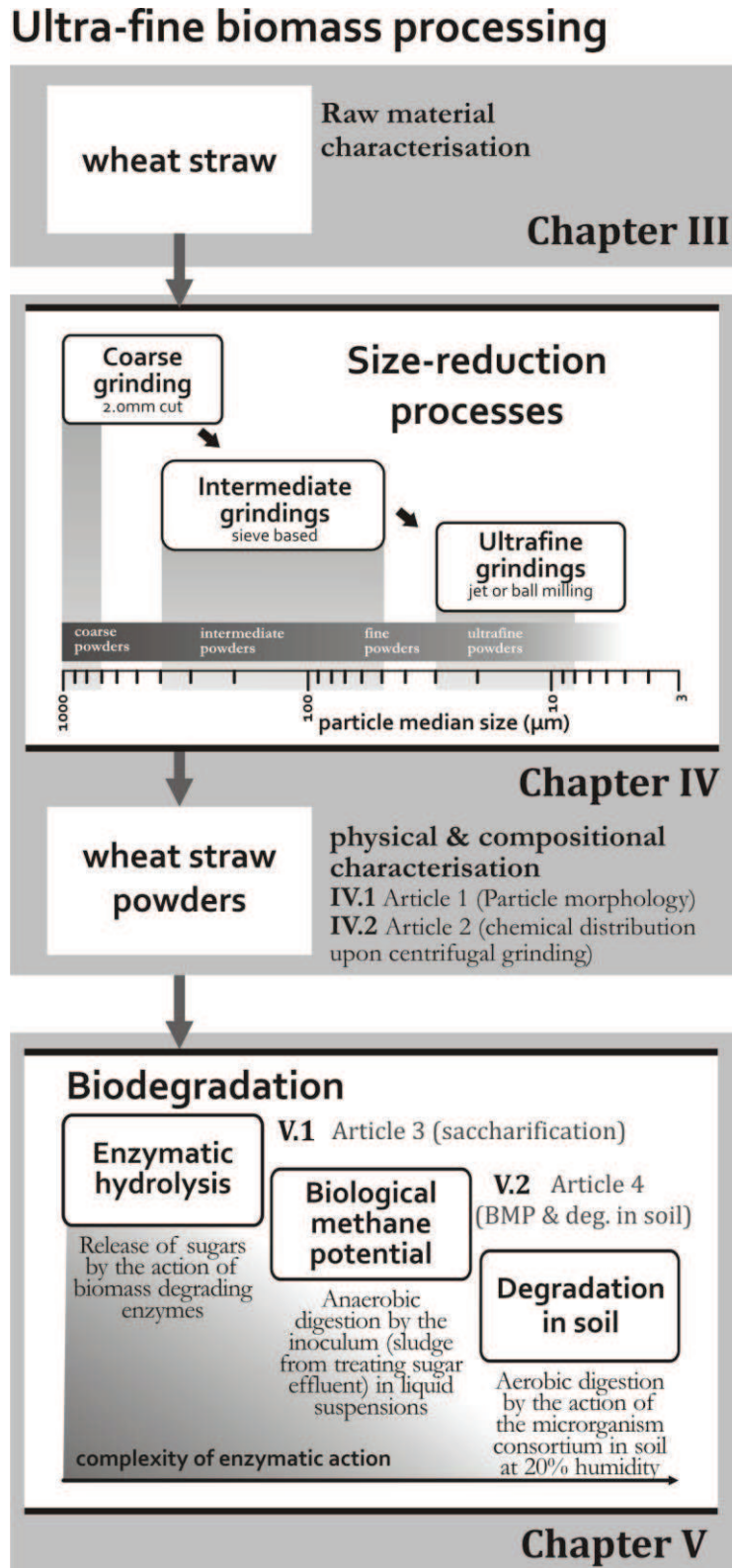


Fig. 1 Démarche générale des travaux : procédés d'obtention de poudres ultrafines et leur application à des procédés de biodégradation. L'organisation des chapitres des résultats ainsi que les publications scientifiques sont indiquées.

La suite de ce manuscrit s'organise en six parties :

**II. Une SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE** décrit le contexte scientifique de cette étude. Elle présente dans un premier temps une description détaillée de la structure et des composés constitutifs de la biomasse ligno-cellulosique avec un focus particulier sur les Graminées dont le blé. Dans un second temps, une description des procédés de bioconversion est présentée. Une troisième partie aborde les procédés mécaniques comme le prétraitement de la biomasse, ainsi que les principes des procédés notamment de ceux utilisés dans cette étude.

Les **RESULTATS** obtenus sont présentés en trois chapitres construits à partir des publications scientifiques et des études complémentaires à ces articles (Fig. 1) :

**III. CARACTÉRISATION DE LA MATIÈRE PREMIÈRE** Dans ce chapitre nous présentons les caractéristiques de la paille de blé utilisée dans ce travail, en termes de composition biochimique, distribution et composition des différents organes de la plante, leur structure histologique et enfin leur broyabilité.

**IV. PROCÉDES DE RÉDUCTION DE TAILLE** Ce chapitre concerne les procédés de broyage utilisés. Après une description des méthodes, les résultats de ce chapitre sont présentés en trois temps : tout d'abord la caractérisation morphologique des particules est présentée sous forme de l'article 1. Le deuxième article présente une étude de la distribution des composés biochimiques au sein d'un groupe de produits de broyage de façon à comprendre comment le broyage dissocie ces composés. La troisième partie est une note qui concerne l'étude de la cryogénie appliquée à un broyage utilisant une grille de sélection.

**V. PROCÉDES DE BIODEGRADATION** Trois modes d'attaque enzymatique des poudres modifiées par le broyage sont abordés dans ce chapitre. L'ordre de leur présentation suit la complexité de mode d'action (enzyme, pool microbien, mobilité, présence ou absence d'oxygène). Dans l'article 3, la dégradation enzymatique en utilisant un cocktail cellulolytique est présentée. Dans l'article 4, les bioconversions des poudres en méthane (anaérobie, méthanisation) et en CO<sub>2</sub> (aérobie, minéralisation dans le sol) sont décrits.

**VI. DISCUSSION GÉNÉRALE** Les principaux résultats obtenus sont synthétisés et l'interaction entre les résultats du chapitre IV et V est évaluée sous forme d'une analyse en composantes principales. Cette partie a pour objectif de nourrir une discussion transversale entre les chapitres de résultats : quels sont les effets du broyage sur les particules et leur structure ? Comment ces effets impactent les propriétés de l'ensemble des particules, la poudre ? Enfin, comment cet ensemble affecte les différents types de biodégradation ?

**VII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES** Le manuscrit se termine par une conclusion sur les résultats obtenus et les perspectives ouvertes par ce travail.



# CHAPITRE II

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1</b>	<b>La paille de blé .....</b>	<b>9</b>
1.1	Les constituants pariétaux – niveau moléculaire .....	9
1.1.1	La cellulose .....	9
1.1.2	Les hémicelluloses .....	11
1.1.3	Les lignines .....	12
1.1.4	Le réseau ligno-cellulosique .....	13
1.1.5	Autres composés pariétaux .....	14
1.2	La paroi cellulaire – niveau ultrastructural .....	15
1.3	Les cellules et tissus – niveau microscopique .....	16
1.4	Anatomie –niveau macroscopique .....	18
1.5	Structure et propriétés mécaniques des végétaux .....	19
1.6	Barrières aux attaques enzymatiques .....	20
<b>2</b>	<b>Bioconversions enzymatiques .....</b>	<b>23</b>
2.1	Hydrolyse enzymatique .....	23
2.2	Dégradation anaérobie – fermentation éthanolique.....	27
2.3	Dégradation anaérobie (biogaz) .....	28
2.4	Dégradation aérobie: décomposition dans le sol .....	30
<b>3</b>	<b>Bioraffinerie.....</b>	<b>32</b>
3.1	Prétraitements mécaniques : le broyage .....	37
3.1.1	Généralités à propos du broyage.....	37
3.1.2	Différents modes de broyage.....	39
3.1.3	Broyeurs à corps broyants guidés - à percussion utilisant une grille de sélection 40	
3.1.4	Broyage à corps broyants libres.....	40
3.1.5	Broyage à jet d'air .....	41
3.2	Broyage comme un prétraitement végétal et aspects énergétiques .....	42
	<b>Conclusions du chapitre II.....</b>	<b>46</b>





## II Synthèse bibliographique

### 1 La paille de blé

Le blé (*Triticum aestivum* L.) est une monocotylédone de la famille des Graminées (Poacées). La structure de la plante présente quatre niveaux d'organisation: macroscopique (parties anatomiques), microscopique (tissus et cellules), ultrastructural (paroi cellulaire), moléculaire (polymères et molécules). La paille de blé est le sous-produit de la récolte du grain de blé. Elle est donc composée des parties restantes de la plante. Ces parties sont majoritairement composées de parois cellulaires secondaires qui, à leur tour, sont composées d'un réseau ligno-cellulosique.

La paroi cellulaire est l'enveloppe de la cellule végétale. Elle est constituée principalement de polysaccharides (cellulose et hémicelluloses) et de composés de nature phénolique (lignines ...)(Breet & Waldron, 1996). Dans de faibles et variables proportions, elle est aussi composée d'eau, de constituants extractibles, de protéines et de composés inorganiques (minéraux). Cette structure sera présentée en ordre croissant d'échelle d'organisation: des composés ligno-cellulosiques jusqu'à la structure macroscopique de la paille. Ensuite quelques informations concernant les barrières à la dégradation enzymatique de chaque niveau de structure ainsi que leurs propriétés mécaniques seront abordées.

#### 1.1 Les constituants pariétaux – niveau moléculaire

##### 1.1.1 La cellulose

La **cellulose** est le composé le plus abondant des parois cellulaires secondaires. C'est un homopolymère non ramifié constitué de longues chaînes linéaires d'unités de D-glucose liées entre elles par une liaison glycosidique  $\beta$ -1,4 (Fig. 2). Son degré de polymérisation peut monter jusqu'à 15000 molécules de glucose (Breet & Waldron, 1996). Structuralement, l'unité élémentaire qui se répète dans la cellulose est le cellobiose (dimère de glucose), l'unité cellobiose mesurant 1.03 nm (Fig. 2) (Fengel & Wegener, 1984). Tous les groupements hydroxyle libres sont susceptibles d'être impliqués dans des liaisons hydrogène intra et intermoléculaires qui créent des édifices très ordonnés. Ainsi, les chaînes de cellulose sont organisées parallèlement sous forme de microfibrilles dont certaines zones sont cristallines et qui présentent aussi une forte rigidité (Fig. 3E). Entre 30 et 100 chaînes de glucose peuvent être présentes dans une microfibrille (Fig. 3D) (Breet & Waldron, 1996). D'après Evert (2006) le diamètre des microfibrilles trouvé dans

la littérature est très variable: la majorité des valeurs varient entre 4 et 10 nm, cependant des petites valeurs entre 1 et 2 nm et des plus extrêmes comme 25 nm sont aussi rapportées (Evert, 2006). Des microfibrilles sont aussi regroupées comme dans un câble qui est la macrofibrille. Ses dimensions sont autour de 0.5  $\mu\text{m}$  de diamètre, pouvant atteindre de 4 à 7  $\mu\text{m}$  de longueur (Fig. 3C). Ces macrofibrilles ont une résistance à la traction proche de l'acier (50–160  $\text{kg}/\text{mm}^2$ ) (Evert, 2006).

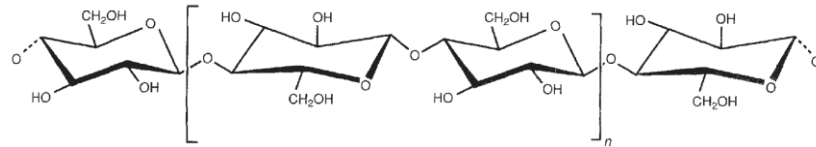


Fig. 2 Molécule de cellulose : glucane lié en  $\beta$ -1,4. L'unité qui se répète est le cellobiose, indiqué entre crochets (Malcolm Brown Jr et al., 1996).

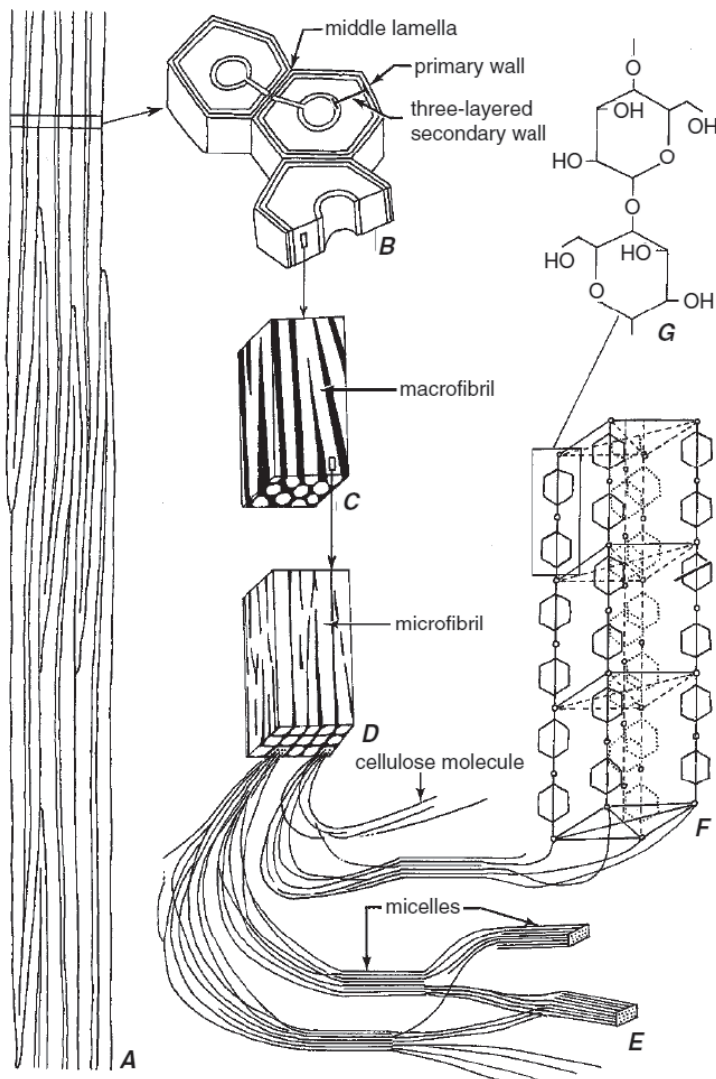


Fig. 3 Structure détaillée de la paroi cellulaire. A) brin des fibres ; B) section transversale de la fibre, paroi cellulaire épaisse : une paroi primaire et trois assises de la paroi secondaire (S1, S2 et S3) ; C) fragment de l'assise médiane de paroi secondaire (S2) : les macrofibrilles de cellulose (blanc) et les espaces interfibrillaires (noir) qui sont remplis de matériel non-cellulosique ; D) fragment d'une macrofibrille, plusieurs microfibrilles (en noir) ; E) structure des microfibrilles : polymères de cellulose (chaîne) où certaines parties sont très ordonnées (zones cristallines, micelles ; F) fragment de la zone cristalline des microfibrilles de cellulose: molécules de glucose arrangées dans l'espace dans un réseau ordonné ; G) cellobiose : unité élémentaire du polymère où deux glucoses sont liés par des liaisons glycosidiques en  $\beta$ -1,4 (Esau, 1977; Evert, 2006).

## 1.1.2 Les hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent une matrice autour des micro et microfibrilles de cellulose (Fig. 3C et D). Les hémicelluloses sont des polysaccharides formés par l'enchaînement d'oses monomères de types variés reliés par des liaisons glycosidiques et en général sont ramifiées. Les hémicelluloses diffèrent beaucoup selon les types de cellules et les groupes de plantes. Les principaux sucres constituant les hémicelluloses sont des hexoses (glucose, mannose, galactose), des pentoses (arabinose, xylose), des dérivés méthyles (rhamnose, fucose) et des acides uroniques (acide glucuronique) (Fig. 4). Les hémicelluloses sont des polysaccharides amorphes solubles en milieux acides dilués et alcalins (Joseleau, 1980). Chez les Graminées et en particulier chez le blé, les hémicelluloses sont majoritairement des xylanes liés en  $\beta$ -1,4 et substitués par des arabinoses en C2 ou C3 (arabinoxylanes). Au sein de la plante, les degrés de substitution des arabinoxylanes varient selon l'organe : le ratio arabinose:xylose est autour de 0.15 pour les tiges de blé, pour les enveloppes du grain de blé cela varie entre 0.5 et 1.0.

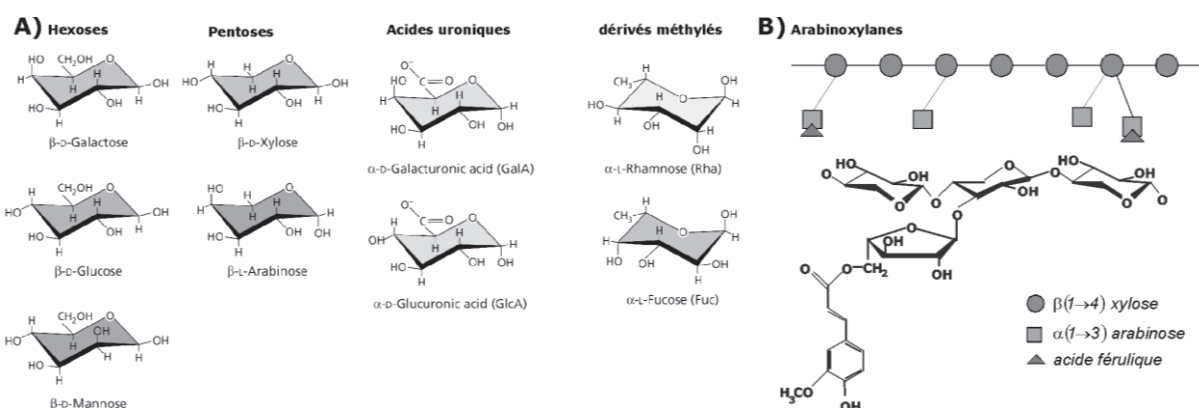


Fig. 4 A) Les principaux sucres des parois cellulaires végétales (Taiz & Zeiger, 2002). B) Arabinoxylanes (Rouau, 1996).

Les hémicelluloses diffèrent de la cellulose par trois aspects importants. Premièrement, elles contiennent différentes unités de sucres, deuxièmement elles présentent un degré considérable de branchement des chaînes, tandis que la cellulose est un polymère strictement linéaire. Troisièmement, le degré de polymérisation de la cellulose est dix à cent fois plus élevé que celui des hémicelluloses (Bledzki & Gassan, 1999). Les hémicelluloses sont globalement le constituant pariétal le moins résistant : ces polymères se biodégradent rapidement, présentent un taux d'absorption d'humidité élevé, et se dégradent chimiquement à des températures relativement basses.

### 1.1.3 Les lignines

La présence de lignine est une caractéristique rencontrée chez la plupart des végétaux (fougères, gymnospermes et angiospermes). Ce polymère représente 15 à 36% de la masse sèche des angiospermes (Baucher et al., 1998). Les lignines sont des polymères phénoliques tridimensionnels amorphes résultant de la copolymérisation radicalaire de trois différentes unités phénylpropénoïdes : les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique. Ces précurseurs sont respectivement à l'origine des sous-unités p-hydroxyphényle (H), guaiacyle (G) et syringyle (S) (Fig. 5) distinctes par leur degré de méthylation du noyau aromatique (Lapierre, 1993). Cette définition peut apparaître restrictive puisqu'elle ne prend pas en compte la copolymérisation des unités constitutives des lignines avec les polysaccharides ou leur association avec les acides phénoliques hydroxycinnamiques notamment dans le cas des lignines de pailles de Graminées (Boerjan et al., 2003; Grabber, 2005).

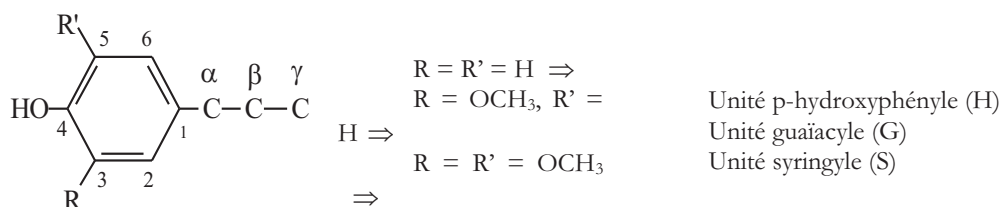


Fig. 5 Unités p-hydroxyphénylpropanes constitutives des lignines.

Les unités phénylpropane sont connectées entre elles par diverses liaisons carbone-carbone et/ou éther dont les plus fréquentes sont essentiellement arylglycérol- $\beta$ -éther ( $\beta$ -O-4, labile) (50%), et les condensées : phénylcoumarane ( $\beta$ -5), diarylpropane ( $\beta$ -1), pinorésinol ( $\beta$ - $\beta$ ), biphényle (5-5) et diphényléther (4-O-5) (Fig. 6) (Lapierre, 1993).

Les facteurs influant sur la croissance, tels que les origines biologiques, cytologiques, écologiques et bioclimatiques sont, comme dans le cas des hémicelluloses, à l'origine des variations de proportions relatives des différents unités ainsi que des types de liaisons constituant le polymère. La nature des unités constitutives et leurs proportions relatives varient donc selon le type de végétal. Dans le cas des bois de résineux (gymnospermes), les lignines ne comportent pratiquement que des unités G. Les lignines de bois feuillus (angiospermes dicotylédones) sont constituées de G et S. Les lignines de plantes angiospermes monocotylédones (cas des pailles de céréales) contiennent les unités G et S à des niveaux comparables et en plus, des unités H de sorte qu'elles sont composées d'unités G, S et H (Baucher et al., 1998). Les proportions relatives des unités S augmentent par rapport à G et H pendant la maturation chez certaines Graminées (Carpita, 1996).

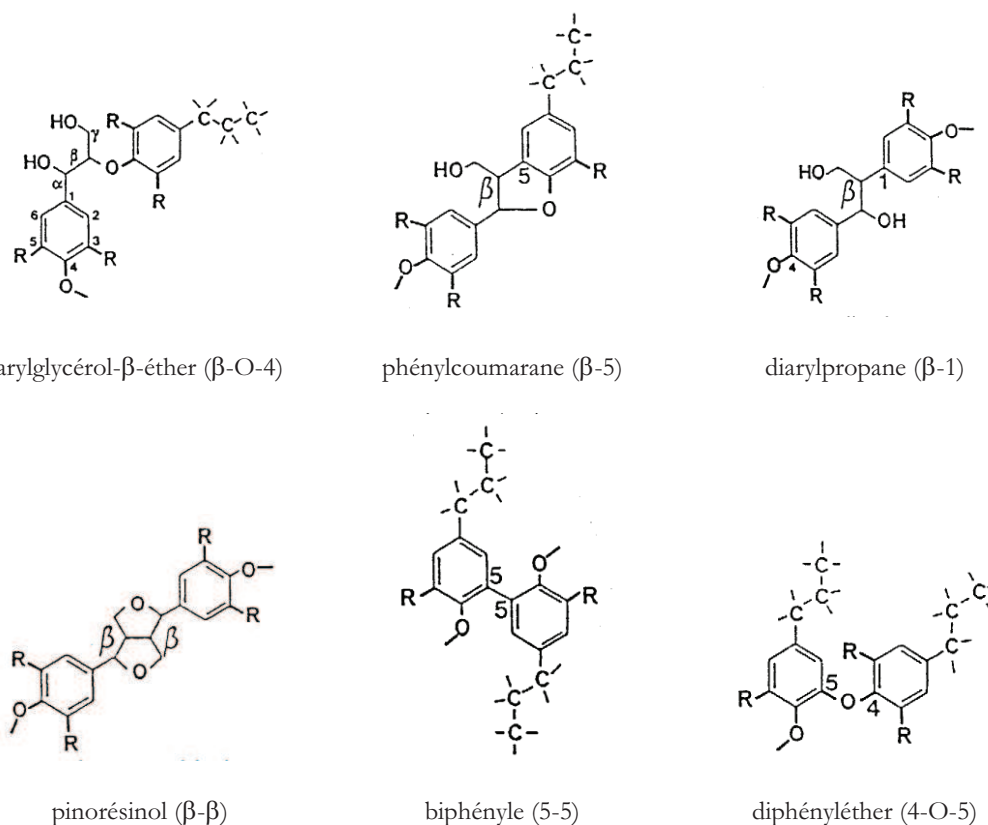


Fig. 6 Principales structures et liaisons inter-monomériques rencontrées dans les macromolécules de lignines (Lapierre, 1993).

### 1.1.4 Le réseau ligno-cellulosique

Les microfibrilles de cellulose sont enrobées dans une matrice non-cellulosique. Selon le tissu/paroi cellulaire, cette matrice est composée par les hémicelluloses ou en plus par les lignines. Les polymères constitutifs des parois cellulaires s'organisent en un réseau tridimensionnel (Fig. 3). La cohésion de cette structure est assurée par des liaisons de nature diverse (covalentes, non covalentes, ioniques). En particulier, les Graminées renferment des acides phénoliques qui malgré leur faible proportion (moins de 2% de la masse sèche de paroi) ont un rôle important dans l'établissement de liaisons covalentes au sein des parois. L'acide férulique et l'acide *p*-coumarique, sont estérifiés aux arabinoxylanes et participent à l'organisation des parois cellulaires (Carpita, 1996; Harris & Trethewey, 2010).

Des travaux ont montré que l'acide férulique joue un rôle essentiel non seulement dans la liaison entre les chaînes d'arabinoxylanes mais aussi dans les interactions covalentes avec les lignines contribuant fortement à l'organisation des parois cellulaires (Fig. 7) (Harris & Trethewey, 2010; Jung et al., 1993). De nombreux travaux ont permis de révéler la complexité et la grande diversité des interactions impliquant les acides

phénoliques (Buranov & Mazza, 2008; Scalbert et al., 1985). Par exemple, l'acide férulique peut être estérifié sur la position O-5 des unités d'arabinose des chaînes d'arabinoxylanes et étherifiés aux lignines. Cet acide phénolique augmente la réticulation des polymères pariétaux en permettant la formation de ponts entre les polysaccharides pariétaux et/ou entre la lignine et les polysaccharides pariétaux (Grabber et al., 2004). L'acide *p*-coumarique est associé aux polymères pariétaux par des liaisons de type ester. Il se fixe essentiellement sur les lignines (Boerjan et al., 2003; Buranov & Mazza, 2008; Iiyama et al., 1994; Sun et al., 1997). De plus, des liaisons covalentes entre les lignines et les hétéroxylyanes ont été aussi mises en évidence (Lapierre et al., 2001).

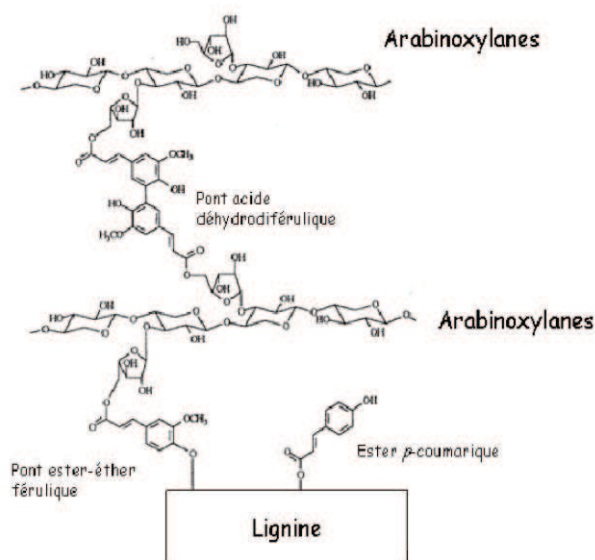


Fig. 7 Exemple de liaisons entre polymères pariétaux via les acides phénoliques (Jung et al., 1993).

Au-delà des multiples liaisons covalentes au sein de la matrice amorphe des parois cellulaires, des interactions non covalentes assurent la cohésion entre cette matrice et l'armature cellulosique. Par exemple, les régions non substituées des arabinoxylanes sont susceptibles de s'associer avec la cellulose par liaisons hydrogènes (Carpita & Gibeaut, 1993). Ces nombreuses liaisons renforcent la cohésion pariétale et rendent les parois cellulaires plus difficilement biodégradables (Hatfield et al., 1999).

### 1.1.5 Autres composés pariétaux

La silice est particulièrement abondante dans les parois des Graminées par leur inclusion dans certaines cellules de l'épiderme, périoderme et d'autres cellules spécialisées de la racine. (Carpita, 1996; Currie & Perry, 2007). Les subérines, cutines et des cires, à caractère hydrophobe (acides gras et phénols) sont caractéristiques aussi de certaines cellules spécialisées de l'épiderme qui rendent ces tissus plus imperméables (Carpita, 1996).



## 1.2 La paroi cellulaire – niveau ultrastructural

La formation de la paroi cellulaire est un processus dynamique qui se fait progressivement sous le contrôle de la cellule végétale par le dépôt de couches successives à partir de la membrane plasmique (Breet & Waldron, 1996) : la lamelle moyenne, commune à deux cellules végétales adjacentes, puis la paroi primaire (Fig. 8 et Fig. 3B). Ce type de paroi est rencontré dans les tissus participant aux fonctions d'assimilation. La paroi secondaire est déposée notamment dans les cellules spécialisées dans le soutien ou la conduction (fibres et vaisseaux), à l'arrêt de leur croissance. Ce sont les parois secondaires qui constituent quantitativement la fraction majeure de la biomasse ligno-cellulosique (Evert, 2006).

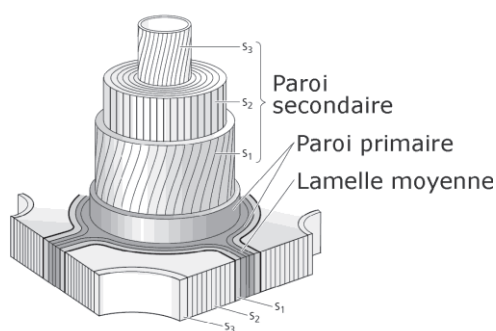


Fig. 8 Vue en perspective d'une paroi végétale montrant les différentes assises cellulaires (Evert, 2006).

La lamelle moyenne est la formation la plus périphérique. Elle est commune aux cellules contiguës et forme un ciment constitué de pectines et hémicelluloses. La paroi primaire de 1 à 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur se dépose pendant la croissance de la cellule. C'est la première paroi formée et la seule pour les cellules indifférenciées (méristèmes) (Evert, 2006; Fengel & Wegener, 1984).

La paroi secondaire est rigide et inextensible surtout grâce à une charpente fibrillaire très compacte due à une cellulose hautement cristalline. Elle est enrichie en lignines qui renforcent sa rigidité, cutine et subérine qui l'imperméabilisent. La paroi secondaire peut atteindre une épaisseur considérable dans certains tissus de soutien. Souvent, elle se compose de trois assises cellulaires distinctes : S1 (assise fine et externe), S2 (assise médiane) et S3 (assise interne). Ces assises diffèrent les unes des autres par l'orientation de leurs microfibrilles de cellulose (Fig. 8)(Evert, 2006; Fengel & Wegener, 1984).

La lignification est une étape tardive de la différenciation des cellules notamment des xylèmes. Elle commence dans les coins des cellules entre la lamelle moyenne et la paroi primaire quand la formation de S1 est déjà démarrée. Quand la formation du réseau de polysaccharides (microfibrilles de cellulose + matrice hémicellulosique) en S2 est complète, la lignification avance vers la paroi secondaire. La majorité de la lignine est déposée après la structuration de S3. Généralement, la concentration de lignine dans la lamelle moyenne et les coins des cellules est supérieure à celle de la paroi secondaire.

Néanmoins, comme cette dernière occupe une grande portion de la paroi cellulaire, elle constitue la majorité de la teneur en lignine (Boerjan et al., 2003; Donaldson, 2001).

### 1.3 Les cellules et tissus – niveau microscopique

La structure des tissus végétaux est alvéolaire. Les alvéoles sont constituées par les cellules délimitées par leurs parois. La taille et l'épaisseur des parois varient en fonction du tissu constitutif de la partie anatomique auquel elles appartiennent. Les principaux groupes de tissus des organes végétales sont classés selon leur fonction (Evert, 2006; Taiz & Zeiger, 2002) :

- Tissus superficiels de protection : l'épiderme, d'épaisseur variable, est une assise continue de cellules qui recouvre les organes aériens et les protège contre la dessiccation et les agressions extérieures tout en permettant de réguler les échanges gazeux avec l'atmosphère. La cutine, substance lipidique, imprègne les parois et forme une couche séparée (cuticule) à la surface externe des cellules. Elle rend l'épiderme imperméable et permet à la plante de conserver son eau.
- Tissus assimilateurs et de réserve : les parenchymes sont des tissus peu différenciés qui sont le siège des fonctions élaboratrices de la plante (photosynthèse et stockage des réserves). Ces réserves peuvent être des lipides, protéines, polysaccharides (amidon).
- Tissus sécréteurs : certaines cellules élaborent en grande quantité des produits qui peuvent être excrétés (nectar, résine) ou bien stockés à l'intérieur (tannins, latex).
- Tissus conducteurs : chez les Angiospermes (plantes supérieures), la circulation des sèves est assurée par un appareil conducteur composé de deux types de tissus : le xylème et le phloème (Fig. 9D). Le xylème conduit la sève brute, liquide contenant l'eau et les sels minéraux puisés dans le sol par les racines, vers les feuilles où s'effectue la photosynthèse. Il est constitué d'éléments lignifiés qu'on distingue en deux groupes : les trachéides et les éléments de vaisseaux qui, à leur tour, sont différenciés selon leur lignification (on distingue des vaisseaux : annelés, spiralés, rayés, réticulés ou ponctués). Le phloème conduit la sève élaborée, solution de substances organiques riches en glucides, des feuilles vers les autres organes. Les parois de ses cellules sont non lignifiées.
- Tissus de soutien : ils sont caractérisés par des parois épaisses et résistantes, lignifiées ou non. Le collenchyme (Fig. 9B) se forme dans les organes jeunes en croissance, aériens essentiellement. C'est un tissu vivant dont les parois primaires non lignifiées sont épaissies par un dépôt de cellulose, ce qui confère à la plante une grande résistance à la flexion et à la traction, une élasticité et une certaine souplesse. Le sclérenchyme (Fig. 9C) est le tissu de soutien des organes dont l'allongement est achevé. C'est un tissu constitué de cellules mortes dont les parois sont épaissies par un dépôt de lignines qui confère dureté et rigidité à la plante. Les cellules de soutien peuvent être plus ou moins allongées dans le sens de l'axe de l'organe. Lorsqu'elles sont très longues par rapport à leur diamètre, c'est à dire pour un facteur de forme (rapport entre la longueur et le diamètre) élevé, elles sont appelées fibres. La paroi secondaire des éléments de vaisseaux sont généralement plus concentrés en lignines que les fibres (Boerjan et al., 2003).



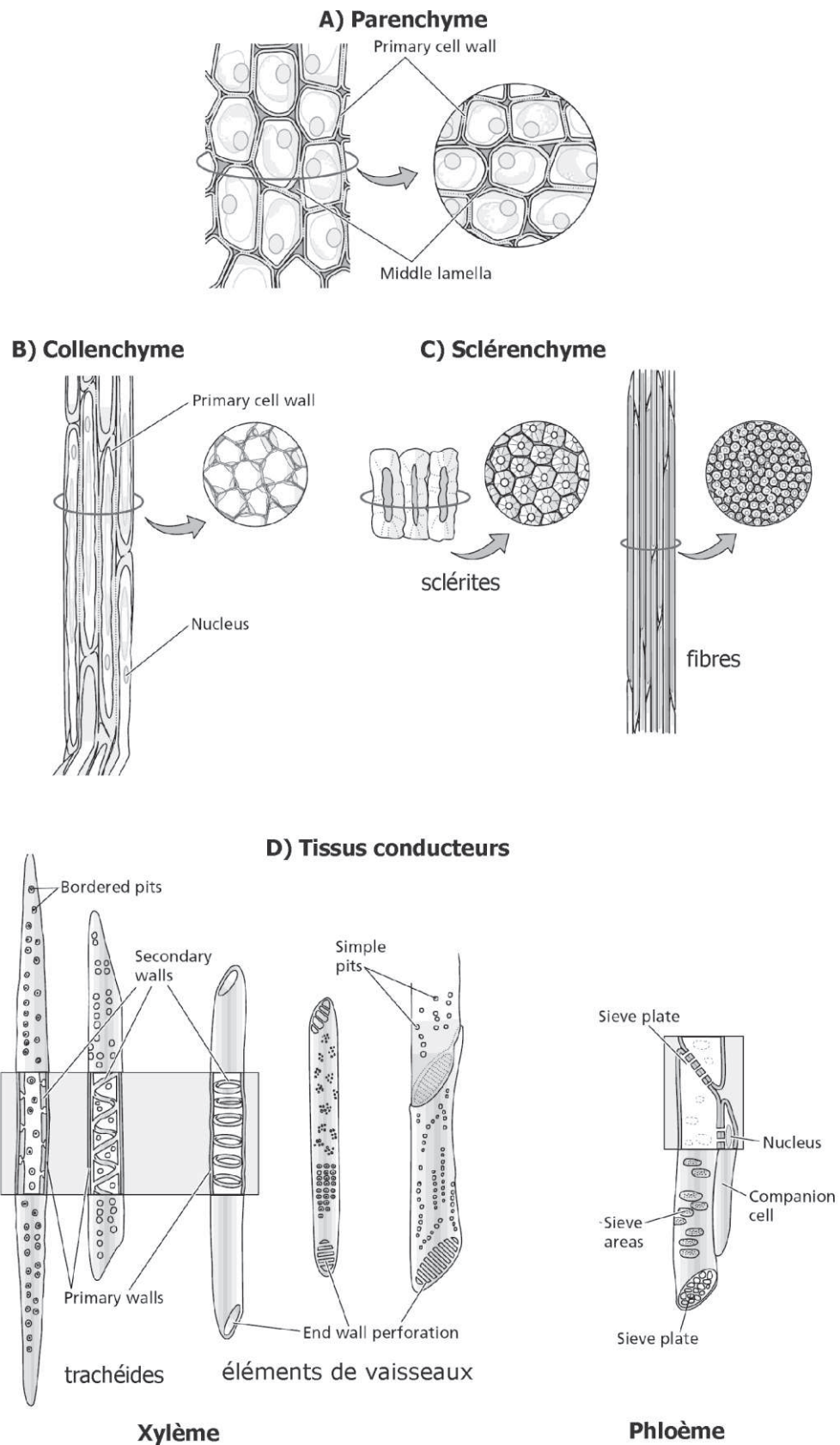


Fig. 9 Schémas des principaux tissus végétaux (Taiz & Zeiger, 2002).

## 1.4 Anatomie –niveau macroscopique

Les Angiospermes sont composées de trois organes majeurs : les feuilles, la tige et les racines. La fonction principale de la feuille est la photosynthèse, la tige est le support physique et fait le transport entre les feuilles et les racines, et les racines sont responsables de l'ancrage de la plante et de l'absorption de l'eau et des minéraux. La tige des Graminées est composée d'une succession de nœuds (Fig. 10A). La croissance des tiges se fait par le méristème apical (bourgeon terminal) mais aussi par une série de méristèmes intercalaires au niveau des nœuds. Les feuilles sont attachées à la tige au niveau des nœuds (Fig. 10B). La zone entre deux nœuds est appelée entre-nœuds (Taiz & Zeiger, 2002). Le milieu de l'entre-nœud de blé est vide. La Fig. 10 (C et D) présente aussi les distributions des faisceaux conducteurs et de sclérenchyme au sein d'un entre-nœud et d'une feuille. L'espace entre ces deux tissus est occupé majoritairement par les cellules de parenchyme. Sur la face extérieure, on observe l'épiderme.

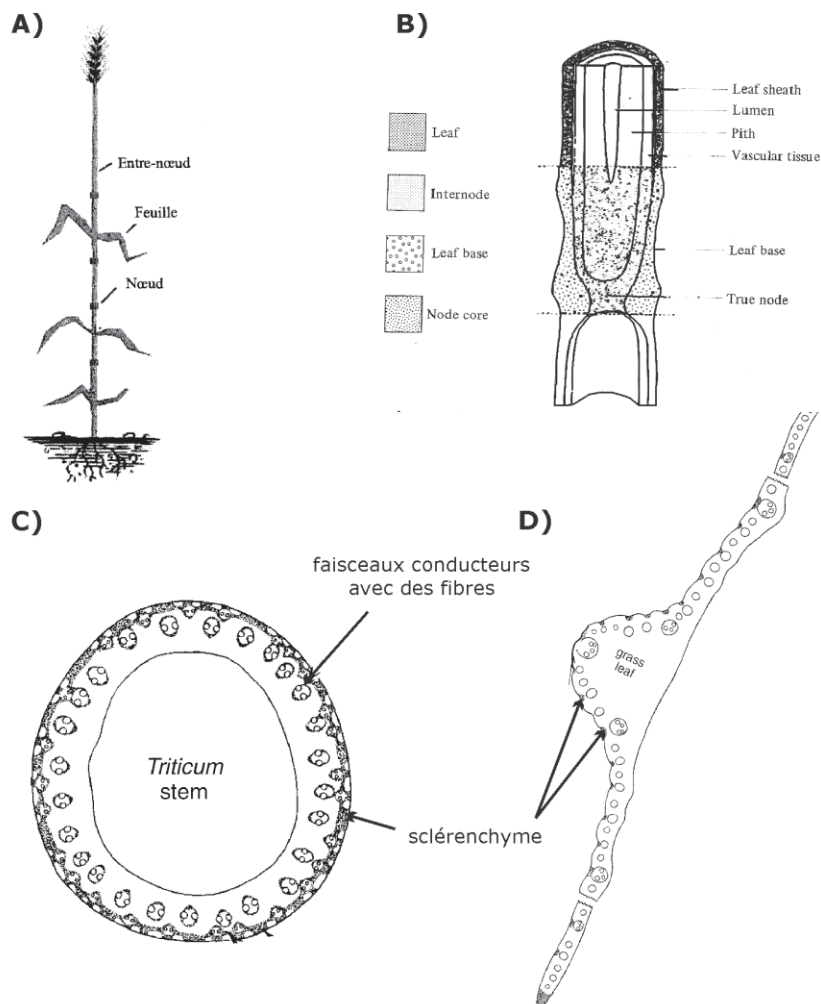


Fig. 10 Schéma de la morphologie du blé. A) la plante entière, B) structure d'un entre-nœud (Harper & Lynch, 1981) et C) la structure des coupes transversales d'un entre-nœud (l'intérieur de l'entre-nœud est vide) et D) d'une feuille (Evert, 2006).

## 1.5 Structure et propriétés mécaniques des végétaux

Jusqu'ici nous avons vu que la paille de blé est une structure complexe, hétérogène et discontinue. Son comportement mécanique est donc affecté par les compositions et structures de chaque niveau d'hétérogénéité.

**MACROSCOPIQUE** La résistance mécanique des tiges de blé augmente au cours de la maturité de la plante (O'Dogherty et al., 1995). De plus, au sein de la tige, les entrenœuds les plus hauts (1er, juste sous l'épi, et 2eme) se distinguent des autres entrenœuds par une résistance mécanique et un module élastique plus faibles (O'Dogherty et al., 1995; Tavakoli et al., 2009).

Au niveau **MICROSCOPIQUE**, comme les tiges sont anisotropes et hétérogènes (Monties, 1991), les propriétés des tissus constitutifs sont adaptées à leur fonction dans la plante. Des études ont montré que le module d'élasticité en traction des tissus de soutien tels que le sclérenchyme est plus élevé que celui du parenchyme (Hepworth & Vincent, 1999; Yu et al., 2007). De plus, Gindl et al. (2002) ont vérifié que, à mesure que les trachéides se développent, les lacunes de la structure cellulose/hémicellulose se remplissent par augmentation de la teneur en lignine. En conséquence, la résistance de ce tissu devient plus importante (Gindl et al., 2002). Enfin, le module d'élasticité d'un tissu est maximal lorsque l'axe d'application de la contrainte appliquée est confondu avec l'axe longitudinal des cellules qui le constituent (Spatz et al., 1997; Yu et al., 2007).

Au niveau **ULTRASTRUCTURAL**, la résistance des parois cellulaires non lignifiées est principalement due à la résistance des microfibrilles de cellulose. Leur direction affecte donc directement le comportement mécanique du tissu qui les contient ; lorsque la contrainte est appliquée dans l'axe de la microfibrille, la valeur du module d'élasticité est maximal (Vincent, 1999).

Dans les parois cellulaires lignifiées, la présence de lignine entraîne une augmentation de la rigidité de la paroi (élévation du module d'élasticité). En effet, la mise en place des polymères de lignine modifie les liaisons entre les polysaccharides et tend à exclure l'eau de la paroi. Par conséquent, les liaisons hydrogène sont renforcées (Breet & Waldron, 1996; Monties, 1991; Vincent, 1999). Wimmer & Lucas (1997) ont vérifié que la résistance de la lamelle moyenne était supérieure à celle de la paroi secondaire. En revanche, son module d'élasticité était la moitié de celui de l'assise S2 de la paroi secondaire.

## 1.6 Barrières aux attaques enzymatiques

Au vu de cette structure complexe de la biomasse ligno-cellulosique, son fractionnement/déconstruction dépend non seulement de sa composition biochimique mais aussi de l'organisation/structure multi-échelle de ses constituants et leurs interactions. Les traitements enzymatiques (seuls), biologiques, chimiques et mécaniques sont donc affectés par ces propriétés. Dans la suite de ce paragraphe, nous allons faire référence à divers travaux de synthèse bibliographique qui ont porté sur l'hydrolyse enzymatique et la production d'éthanol (Chandra et al., 2007; Hall et al., 2010; Hendriks & Zeeman, 2009; Millett et al., 1976; Mosier et al., 2005; Sun & Cheng, 2002; Taherzadeh & Karimi, 2008; Vidal et al., 2011; Zhang & Lynd, 2004)), les dégradations biologiques anaérobies et aérobies (Carrère et al., 2010; Hendriks & Zeeman, 2009; McCann & Carpita, 2008; Palmowski & Muller, 2000), la digestibilité animale (Grabber, 2005; Grabber et al., 2004; Hatfield et al., 1999; Jung et al., 1993) et les traitements chimiques et/ou enzymatiques pour la production de fibres renfort ou papetières (Mansfield et al., 1996; Millett et al., 1979) ou encore comme prétraitement avant les bioconversions (Vidal et al., 2011). Individuellement, nous allons citer les travaux qui ont étudié séparément les effets des substrats sur ces procédés de traitement de la biomasse.

Les caractéristiques de la biomasse qui affectent le comportement de la biomasse traitée sont :

### **Cristallinité de la cellulose et degré de polymérisation**

Des nombreuses liaisons renforcent la cohésion pariétale et rendent les parois cellulaires plus difficilement biodégradables (Hatfield et al., 1999). Plusieurs auteurs ont constaté que le degré de cristallinité de la cellulose affectait inversement les rendements et/ou les vitesses d'hydrolyse enzymatique (Caulfield & Moore, 1974; Chang & Holtzapple, 2000; Gharpuray et al., 1983; Mansfield et al., 1999) et chimique (Millett et al., 1979; Sidiras & Koukios, 1989). Le constat que les enzymes/acides attaquent premièrement les zones amorphes de la cellulose, suppose que, à mesure que l'attaque avance, la fraction non hydrolysée est rendu plus cristalline. Pourtant, Park et al. (2010) et Mansfield et al. (1999) ont compilé des données qui montrent que cela n'est pas forcément vérifié. De même, Rivers & Emert (1988) ont constaté une réduction de la cristallinité dans les résidus d'hydrolyse. Même si plusieurs auteurs considèrent que la cristallinité de la cellulose est l'effet majeur qui gère sa dégradation (notamment dans des études utilisant des celluloses purifiées), d'autres facteurs comme la composition, quantité et distribution spatiale des hémicelluloses et des lignines ainsi que la surface spécifique (liée à la taille et géométrie) sont cités comme facteurs d'importance de la réactivité des ligno-celluloses.

Les effets du degré de polymérisation sont difficiles à étudier isolément. Fréquemment, pour faire varier le degré de polymérisation, les techniques entraînent aussi une réduction de la cristallinité et/ou de la surface spécifique. Chandra et al. (2007) discutent dans leur synthèse bibliographique du fait que même si les effets du degré de polymérisation sont difficiles à déterminer, quelques évidences montrent qu'il est inversement corrélé à l'étendue de l'hydrolyse. De même, Chang & Holtzapple (2000) ont compilé des résultats où certains montraient que le degré de polymérisation affectait inversement la dégradabilité mais d'autres où l'effet n'a pas été significatif.

### **Taille des particules / Surface accessible / Porosité**

Des travaux anciens et plus récents ont rapporté que la réduction de taille peut mener à des rendements et vitesses d'hydrolyse ou de fermentation plus importantes (Dasari & Berson, 2007; Hiden et al., 2009; Virtanen et al., 1938; Virtanen & Nikkila, 1946) qui pouvaient atteindre jusqu'à 67 % de conversion de la cellulose et 85 % de conversion des hémicelluloses (pentosanes). Récemment, dans la synthèse bibliographique de Vidal et al. (2011), les auteurs concluent que la réduction de la taille mène à une amélioration maximale de la conversion de la biomasse de 50%. La dégradation anaérobie a été améliorée aussi par réduction de la taille (Hu et al., 2005; Izumi et al., 2010; Kopp et al., 1997; Mshandete et al., 2006; Palmowski & Muller, 2000).

Fréquemment la réduction de la taille a été associée à une réduction de la cristallinité de la cellulose par l'effet de broyages à boulets/billes. Cette association a entraîné donc des améliorations lors de l'hydrolyse enzymatique (Andren et al., 1976; Caulfield & Moore, 1974; Gharpuray et al., 1983; Inoue et al., 2008; Kawakubo et al., 2010; Millett et al., 1979; Moore et al., 1972; A.S.A. Silva et al., 2010; Zhu et al., 2009) et lors de l'hydrolyse acide (Millett et al., 1979; Sidiras & Koukios, 1989). De même, un broyeur à attrition par voie sèche a été capable de réduire la cristallinité en plus de la taille et a mené à de meilleurs rendements de fermentation éthanolique des résidus de papier journal (« newspaper ») (Rivers & Emert, 1988).

Certains travaux ont montré que la réduction de taille seule, sans réduction de la cristallinité de la cellulose, améliorait l'hydrolyse enzymatique jusqu'à un maximum, puis au delà d'une certaine taille (qui varie selon le type de biomasse) le rendement reste stable (Chang et al., 1997; Vidal et al., 2011).

D'autre part, dans certains cas de dégradation biologique anaérobie, d'autres effets de la taille ont été rapportés en raison de la complexité de cette attaque biologique : soit la production de méthane n'a pas été augmentée (Pommier et al., 2010), soit la dégradation a été négativement affectée par une réduction excessive menant à un abaissement du pH (Hu et al., 2005). La décomposition aérobie dans le sol a été accélérée par l'augmentation



des surfaces de contact de paille de blé tandis que la décomposition de paille de seigle n'a pas été accélérée à cause de sa plus faible teneur en azote (nécessaire lors de cette conversion en CO<sub>2</sub>) (Angers & Recous, 1997).

L'effet de la taille s'interprète par la surface exposée aux enzymes/réactifs. La porosité a un effet important lors des traitement associant réduction de taille avec l'élimination des lignines, cette dernière entraîne une augmentation de porosité améliorant ainsi l'hydrolyse enzymatique (plus rapide et plus extensive) (Mooney et al., 1998).

### **Quantité/structure/distribution (localisation) des composés biochimiques**

**LIGNINES** La diminution de la teneur en lignine soit par des prétraitements ou par des modifications génétiques favorise l'exposition des polysaccharides aux enzymes. Les prétraitements entraînent souvent une dégradation des hémicelluloses aussi. Cela entraîne donc des hydrolyses plus extensives de la cellulose et/ou hémicelluloses (Chang & Holtzapple, 2000; Gharpuray et al., 1983; Grabber et al., 1997; Heiss-Blanquet et al., 2011; Kristensen et al., 2008; Millett et al., 1976; Siqueira et al., 2011). La lignine joue un rôle de protection physique des substrats et les enzymes s'adsorbent sur sa structure tridimensionnelle. De plus, la lignine a un effet inhibiteur des enzymes hydrolytiques notamment des cellulases (Berlin et al., 2006). Les résidus de dégradation des composés phénoliques générés lors de prétraitement peuvent aussi avoir un rôle d'inhibiteur microbien nuisant ainsi aux dégradations biologiques (Sun & Cheng, 2002). Le degré de condensation des lignines semble être inversement relié à la dégradation enzymatique (Heiss-Blanquet et al., 2011). Quant à la composition des lignines, on considère que celles majoritairement composées d'unités G restreignent plus l'accessibilité aux enzymes que celles riches en S (Ramos et al., 1992; Taherzadeh & Karimi, 2008). Pourtant, dans une étude sur des parois cellulaires lignifiées artificiellement, Grabber et al. (1997) on montré que les unités S, G et H des lignines provoquaient l'inhibition de la dégradabilité de façon similaire.

Les **HEMICELLULOSES** représentent une barrière physique aux enzymes pour atteindre la cellulose. Un des objectifs majeurs des prétraitements pour augmenter la conversion de la cellulose vise donc l'élimination des hémicelluloses. Cependant, ces prétraitements entraînent souvent une réduction de lignine donc leurs effets ne sont pas dissociés. Il a été observé que l'ajout de xylanases dans des préparations enzymatiques cellulolytiques favorise l'hydrolyse de la cellulose (Arantes & Saddler, 2011; Hu et al., 2011; Kumar & Wyman, 2009; Tabka et al., 2006). Des inhibiteurs de l'action biologique peuvent être produits lors de la dégradation des hémicelluloses par certains traitements (comme l'explosion à la vapeur), selon leurs conditions opératoires (tel que le furfural et l'hydroxyméthyl furfural).

## Interactions et « cross-links » entre les constituants

**ENTRE LES HEMICELULOSES** Les liaisons covalentes entre les hémicelluloses se font *via* la dimérisation des acides hydroxycinnamiques. Il a été montré que la réduction de ces liaisons inter-chaînes augmente significativement l'hydrolyse des parois cellulaires lignifiées (Grabber et al., 1998; Siqueira et al., 2011).

**ENTRE LES HEMICELULOSES ET LES LIGNINES** Le couplage entre les ferulates et les lignines pendant la lignification relie les hémicelluloses aux lignines. Certaines études (Grabber et al., 1998; Grabber et al., 1997) indiquent que cette interaction a plus de conséquence sur la dégradabilité de la biomasse que la nature de la lignine en elle-même.

Pour conclure, les parois cellulaires doivent être considérées comme un réseau dynamique et complexe dont l'intime cohésion entre les polysaccharides, les acides phénoliques et la lignine limite la dégradation enzymatique en réduisant l'accessibilité des polysaccharides aux microorganismes.

### Effets sur les échelles supérieures : ultrastructurale, microscopique et macroscopique

La variabilité de dégradabilité des parois se répercute au sein des cellules/tissus ainsi que des organes/plantes. De plus, les structures physiques à chaque niveau entraînent aussi des barrières aux dégradations. Des différences de dégradabilité ont été rapportés entre différents types de cellules (Siqueira et al., 2011) et plus spécifiquement différentes parois cellulaires/tissus du blé (Barry & Grenet, 1988; Bertrand et al., 2006) et entre les organes du blé (Bertrand et al., 2009; Harper & Lynch, 1981).

## 2 Bioconversions enzymatiques

### 2.1 Hydrolyse enzymatique

Au cours de l'hydrolyse, les macromolécules complexes sont scindées sous l'action d'enzymes extracellulaires sécrétées par les microorganismes pour que les monomères (ou dimères) de tailles suffisamment petites puissent être transportés au travers de la membrane cellulaire. Une fois dans la cellule ces molécules simples pourront être utilisées comme source d'énergie. Dans le cas de la production industrielle de bioéthanol (2eme génération), l'hydrolyse n'est pas réalisée par les microorganismes de fermentation et est donc faite soit séparément ou simultanément par l'ajout d'enzymes purifiées ou par des cocktails enzymatiques issus de microorganismes qui dégradent la biomasse. La majorité des microorganismes capables de dégrader la cellulose et les xylanes (majorité des hémicelluloses) synthétisent une large gamme d'isoenzymes avec des spécificités de substrats très similaires (Wong et al., 1988).

L'hydrolyse de la cellulose se fait en plusieurs étapes sous l'action de différentes enzymes (Fig. 11). Pour que l'hydrolyse soit efficace, les cellulases doivent accéder aux chaînes de glucose qui sont organisées originellement de façon très condensée (microfibrilles). Dans un premier temps, une étape dite amorphogénèse a lieu de façon à délaminer, rompre ou désordonner les zones cristallines (Coughlan, 1985). Le premier modèle sur le mécanisme de dégradation introduisant le concept C1-Cx a été postulé par Mandels & Reese (Mandels & Reese, 1964; Reese et al., 1950). Le C1 représente un facteur inconnu non-hydrolytique appelé aussi facteur de gonflement présent dans le système des cellulases. Les Cx sont donc les sites hydrolytiques proprement dits. La Fig. 11 schématise l'action cellulolytique. Après l'amorphogénèse, quand la cellulose est accessible, les endoglucanases en synergie avec des exo-glucanases fragmentent les liaisons  $\beta$ -1,4 en chaînes plus petites d'au moins 6 glucoses liés. A ce moment, ces oligomères sont rapidement hydrolysés sous l'action des cellobiohydrolases jusqu'à l'unité élémentaire de la cellulose, le cellobiose (dimère de glucose). Enfin, les  $\beta$ -glucosidases peuvent donc scinder ce dernier libérant les unités de glucose (Arantes & Saddler, 2010).

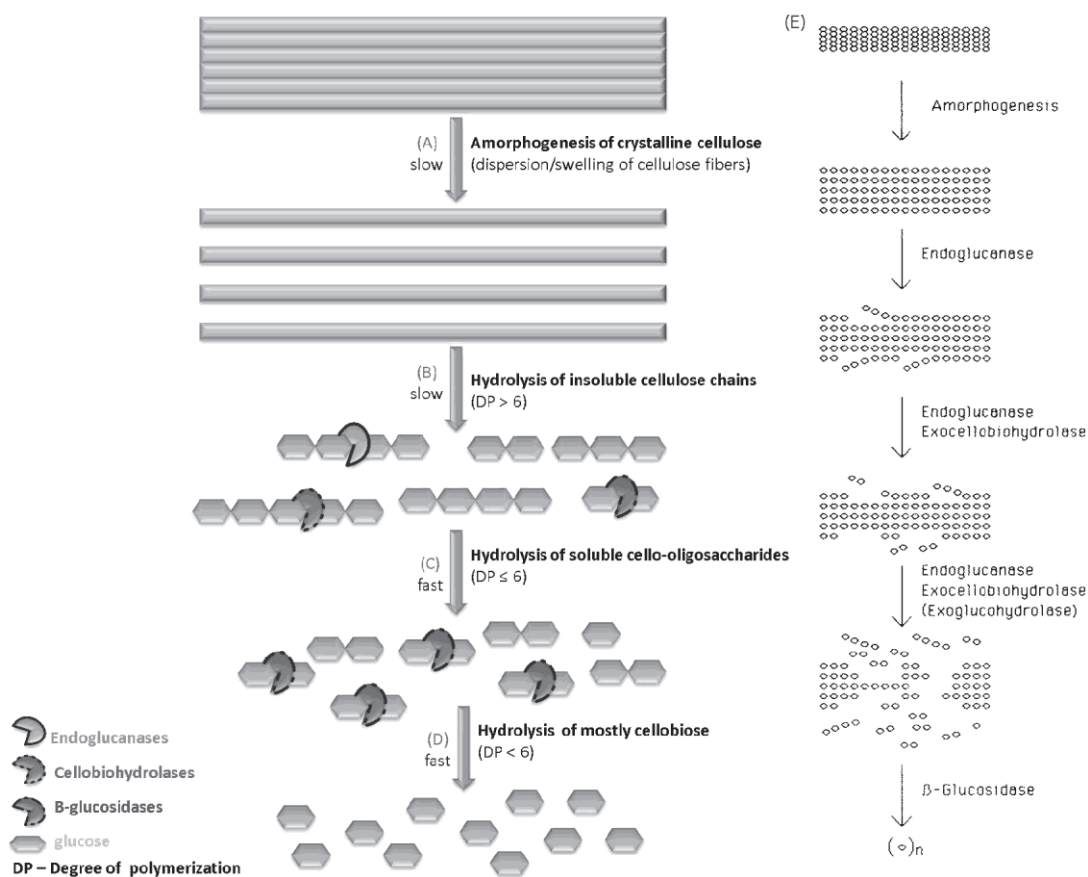


Fig. 11 Mécanisme de l'amorphogénèse/dépolymérisation par les cellulases (modèle proposé par Coughland (1985) et adapté par Arantes & Saddler (2010)). L'amorphogénèse (A) a lieu au niveau macromoléculaire par des agents non-hydrolytiques. E) Le modèle original qui montre la déconstruction de la cellulose au sein de sa structure (Coughlan, 1985).



Plusieurs glycoside hydrolases sont des protéines modulaires avec au moins deux modules : le domaine catalytique et le domaine d'accrochage au polysaccharide (ou CBM pour *carbohydrate-binding module* en anglais). Ces CBMs ont une ou plusieurs fonctions parmi les suivantes : augmenter la concentration des enzymes à la surface des substrats (effet d'approximation), sélectivité du substrat et rupture des substrats cristallins (Gilkes et al., 1991). Dans le cas de l'hydrolyse de la cellulose, les CBM sont responsables de l'adsorption de l'enzyme au substrat dans ses zones « défectueuses » comme présenté dans la Fig. 12. Par l'« approximation » de ce module, les interactions entre les chaînes de cellulose sont perturbées ce qui favorise l'entrée du CBM dans la structure par une action mécanique. Finalement, cela mène à une entrée accrue d'eau dans la structure provoquant son gonflement. Par conséquent les étapes suivantes de l'hydrolyse peuvent avoir lieu puisque les enzymes peuvent désormais accéder à la cellulose (Arantes & Saddler, 2010; Esteghlalian Ali et al., 2000).

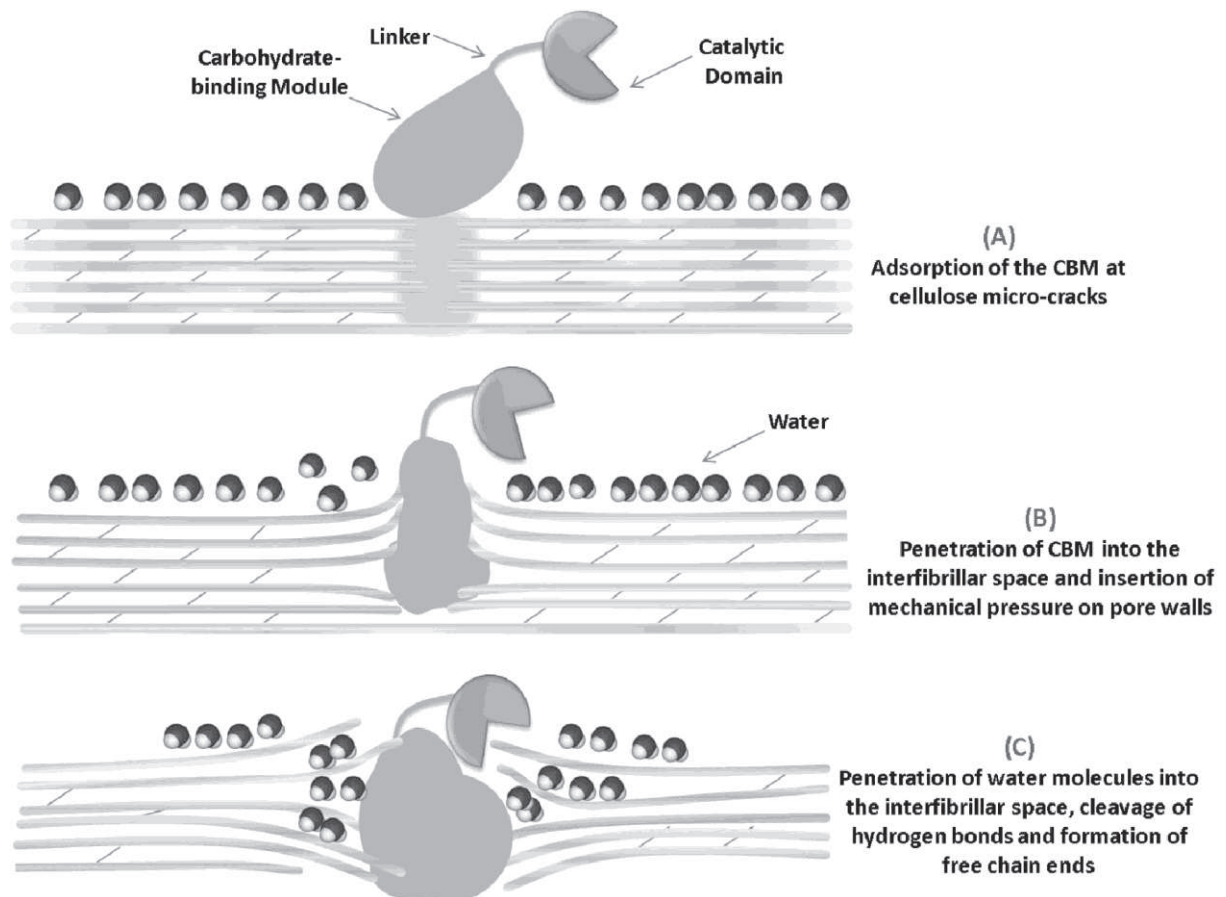


Fig. 12 Représentation schématique de l'amorphogénèse des fibres de celluloses entraînée par l'action du CBM de la cellobiohydrolase (adapté de Esteghlalian et al. (2000) par Arantes & Saddler (2010)). Le CBM est surdimensionné par rapport au module catalytique.

L'hydrolyse des hémicelluloses (composées majoritairement d'hétéroxylanes) a lieu par l'action de diverses enzymes agissant en coopération (Fig. 13) : les  $\beta$ -1,4-endoglucanases (xylanases) qui clivent les liaisons glycosidiques au sein de la chaîne de xylane (entre deux anhydro-xyloses) ; l'arabinofuranosidase qui sépare l'arabinose du xylose ; l' $\alpha$ -glucuronidase qui enlève l'acide glucuronique ; les esterase qui enlèvent les groupes acétates (acetylxylanes), acide férulique, acide *p*-coumarique; finalement, la xylosidase qui hydrolyse les xylooligosaccharides en xylose (Saha, 2003; Wong et al., 1988). Il existe un niveau considérable de synergie entre ces enzymes. Par exemple, plusieurs xylanases ne scindent pas la liaison glycosidique entre les xyloses si un d'entre eux est substitué, ainsi pour que cette enzyme puisse travailler, les chaînes latérales doivent être enlevées avant l'hydrolyse du xylane. En revanche, les enzymes accessoires enlèvent majoritairement les chaînes latérales des xylooligosaccharides. Donc, cet ensemble d'enzymes travaille de façon synergique où d'abord les xylanases clivent partiellement le xylane, les enzymes accessoires agissent et ensuite les xylooligosaccharides non substitués sont finalement hydrolysés en xylose (Gilbert & Hazlewood, 1993).

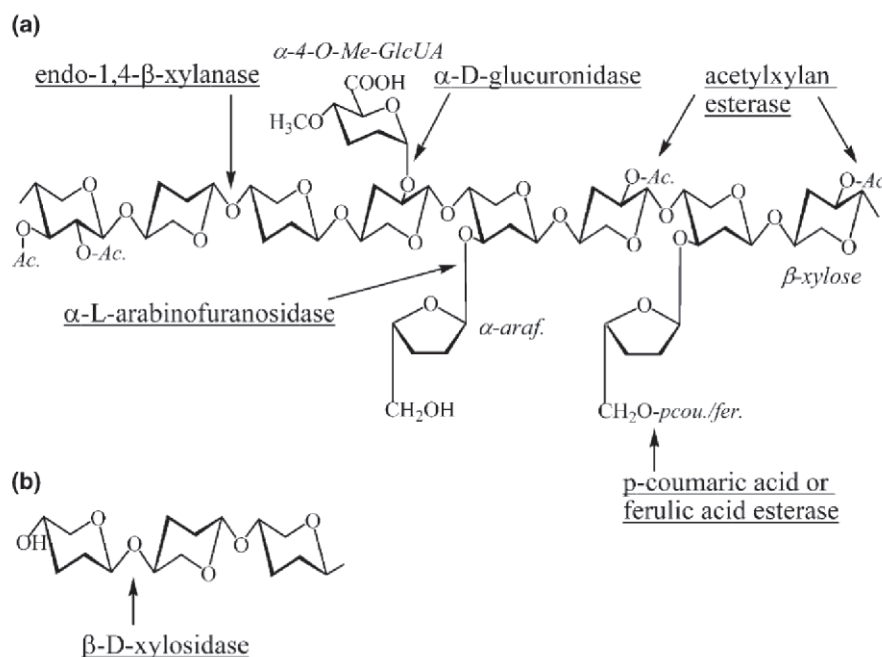


Fig. 13 Sites d'attaque par les enzymes xylanolytiques sur (a) l'hétéroxylane et (b) sur le xylooligosaccharide (Collins et al., 2005).

## 2.2 Dégradation anaérobie – fermentation éthanolique

Le procédé « conventionnel » de production d'éthanol à partir de la biomasse se fait en quatre étapes : 1) le prétraitement qui rend la structure des ligno-celluloses plus accessible ; 2) la saccharification (conversion en monosaccharides) ; 3) la fermentation où les microorganismes, généralement des levures, métabolisent le glucose en éthanol et enfin 4) la distillation/rectification où l'éthanol est extrait et purifié pour atteindre les spécifications propres aux biocarburants (Margeot et al., 2009; Mosier et al., 2005; Naik et al., 2010). L'étape d'hydrolyse peut être menée simultanément à la fermentation (procédé SSF) ou séparément (procédé SHF) comme présenté dans la Fig. 14 (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

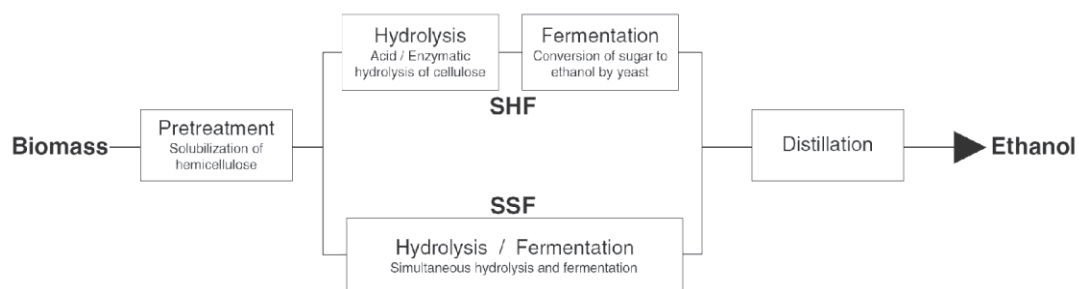


Fig. 14 Diagramme des procédés pour la production de bioéthanol à partir de la biomasse ligno-cellulosique. SHF: Hydrolyse séparée de la fermentation. SSF: Fermentation et saccharification simultanées (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

Divers microorganismes trouvés dans la nature sont capables d'une fermentation éthanolique. Les microorganismes utilisés pour la production d'éthanol sont classifiés en trois catégories : les levures (ex. *Saccharomyces* sp.), les bactéries (ex. *Zymomonas* sp.) et les champignons filamenteux (mycélium). Ces microorganismes trouvés dans la nature sont sélectifs quant à leur caractéristiques de fermentation, quelques uns sont capables de fermenter hexoses ou pentoses, ou même des mélanges des deux (Naik et al., 2010). Plusieurs études portent actuellement sur la possibilité de produire un microorganisme « idéal » qui serait capable de produire de l'éthanol à partir de n'importe quel glucide (Hahn-Hägerdal et al., 2007). De plus, ces microorganismes doivent fermenter les sucres en présence d'inhibiteurs tels que acides faibles, furaldehydes et composés phénoliques (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Margeot et al., 2009). *Saccharomyces cerevisiae* a été le microorganisme fermentatif le plus utilisé au cours de l'histoire ; il présente de nombreux atouts résultant de nombreuses années de sélection : résistance à l'éthanol, mise en œuvre industrielle aisée. Cependant, *S. cerevisiae* n'est pas capable de fermenter les pentoses.

Ces dernières années, beaucoup de travaux ont porté sur la recherche et/ou l'amélioration de souches fermentant activement les pentoses en éthanol (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Margeot et al., 2009). Pour ce faire, quatre types de micro-organismes ont été

étudiés : les levures fermentant naturellement les pentoses, des souches recombinées de *S. cerevisiae*, des bactéries thermophiles ou mésophiles utilisant les pentoses. Notamment lors de la fermentation des pentoses, la fermentation et saccharification simultanées (SSF dans la Fig. 14) présentent l'avantage de maintenir des concentrations faibles en glucose ce qui stimule la fermentation du xylose (Margeot et al., 2009).

### 2.3 Dégradation anaérobie (biogaz)

La dégradation anaérobie est un procédé biologique où le carbone organique est converti par une série d'oxydations et réductions à sa forme la plus oxydée (CO<sub>2</sub>) et à la moins oxydée (le méthane CH<sub>4</sub>, majorité du biogaz >70% du volume). Une large gamme de microorganismes catalyse cette conversion en absence d'oxygène. Des quantités mineures de gaz sont produites sous forme d'azote, hydrogène, ammoniacque et sulfite d'hydrogène (généralement moins de 1% du volume total de biogaz) (Angelidaki et al., 2003). L'intérêt de cette conversion est d'une part son produit qui peut générer de l'énergie même si son pouvoir calorifique est inférieur à celui du gaz naturel. D'autre part la matière organique qui est fortement réduite avec peu d'augmentation de la biomasse microbienne (en comparaison avec des procédés aérobies) (Angelidaki et al., 2003).

Les voies métaboliques simplifiées décrivant le processus de cette transformation sont considérées souvent en quatre étapes principales (Fig. 15), impliquant quatre groupes de microorganismes spécifiques, où les composés intermédiaires des premières étapes servent de substrats pour les étapes suivantes (Gujer & Zehnder, 1983; Sinechal et al., 1979).

**HYDROLYSE ET ACIDOGÈNESE** L'étape d'hydrolyse est similaire à celle décrite dans le paragraphe 2.1, les différences principales sont les microorganismes sécrétant les enzymes hydrolytiques. Les macromolécules complexes sont solubilisées sous l'action d'enzymes extracellulaires excrétées par des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium* pour la dégradation de la cellulose) ou facultatives aérotolesérantes (*Bacillus* pour la dégradation de protéines). Lorsque l'on s'intéresse à la méthanisation de substrats complexes contenant des fractions solides, l'hydrolyse devrait être considérée comme l'étape cinétiquement limitante (Eastman & Ferguson, 1981; Noike et al., 1985; Palmowski & Muller, 2003; Veeken et al., 2000). Dans un deuxième temps, lors de l'acidogénèse, les monomères issus de l'hydrolyse, ainsi que les composés dissous, servent de substrats à des microorganismes fermentaires qui les dégradent principalement en acides de faibles poids moléculaires comme les acides gras volatils (VFA pour *volatile fatty acid* en anglais) tels que propionate, butyrate, valérate, pyruvate, lactate, ou en alcools tels que le méthanol, éthanol... Les microorganismes réalisant cette étape peuvent aussi bien être anaérobies facultatifs (du genre *Acetobacter* ou *Streptococcus*) que strictement anaérobies (*Clostridium*).

Leur taux de croissance très élevé est responsable, dans le cas d'une surcharge organique, de l'accumulation de composés intermédiaires comme l'acétate ou l'hydrogène, qui peuvent inhiber les flores acétogènes et méthanogènes (Mosey, 1983).

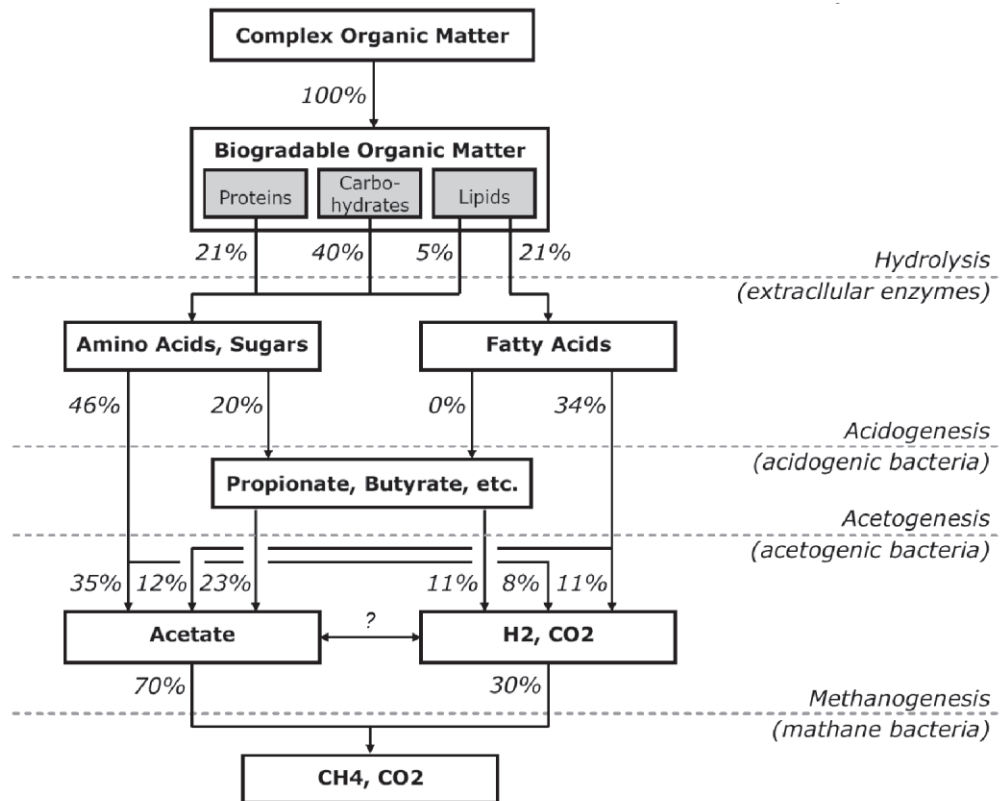


Fig. 15 Etapes de la dégradation anaérobie en biogaz (Gujer & Zehnder, 1983).

**ACETOGENESE** Les produits de l'hydrolyse et de l'acidogénèse (VGA, sucres, alcools,...) sont réduits en acétate, hydrogène et dioxyde de carbone par un groupe hétérogène de populations bactériennes : les acétogènes syntrophes productrices d'hydrogène (*Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophobacter*...), les bactéries acétogènes non-syntrophes (*Selomonas*, *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Acetogenium*, *Acetobacterium*, *Clostridium*). L'accumulation d'hydrogène peut agir comme un inhibiteur de cette étape (Mosey, 1983).

**METHANOGENESE** Lors de cette étape, les produits des réactions précédentes, principalement l'acétate, le formate, le dioxyde de carbone et l'hydrogène, sont convertis en méthane par les bactéries dites méthanogènes (Bryant, 1979; Gujer & Zehnder, 1983; Mosey, 1983):

La première population comprend les méthanogènes hydrogénophiles qui produisent du méthane à partir de l'hydrogène.

La deuxième population comprend les méthanogènes appelés acétoclastes qui produisent le méthane à partir de l'acétate.

## 2.4 Dégradation aérobie: décomposition dans le sol

On distingue la matière organique du sol qualifiée d' « endogène », de la matière organique apportée au sol et alors qualifiée « d'exogène ». La matière organique du sol est en majorité considérée comme non vivante et biologiquement stable (souvent dénommée « humus ») soit parce qu'elle est présente sous la forme de composés organiques de faible dégradabilité (récalcitrance chimique) soit parce qu'elle forme des associations avec les éléments minéraux du sol (argile, calcium, ions métalliques) qui protègent physiquement les composés organiques de la dégradation microbienne (Lützow et al., 2006; Schöning & Kögel-Knabner, 2006; Zech et al., 1997). Une fraction faible de 2 à 3% du C total du sol de la matière organique du sol est constituée par la biomasse microbienne (bactéries, champignons). Les matières organiques apportées sont essentiellement les résidus de culture agricole.

Dans les sols agricoles, la biodégradation des matières organiques s'effectue via les microorganismes hétérotrophes du sol en conditions aérobies qui utilisent le carbone organique comme source énergétique. En présence d'un substrat, ces microorganismes synthétisent et sécrètent dans le milieu des exo-enzymes qui vont dégrader ces composés en molécules simples et assimilables par les bactéries et les champignons.

L'humification est le processus de transformation de la matière organique fraîche en humus. Elle est caractérisée par une accumulation dans le sol des produits les plus récalcitrants à la décomposition ayant une structure chimique complexe qui reste très stable dans le sol. Les lignines semblent avoir un taux de renouvellement supérieur à celui de la matière organique du sol ainsi elles sont partiellement stabilisées dans le sol (Dignac et al., 2005). La stabilisation à long terme de la matière organique du sol est principalement contrôlée par l'existence de mécanismes de protection provenant de la matrice sol et des minéraux du sol, et non par la structure chimique propre de la matière organique du sol (Schöning & Kögel-Knabner, 2006).

Les microorganismes hétérotrophes décomposeurs des matières organiques exogènes se développent par successions de populations en fonction de la nature du substrat (McMahon et al., 2005). La première population de microorganismes qui s'installe est apte à métaboliser le substrat initial dans les conditions du milieu. La croissance de cette population va durer jusqu'à épuisement du substrat. Une autre population de microorganismes peut alors lui succéder pour utiliser le nouveau substrat ainsi que les éléments microbiens provenant de la lyse de la première population : c'est le processus de « turnover microbien ». La vitesse de biodégradation des matières organiques exogènes, la croissance des microorganismes et le turnover microbien sont largement dépendants de la nature des matières organiques exogènes.



L'apport de matière organique exogène dans un sol peut influencer la biodégradation de la matière organique endogène du sol par plusieurs mécanismes qui font l'objet de nombreuses études : ce phénomène est appelé « *priming effect* » (Kuznyakov et al., 2000).

Les processus majeurs intervenant dans les cycles couplés du carbone et de l'azote dans les sols agricoles en conditions aérobies sont schématisés dans la Fig. 16. La biodégradation de la matière organique exogène apportée au sol implique différents processus : la minéralisation du carbone et de l'azote organique (transformation en  $\text{CO}_2$  et en azote minéral), l'assimilation du carbone et l'organisation de l'azote par la biomasse microbienne du sol, et l'humification du carbone et de l'azote organique.

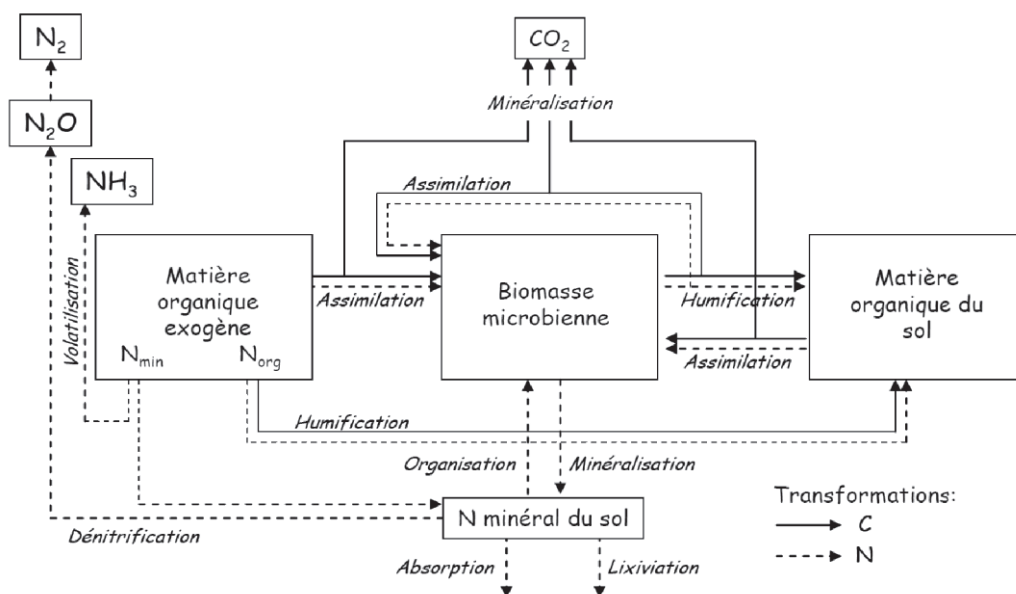


Fig. 16 Représentation schématique des cycles couplés du carbone et de l'azote dans les sols agricoles.

La matière organique exogène est dépolymérisée en molécules simples par les exoenzymes produites par les microorganismes du sol. Ces molécules simples sont absorbées par les bactéries et les champignons. Dans la cellule, le carbone du substrat peut alors être : oxydé en  $\text{CO}_2$  dans les diverses chaînes métaboliques (glycolyse, voie des pentoses phosphate, cycle de Krebs), c'est la « minéralisation du carbone » ; et utilisé pour la croissance des microorganismes et la biosynthèse de leurs différents éléments cellulaires, c'est l'« assimilation du carbone ».

Le rendement d'assimilation du carbone exprime la partition entre la minéralisation et l'assimilation du carbone pour un microorganisme ou une communauté microbienne. Payne (1970) montre que le rendement d'assimilation du carbone ne peut excéder 62%. Cette conclusion est basée sur des calculs thermodynamiques de l'énergie nécessaire à la cellule (énergie provenant de la minéralisation du carbone) pour réaliser ses biosynthèses (assimilation du carbone).

### 3 Bioraffinerie

Le contexte mondial de raréfaction des ressources en carbone fossile et, paradoxalement, les menaces avérées de changement climatique lié à l'excès des rejets de CO<sub>2</sub>, favorise de plus en plus le développement de l'utilisation des ressources végétales comme ressource renouvelable. Le concept de bioraffinerie est une analogie avec la raffinerie pétrolière où la matière première d'entrée est fractionnée en différents produits présentant des fonctionnalités particulières tels que les carburants et les molécules de la pétrochimie. La raffinerie végétale est basée sur la production de multiples produits bio-sourcés à partir de la biomasse en combinant divers procédés (Fig. 17A). De cette manière la biomasse peut être utilisée comme source d'énergie, matériaux et synthons (la chimie « verte »). La Fig. 17B présente les différents produits issus des diagrammes de bioraffineries (Kamm & Kamm, 2004; Naik et al., 2010).

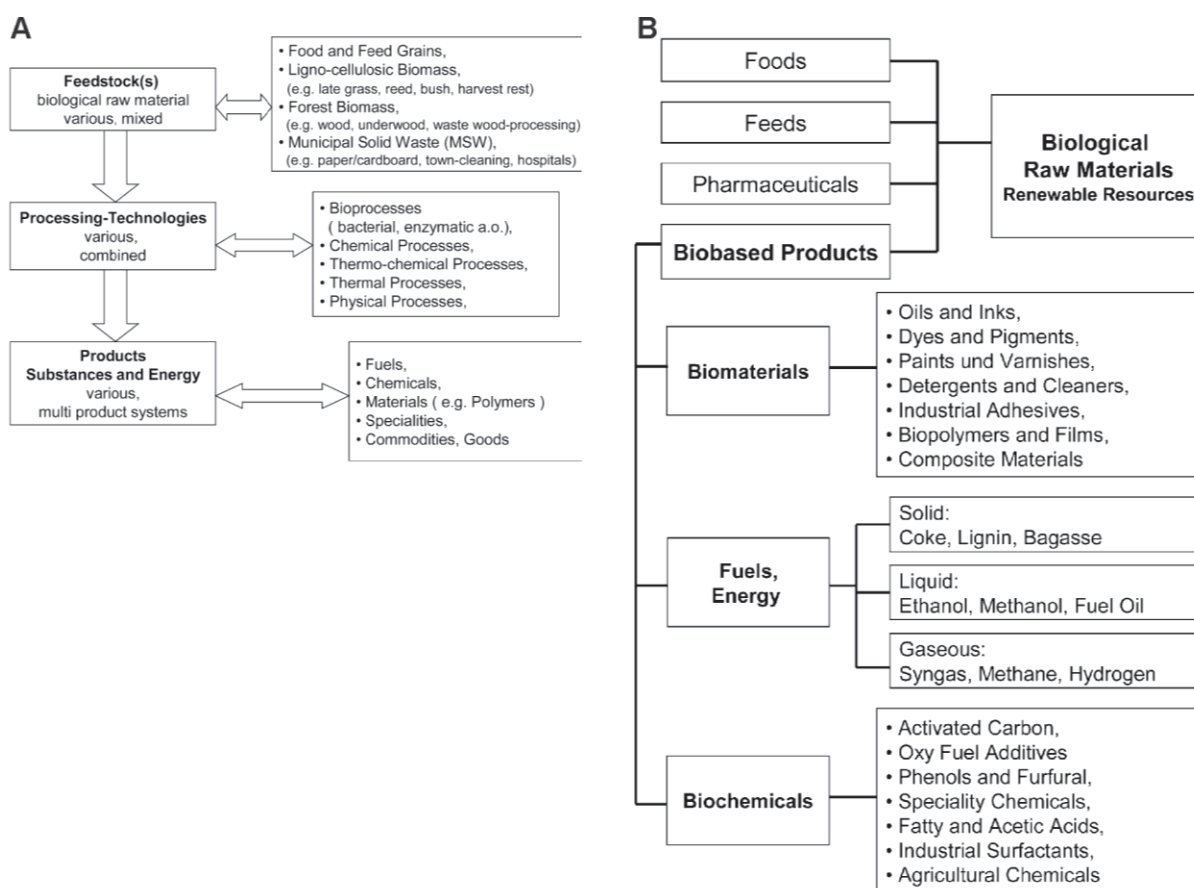


Fig. 17 Bioraffineries : A) Différents procédés impliqués dans la conversion de la biomasse et B) Potentiels de produits à partir des ressources renouvelables (Kamm & Kamm, 2004).

On peut distinguer trois stades de perfectionnement dans les bioraffineries : le premier est la transformation d'une matière première par des traitements fixes en un produit principal et certains sous-produits, un exemple est la production d'éthanol à



partir du maïs ou du blé en une certaine quantité d'éthanol et de coproduits comme les résidus pour l'alimentation animale (drèches) et CO<sub>2</sub>; ces procédés n'ont presque aucune flexibilité. Le deuxième niveau des bioraffineries est la transformation d'une matière première qui s'adapte aux différents produits selon la demande ; dans l'exemple de la transformation de sources d'amidon, les produits peuvent être très diversifiés (dans le cas du maïs ce sont l'amidon, le sirop de fructose, l'huile de maïs, le gluten). A ce niveau, il existe une certaine flexibilité des procédés. Le troisième et dernier niveau n'est pas seulement capable de produire différents types de produits mais a la possibilité de traiter différentes matières premières (par ex. le grain et la paille). Le mot-clé c'est l'adaptabilité pouvant générer différents produits finaux ou des intermédiaires pour d'autres industries (Kamm et al., 2006; Kamm & Kamm, 2004). Actuellement trois grands groupes de bioraffinerie sont étudiés : la bioraffinerie de la plante entière (en anglais « *whole-crop* ») qui transforme des céréales et le maïs ; la bioraffinerie verte qui utilise des matières premières naturellement humides comme l'herbe, la luzerne, le trèfle, ou des céréales immatures ; et la bioraffinerie de la biomasse ligno-cellulosique qui utilise des matières naturellement sèches (Kamm & Kamm, 2004).

Les productions végétales à vocation alimentaire (grains et graines, sources de première génération) ont un avenir limité dans ce domaine car des raisons éthiques et stratégiques (importance des exportations de matières premières alimentaires, pression concurrentielle sur la disponibilité des meilleures terres cultivables), poussent au choix de l'utilisation préférentielle de la biomasse ligno-cellulosique (source de deuxième génération) dès que les technologies de conversion seront suffisamment compétitives (horizon 2020). Les sources de ligno-cellulose exploitables seront nombreuses. Une attention particulière sera donc portée sur la bioraffinerie de la biomasse ligno-cellulosique pour la production d'énergie par des procédés biologiques.

Une bioraffinerie sèche suppose l'utilisation des technologies n'utilisant pas ou très peu d'eau/liquide. Son objectif est de la même manière optimiser l'utilisation de la biomasse en créant des fractions d'intérêt/de valeur à partir de la biomasse. Evidemment, les procédés de cette raffinerie sont un cas particulier de la bioraffinerie globale et ses technologies peuvent être placées soit en amont, soit en aval, ou comme des étapes intermédiaires du fractionnement intégral du végétal. Un exemple de raffinerie sèche est celui de la mouture du grain de blé, pratiquée dans une industrie largement développée et perfectionnée au cours des siècles, appelée génériquement : la meunerie (Willm, 2009). Lors de ces multiples opérations de réduction granulométrique et de séparations par tamisage, des centaines de fractions sont produites avec des caractéristiques plus au moins contrastées. A la fin, on distingue des fractions très distinctes avec des fonctionnalités très diversement marquées (par ex. farine vs son). Plus récemment, d'autres procédés de

fractionnement par voie sèche et innovants font l'objet d'autres études comme discuté par Hemery et al. (2007).

Les avantages d'un fractionnement sec sont l'économie d'eau et d'énergie, l'absence d'effluents, la préservation des structures natives et l'augmentation de la réactivité des particules. La réduction granulométrique vers des tailles ultrafines ( $>20 \mu\text{m}$ ) permet d'augmenter considérablement la surface de réaction des particules et les phénomènes de diffusion; des prétraitements chimiques et physiques, non limités par une utilisation alimentaire ultérieure, peuvent être appliqués pour fragiliser les structures clés ou même fonctionnaliser les particules en cours de broyage (le broyeur étant alors vu comme un réacteur); le tri des particules en fonction de leur composition en agropolymères pourra se faire par la combinaison des techniques de tri dimensionnel, aérodynamique et électrostatique.

Pour une utilisation intégrale de la biomasse ligno-cellulosique, sa réactivité lors des procédés de conversion doit être augmentée. Comme discuté précédemment, le caractère récalcitrant de la biomasse à divers niveaux empêche une conversion maximale. L'efficacité de la transformation des ligno-celluloses en agro-carburants, en agromatériaux ou en synthons pour la chimie verte a de larges marges de progression, quand certains obstacles pourront être levés : la limitation physique de l'accès des enzymes ou des réactifs chimiques aux polysaccharides, la faible activité spécifique des enzymes d'hydrolyse de la cellulose, l'inhibition des enzymes d'hydrolyse par la lignine, la mauvaise fermentabilité des pentoses (discutés précédemment). Une des étapes-clé de la bonne utilisation de la biomasse réside dans sa préparation avant sa soumission aux étapes de biotransformation.

Cette préparation est qualifiée de prétraitement et généralement consiste en un broyage grossier, suivi d'une opération de prétraitement comme la déstructuration hydrothermique et/ou chimique. Ces prétraitements sont nécessaires pour rendre la biomasse plus réactive/accessible ; en particulier l'augmentation de l'accessibilité de la cellulose est en général l'objectif principal.

On distingue différents types de prétraitements de la biomasse pour la bioraffinerie : les physiques (mécaniques, thermiques...), chimiques (acides, basiques, oxydatifs, solvants), biologiques (microorganismes, enzymes) et des associations entre eux. Le Tab. 1 présente une compilation des principaux effets des prétraitements de la biomasse (Taherzadeh & Karimi, 2008).

Une attention particulière est donnée aux procédés d'explosion à la vapeur et organosolv car ce sont d'une part le plus utilisé (explosion à la vapeur) et d'autre part le

plus performant pour la récupération des grandes familles de composés (organosolv). Le broyage, qui fait l'objet de cette étude, sera abordé dans les sections suivantes.

L'explosion à la vapeur, aussi appelé auto-hydrolyse, est un procédé hydrothermique où la biomasse ligno-cellulosique est rapidement chauffée à des températures et pressions élevées (160-260 °C, 7-50 bar). Les molécules d'eau pénètrent la structure du substrat pendant quelques minutes. La pression est soudainement relâchée et l'eau sort de l'intérieur de la structure de façon explosive. Les structures de la biomasse sont ainsi ouvertes, ce qui résulte en une augmentation de surface spécifique (Ballesteros et al., 2000). Les hémicelluloses sont dégradées et solubilisées. Les lignines sont partiellement solubilisées par le clivage des liaisons éther  $\beta$ -O-4 et d'autres liaisons acido-labiles et sont plus condensées après l'explosion à la vapeur (Ramos, 2003). La fraction liquide résultante est riche en hémicelluloses solubilisées en monomères ou oligosaccharides, en résidus de la dégradation des hémicelluloses comme le furfural, en dérivés de l'alcool cinnamylique résultant de la dégradation partielle des lignines. L'association de cette technique avec des acides dilués est aussi utilisée pour maximiser l'hydrolyse des hémicelluloses et réduire leur conversion en inhibiteurs de l'action microbienne (furfural, hydroxyméthylfurfural) (Sun et al., 2005). La fraction solide est donc fortement enrichie en cellulose et sa dégradabilité est augmentée par l'exposition de la cellulose débarrassée des hémicelluloses (Hendriks & Zeeman, 2009; Kristensen et al., 2008; Sun & Cheng, 2002). Kumar et al. (2009) indiquent que les contraintes associées à l'explosion à la vapeur sont la consommation élevée d'énergie thermique et la séparation incomplètes de la matrice lignine-carbohydate.

Le procédé organosolv consiste en l'utilisation de mélanges d'acides organiques pour engendrer une catalyse acide de façon à rompre les liaisons internes des lignines et hémicelluloses. Les solvants utilisés sont généralement le méthanol, éthanol, acétone, éthylène glycol, triéthylène glycol, tetrahydrofurfuryl alcool; les acides utilisés sont l'acide chlorhydrique et sulfurique (Kumar et al., 2009). Pour la majorité des procédés organosolv ayant lieu à des températures élevées (185-210 °C), l'utilisation des acides n'est pas nécessaire car la température joue le rôle de catalyseur de la rupture des complexes lignine-carbohydate (Duff & Murray, 1996). La majorité des hémicelluloses et lignines sont solubilisées et la cellulose reste insoluble. Cela fait de ce procédé une alternative intéressante à la production de bioéthanol (Zhao et al., 2009). Une contrainte de ce procédé est la récupération des solvants utilisés car ils sont d'une part coûteux et d'autre part peuvent être des inhibiteurs de l'action biologique/enzymatique subséquente (Kumar et al., 2009).

Tab. 1 Procédés de prétraitements de la biomasse ligno-cellulosique (adapté de Taherzadeh &amp; Karimi, 2008).

Pretreatment method	Processes	Studied Application	Possible changes in biomass	Notable remarks	
Physical pretreatments	Milling: - <i>Ball milling</i> - <i>Two-roll milling</i> - <i>Hammer milling</i> - <i>Colloid milling</i> - <i>Vibro energy milling</i>	Ethanol			
	Irradiation: - <i>Gamma-ray irradiation</i> - <i>Electron-beam irradiation</i> - <i>Microwave irradiation</i>	Ethanol and biogas	- Increase in accessible surface area and pore size - Decrease in cellulose crystallinity - Decrease in degrees of polymerization	- Most of the methods are highly energy demanding - Most of them cannot remove the lignin - It is preferable not to use these methods for industrial Applications - No chemicals are generally required for these methods	
Chemical and physicochemical pretreatments	Others: - <i>Hydrothermal</i> - <i>High pressure steaming</i> - <i>Expansion</i> - <i>Extrusion</i> - <i>Pyrolysis</i>	Ethanol and biogas			
	Explosion: - <i>Steam explosion</i> - <i>Ammonia fiber explosion</i> - <i>CO<sub>2</sub> explosion</i> - <i>SO<sub>2</sub> explosion</i>	Ethanol and biogas			
	Alkali: - <i>Sodium hydroxide</i> - <i>Ammonia</i> - <i>Ammonium Sulfite</i>	Ethanol and biogas			
	Acid: - <i>Sulfuric acid</i> - <i>Hydrochloric acid</i> - <i>Phosphoric acid</i>	Ethanol and biogas	- Increase in accessible surface area - Partial or nearly complete delignification	- These methods are among the most effective and include the most promising processes for industrial applications - Usually rapid treatment rate	
	Gas: - <i>Chlorine dioxide</i> - <i>Nitrogen dioxide</i> - <i>Sulfur dioxide</i>	Ethanol and biogas	- Decrease in cellulose crystallinity - Decrease in degrees of polymerization	- Typically need harsh conditions	
	Oxidizing agents: - <i>Hydrogen peroxide</i> - <i>Wet oxidation</i> - <i>Ozone</i>	Ethanol and biogas	- Partial or complete hydrolysis of hemicelluloses	- There are chemical requirements	
	Solvent extraction of lignin: - <i>Ethanol-water extraction</i> - <i>Benzene-water extraction</i> - <i>Ethylene glycol extraction</i> - <i>Butanol-water extraction</i> - <i>Swelling agents</i>	Ethanol			
	Biological pretreatments	<i>Fungi and actinomycetes</i>	Ethanol and biogas	- Delignification - Reduction in degree of polymerization of cellulose - Partial hydrolysis of hemicellulose	- Low energy requirement - No chemical requirement - Mild environmental conditions - Very low treatment rate - Did not consider for commercial application

### 3.1 Prétraitements mécaniques : le broyage

Avant de traiter le broyage de la biomasse, nous allons introduire l'opération unitaire de broyage avec ses modes de fragmentations, les différentes technologies appliquées à la biomasse et celles utilisées dans ce travail de thèse. Enfin, nous allons faire une compilation des études préalables portant sur le broyage sur la biomasse.

La littérature concernant le broyage des minéraux dans les domaines des industries minières a été et est encore prise en compte par des nombreux auteurs (Bernotat & Schönert, 1988; Partyka & Yan, 2007; Rumpf, 1973; Tavares & King, 1998). Les modèles de broyage et par conséquent de la rupture des particules sont donc disponibles pour ces matériaux qui sont en général très friables et de comportement fragile, notamment comparativement à la biomasse végétale. Le broyage de la biomasse quant à lui a été peu étudié notamment au niveau de la description fine des mécanismes de rupture des particules ligno-cellulosiques (Müller, 2003; Temmerman, 2011).

#### 3.1.1 Généralités à propos du broyage

De façon simplifiée, la réduction granulométrique d'une particule est une séquence d'événements qui conduit à la fracture de la particule : le chargement de la particule, sa déformation, la construction d'une distribution non-uniforme de la contrainte mécanique et enfin l'occurrence ou non occurrence de la fracture. Plusieurs facteurs affectent ce processus comme par exemple la forme de la particule, son comportement mécanique (ex. élastique), la température et le type de contrainte. La contrainte peut être appliquée entre deux surfaces (compression) ou contre une seule surface (impact) (Bernotat & Schönert, 1988). La Fig. 18 résume ces divers paramètres et leurs effets.

L'état de la contrainte (« state of stress ») est le résultat des propriétés de la particule/matériau telles que son comportement mécanique (élastique, plastique, visqueux) et des conditions de la contrainte appliquée par le système de broyage. Cet état de contrainte va donc déterminer si la déformation résultante est inélastique (plastique, déformable) ou si la fracturation se produit. Ces phénomènes sont appelés « la réaction » (Bernotat & Schönert, 1988).

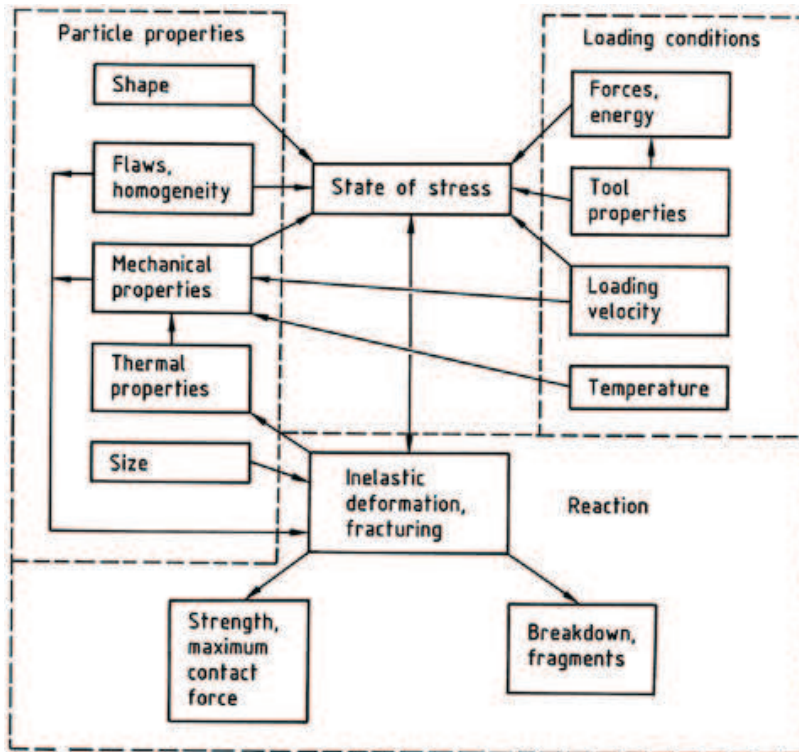


Fig. 18 Facteurs qui affectent la réduction de la particule (Bernotat & Schönert, 1988).

Les caractéristiques spécifiques des particules de biomasse sont i) leur caractère élasto-plastique (Annoussamy et al., 2000; Müller, 2003; O'Dogherty et al., 1995) et ii) leurs irrégularités de forme (Le Digabel & Averous, 2006). Le premier entraîne une limitation caractérisée par l'irréversibilité et l'indépendance du temps. La déformation plastique produit des contraintes à l'intérieur de la particule et sa fragilisation. En conséquence, les particules qui subissent ce type de déformation nécessitent généralement d'être soumises aux contraintes à plusieurs reprises pour être fragmentées. Le caractère irrégulier de la forme des particules rend difficile le calcul de l'état de la contrainte. Pour ce faire, il est nécessaire de faire des approximations telles que la sphéricité de la région de contact où se passe l'impact/friction (Bernotat & Schönert, 1988). Pour les futurs modèles de rupture de particules ligno-cellulosiques, l'acquisition de ces paramètres doit être affinée. Les caractéristiques morphologiques des particules évoluent donc pendant le broyage et aussi selon le mode et l'intensité de broyage. Ces variations peuvent être indicatives des modes de rupture et des changements de réactivité des particules. Ces aspects seront approfondis dans le Chapitre IV.1.



### 3.1.2 Différents modes de broyage

Le broyage consiste à diminuer la taille d'un solide divisé. Le but peut être d'augmenter la surface d'échange entre le solide pulvérulent et le milieu extérieur, liquide ou gaz, ou bien de faciliter le mélange avec un autre solide, ou d'augmenter les transferts pour d'autres opérations. Le bon dimensionnement d'un broyeur est très important pour trois raisons principales : le broyage est une opération consommatrice d'énergie, la maintenance des appareils est coûteuse et les investissements sont lourds (Bimbenet et al., 2002).

On peut représenter l'effet du broyage comme le déplacement de la courbe granulométrique passant du produit initial dit « grossier » au produit final dit « broyé » (Fig. 19). Trois catégories peuvent être décomposées : le broyage grossier, le broyage fin et le broyage ultrafin.

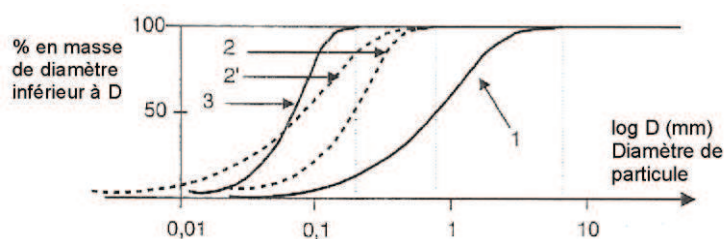


Fig. 19 Déplacement de la courbe granulométrique entre entrée (1) et sortie (2). La courbe de sortie varie avec les réglages (2 et 2') et avec le type de broyeur utilisé (2 et 3) (Bimbenet et al., 2002).

Dans le cas de matériaux déformables ou fibreux, le broyage grossier se fait par des dilacérateurs, des scies ou des couteaux (Bimbenet et al., 2002). La réduction granulométrique de la biomasse est majoritairement réalisée par l'utilisation de broyeurs à marteaux/couteaux. Les impacts se produisent entre les marteaux du rotor et les particules, ensuite, après que les particules soient accélérées, d'autres impacts se produisent directement contre la grille de sélection, une autre surface ou encore une autre particule. L'énergie thermique générée par la friction compte pour la majorité de la dissipation de l'énergie (Scholten & McElhiney, 1985).

Trois types d'installations sont considérés pour le broyage fin et ultrafin (Fig. 20) : le broyage à corps broyants guidés (broyeurs à meule, à cylindres ou à percussion) ; le broyage à corps broyants libres (à boulets, cylindres ou à galets) et le broyage par attrition entre les particules (jet d'air). Des informations plus approfondies sur les broyeurs utilisés dans cette étude sont discutées par la suite.

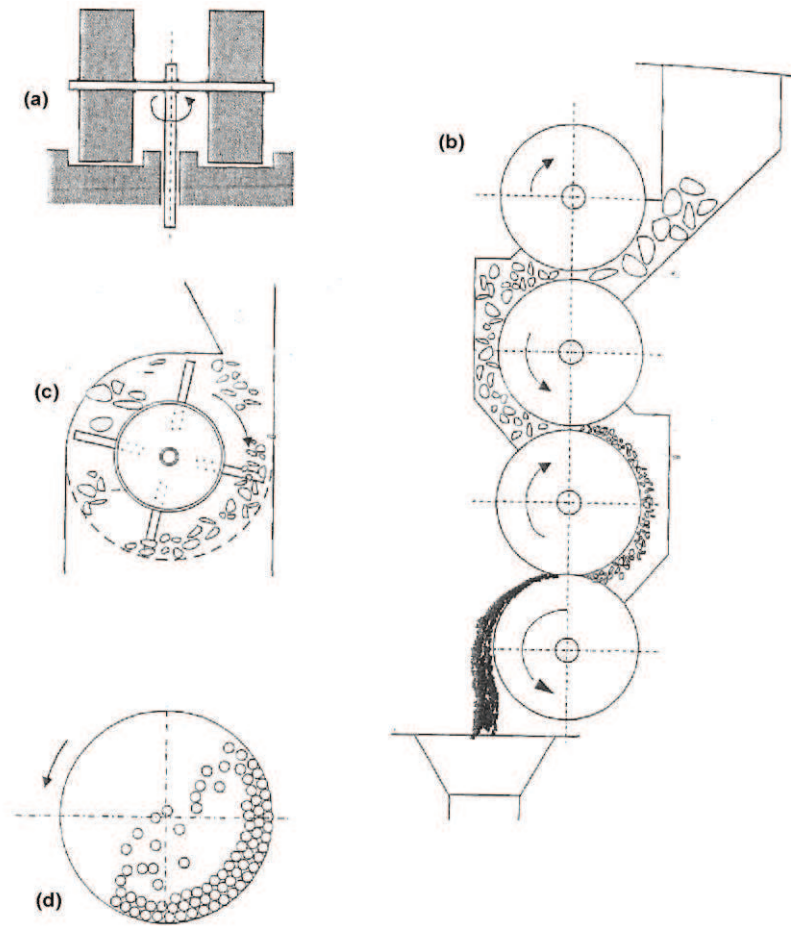


Fig. 20 Schémas d'équipements pour broyage : (a) broyeur à meule, (b) broyeur à cylindres, (c) broyeur à percussion, (d) broyeur à boulets (Bimbenet et al., 2002).

### 3.1.3 Broyeurs à corps broyants guidés - à percussion utilisant une grille de sélection

Le dispositif des broyeurs à corps broyants à percussion est constitué d'un rotor muni de masses articulées (appelés marteaux) ou non articulés (broches). Le broyage s'effectue par impact du produit avec ces masses tournant à grande vitesse ( $\sim 120$  m/s), le produit ne sortant par une grille ou par transport pneumatique que lorsque sa taille est devenue assez petite. Ce type d'équipement permet de traiter des débits très importants pour un faible encombrement ; il est adapté au broyage de matières élastiques, fibreuses ou très friables (Bimbenet et al., 2002).

### 3.1.4 Broyage à corps broyants libres

Les broyeurs à corps broyants libres consistent en des cylindres creux tournant au tour de leur axe horizontal et contenant le produit à broyer et les corps broyants. Le broyage est obtenu soit par cisaillement du produit sur les éléments mobiles dans le cas



d'une rotation lente avec une rotation interne en cascade, soit par impact dans le cas d'un fonctionnement en cataracte (Bimbenet et al., 2002). Cascade et cataracte sont les types de mouvement à l'intérieur du broyeur (Fig. 21). Ces mouvements dépendent de la vitesse de rotation qui est plus au moins proche de celle dite critique (où les particules sont projetées contre les parois du cylindre - Fig. 21c). La vitesse critique est la vitesse minimale où le mouvement centrifuge commence et est définie habituellement comme  $42.3/(\text{racine du diamètre du cylindre})$  (Bernetat & Schönert, 1988).

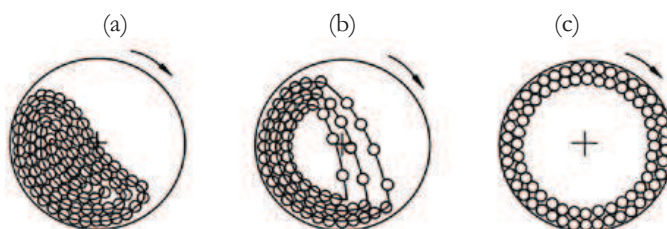


Fig. 21 Types de mouvement à l'intérieur d'un broyeur à boulets: (a) en cascade, (b) en cataracte et (c) centrifuge (Bernetat & Schönert, 1988).

### 3.1.5 Broyage à jet d'air

Un troisième type d'installation est celle des broyeurs ultrafins pouvant atteindre des tailles jusqu'à  $10\ \mu\text{m}$  voire moins ( $1\ \mu\text{m}$ ) selon le comportement du produit. Le mode de broyage est ici principalement par attrition, c'est à dire par abrasion des particules sur elles-mêmes et/ou sur les parties du broyeur. Le broyage à jet d'air est un procédé ultrafin (Fig. 22). Le produit est injecté dans une chambre. Trois buses d'air comprimé en opposition favorisent l'impact et l'attrition entre les particules ou sur une paroi. Cela permet d'atteindre au moment de l'impact des vitesses très supérieures à celles des mobiles tournants. Il faut une très forte recirculation du produit dans l'air, et un dispositif de sélection centrifuge (turbo séparation) qui ne laisse sortir dans l'axe que les produits fins, les grossiers séjournant dans l'appareil jusqu'à une réduction convenable (Bimbenet et al., 2002).

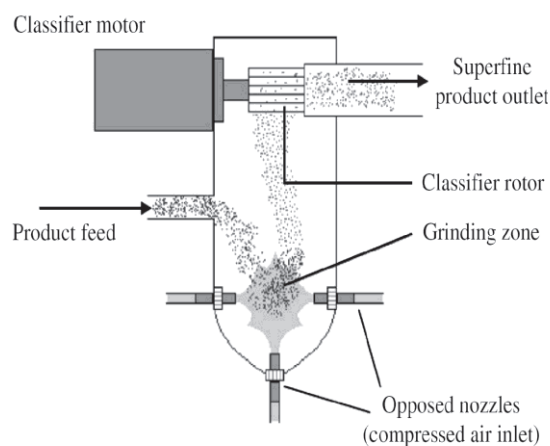


Fig. 22 Système de broyage à jet d'air (Hemery et al., 2007).

### 3.2 Broyage comme un prétraitement végétal et aspects énergétiques

Les études sur le broyage de la biomasse sont généralement rares en comparaison des études consacrées à d'autres matériaux. Récemment l'intérêt pour les études de broyages s'intensifient ce qui se traduit par la sortie de revues bibliographiques récentes portant sur le broyage de la biomasse (Miu et al., 2006; Müller, 2003; Temmerman, 2011; Vidal et al., 2011). De manière générale, les broyages de la biomasse étudiés peuvent être répartis en deux groupes : le premier porte sur des études à l'échelle pilote et le deuxième les études à l'échelle laboratoire. Les études plus poussées sur pilotes sont plus récentes (années 2000), les études en laboratoire sont plus anciennes, mais elles ont diminué autour des années 90 et apparemment l'intérêt du broyage trouve un regain d'intérêt avec des études plus récentes utilisant notamment les broyages à billes pour prétraiter la biomasse (Hideno et al., 2009; Inoue et al., 2008; Kawakubo et al., 2010; A.S.A. Silva et al., 2010; Zhu et al., 2009).

Deux équipes se distinguent parmi les autres par leur nombre de publications concernant le broyage de la biomasse à l'échelle pilote ainsi que sa consommation énergétique. La première est l'équipe du Dr. Alvin R. Womac du projet « *Integrated Size Reduction and Separation of Biomass Project* » (<http://biomassprocessing.org/index.htm>) de l'*University of Tennessee (Biosystems Engineering and Environmental Science)* aux USA avec des travaux récents sur les broyages à couteaux et à marteaux de la paille de blé, maïs et *switchgrass* (Bitra et al., 2009; Bitra et al., 2009; Chevanan et al., 2010; Igathinathane et al., 2008; Igathinathane et al., 2009; Miu et al., 2006). L'autre équipe est celle des Dr. Lope Tabil et Dr. Greg Schoenau à l'*University of Saskatchewan (Department of Chemical and Biological Engineering)* au Canada, leur travaux portent surtout sur le broyage et la pelletisation des pailles de blé, maïs, orge, *switchgrass*, entre autres, par le broyage à marteaux (Adapa et al., 2010; Adapa et al., 2011; Mani et al., 2004; Tabil et al., 2011). Néanmoins, d'autres études plus ou moins récentes ont été menées qui portaient sur le broyage pilote de la biomasse (Arthur et al., 1982; Cadoche & López, 1989; Esteban & Carrasco, 2006; Fang et al., 1997; Himmel et al., 1986; Kaliyan et al., 2010; Soucek et al., 2003; Vigneault et al., 1992). Tabil et al. (2011) ont récemment compilé les principaux résultats de broyages à marteaux et à couteaux de la biomasse ligno-cellulosique (Tab. 2).

Tab. 2 Résumé des études de broyage grossier de la biomasse ligno-cellulosique (tiré de Tabil et al., 2011).

Type of Grinders	Biomass	Parameters Measured and Correlations	Observations	Reference
Hammer Mill	Non-Treated and Steam Exploded Barley, Canola, Oat and Wheat Straw	- Hammer mill screen size (from 1.6 to 30.0 mm) on Specific Energy - Effect of geometric mean particle size on bulk density - Effect of geometric mean particle size on particle density - Analysis on ground particle size distribution	- Negative exponential and power correlation between geometric mean particle size with both bulk and particle density - Specific energy requirement is material dependent - Negative power correlation between hammer mill screen size and specific energy - Shapiro-Wilk Test for normality was performed	(Adapa et al., 2011)
Tub Grinder	Rectangular Wheat Straw Bales, Round Rice Straw and Corn Stover Bales	- Effect of screen sizes (from 12.7 to 50.8 mm) on Specific Energy - Effect of screen sizes on grinding rate - Analysis on ground particle size distribution	- Positive correlation between screen size and grinding rate - Positive correlation between tub rotational speed and grinding rate - Specific Energy is material dependent - Negative power/ exponential correlation between screen size and specific energy	(Arthur et al., 1982)
Hammer Mill	Wheat Straw and Corn Stover	- Effect of operating speeds (from 2000 to 3600 rpm) on Specific Energy - Effect of hammer angles (90 and 30 hammers) on Specific Energy - Analysis on ground particle size distribution - Effect of screen size (from 1.6 to 12.7 mm) on specific energy	- Geometric mean particle diameter decreased with an increase in hammer mill speed - Positive correlation between operating speed and specific energy - Specific energy increased with a decrease in hammer angle - Negative correlation between screen size and specific energy - Specific Energy is material dependent	(Bitra et al., 2009)
Knife and Hammer Mills	Hardwood Chips, Wheat Straw and Corn Stover	- Effect of screen size (from 1.6 to 12.7 mm) on specific energy	- Specific energy increased with a decrease in hammer angle - Negative correlation between screen size and specific energy - Specific Energy is material dependent	(Cadoche & López, 1989)
Hammer Mill	Red Winter Wheat Straw	- Effect of screen size (from 1.59 to 4.76 mm) on specific energy - Effect of feed rate (from 1.5 to 2.5 kg/min) on specific energy - Effect of screen size (3.2 and 1.6 mm) on Specific Energy - Analysis on ground particle size distribution	- Negative correlation was observed between screen size and energy - Feed rate did not have significant effect on specific energy - Negative correlation between specific energy and screen size	(Fang et al., 1997)
Hammer Mill	Wheat Straw	- Effect of screen size (3.2 and 1.6 mm) on Specific Energy - Analysis on ground particle size distribution	- Negative correlation between specific energy and screen size	(Himmel et al., 1986)
Tub Grinders	Round Bales of Corn Stover and Perennial Grasses	- Effect of screen size (from 19.1 to 127.0 mm) on Specific Energy - Effect of screen size on throughput - Effect of screen size on bulk and particle densities	- Negative correlation between screen size and bulk density - Positive correlation between screen size and particle density - Negative correlation between screen size and specific energy - Positive correlation between screen size and throughput	(Kaliyan et al., 2010)
Hammer Mill	Barley Straw, Corn Stover and Switchgrass	- Effect of Screen Sizes (3.2, 1.6 and 0.8 mm) on Specific Energy - Effect of Moisture Content (8% and 12% wb) on Specific Energy - Correlation between bulk and particle densities and geometric mean diameter - Analysis on ground particle size distribution	- Negative linear correlation between specific energy and hammer mill screen size at 8% mc - Quadratic correlation between specific energy and hammer mill screen size at 12% mc - Polynomial relations for bulk and particle densities with diameters	(Mani et al., 2004)
Hammer Mill	Oat Straw, Rattle Grass and Miscanthus	- Effect of Screen size (from 1.0 to 10.0 mm) on specific energy - Effect of moisture content on specific energy	- Negative power correlation between screen size and specific energy - Positive correlation between moisture content and specific energy; significantly higher specific energy is required at smaller screen sizes	(Soucek et al., 2003)
Hammer Mill	Corn Stover	- Effect of hammer thickness (6.4 and 3.2 mm) on Specific Energy - Effect of hammer thickness (6.4 and 3.2 mm) on Grinding Rate - Effect of hammer tip speed (54 to 86 m/s) on Specific Energy	- Negative correlation between hammer thickness and Specific Energy - Negative correlation between hammer thickness and Grinding Rate - Positive correlation between hammer tip speed and Specific Energy	(Vigneault et al., 1992)
Knife Mill	Switchgrass, Corn Stover and Wheat Straw	- Effect of rotational speed (from 250 to 500 rpm) on specific energy - Analysis on ground particle size distribution	- Positive correlation between rotational speed and specific energy - Screen size has significant effect on particle size distribution	(Womac et al., 2007)

De manière générale, les études utilisant le broyage à couteaux ou marteaux où les grilles variaient de 0.8 mm à 127 mm, ont été capables de transformer la biomasse en poudres grossières. La majorité des études récentes utilisent des grilles variant de 0.8 et 6.4 mm. Les poudres les plus fines produites par ces modes de broyage étaient de l'ordre de 200  $\mu\text{m}$  (pour la paille de maïs à 6% d'eau avec une grille de 0.8 mm) (Mani et al., 2004). Pour des grilles encore plus grossières (6.4 mm), on observe des tailles autour de 800 à 1000  $\mu\text{m}$  pour différentes matières premières. Ces broyages sont affectés par divers paramètres, notamment les configurations du broyeur (par ex. l'angle des marteaux), les conditions de broyage (vitesse de rotation et température), la matière broyée avec sa teneur en eau et son état (traitée ou pas traitée). L'énergie de broyage varie aussi selon ces paramètres (de l'équipement et du produit). Les énergies spécifiques (énergie nécessaire pour broyer une quantité de produit) de ces broyages ont varié entre 7 et 120  $\text{kW h. t}^{-1}$ . Cette large gamme est due d'une part aux différents produits broyés (la paille de maïs sèche semble être le plus facile à broyer et le moins énergivore ; le pin semblèrent être le plus difficile à broyer avec des énergies au tour de 115  $\text{kW h. t}^{-1}$  du fait de sa haute teneur en eau). D'autre part, ces résultats sont obtenus avec différentes grilles, vitesses de rotation et même teneurs en eau. Globalement, plus la grille est petite, plus le broyage est fin et énergivore. De même, des vitesses de rotations plus élevées entraînent des énergies plus élevées mais aussi une homogénéisation de la distribution granulométrique. L'abaissement des teneurs en eau favorise la réduction, ce qui se traduit par des particules plus petites et une consommation énergétique moindre. En particulier, le broyage de la paille de blé consomme entre 11 et 52  $\text{kW h. t}^{-1}$  pour des grilles entre 3.2 et 0.8 mm et des teneurs en eau de 8 ou 12 % (Mani et al., 2004). Selon Adapa et al. (Adapa et al., 2011), le hachage (« *chopping* ») de la paille de blé consomme  $\sim 2 \text{ kW h. t}^{-1}$  (15% teneur en eau, pour des tailles de coupe de 4.2 mm).

Les études en laboratoire sont plus nombreuses et certaines plus anciennes. La majorité de ces études a porté sur les broyeurs à bille ou des broyeurs utilisant une grille de sélection (à percussion) avec des mailles entre 0.5 et 0.25 mm. L'énergie des broyages dans ces études a été peu étudiée. Hiden et al. (2009) et Silva et al. (2010) ont déterminé l'énergie de broyage à disque par voie humide et du broyage à billes planétaire de la bagasse et de la paille de canne à sucre et de la paille de riz. Le broyage à disque consomme entre 0.4 et 5.4  $\text{MJ/kg}$  (111 à 1500  $\text{kWh t}^{-1}$ ) pour de 1 à 10 cycles de broyage pour la paille de riz. L'énergie de broyage à billes est estimée par sa consommation totale électrique ce qui la surestime fortement par rapport à l'énergie spécifique de broyage. On estime que l'énergie de broyage ne correspond qu'à une faible fraction (1-5%) de l'énergie totale utilisée (Bimbenet et al., 2002; Scholten & McEillhiney, 1985). Cependant, l'énergie proprement dite de broyage reste difficile à déterminer surtout dans les broyeurs de

laboratoire où l'énergie pour faire tourner l'appareil à vide est quasiment identique à celle de l'appareil en charge. Ainsi, Hiden et al. (2009) ont mesuré des énergies très élevées de broyage à bille de la paille de riz de l'ordre de 9 à 108 MJ/kg (2500 à 30000 kWh t<sup>-1</sup>) pour des temps de broyage de 5 à 60 min. L'énergie totale électrique de broyage à disque de la bagasse et de la paille de canne à sucre est estimée entre 11 et 48 MJ/kg (3060 et 13000 kWh t<sup>-1</sup>) pour de 10 à 20 cycles de broyage, où la paille apparaît comme plus difficile à broyer que le bagasse de canne à sucre (G.G.D. Silva et al., 2010).

Pour ces raisons, plusieurs revues bibliographiques portant sur le prétraitement de la biomasse concluent que le broyage fin n'est pas viable pour le traitement de la biomasse (Hendriks & Zeeman, 2009; Taherzadeh & Karimi, 2008).

Le degré de polymérisation, la cristallinité et la surface de contact (interne et externe) de la ligno-cellulose sont susceptibles d'être altérés lors de broyages selon les conditions opératoires, l'intensité et le type de broyage (lié au mode de fragmentation). Plusieurs études ont constaté que le broyage à billes engendrait une réduction de la cristallinité plus au moins importante selon la nature du produit (Rondeau-Mouro et al., 2003) et l'intensité de broyage (fréquence de rotation et temps de broyage) (Chang & Holtzapple, 2000; Hiden et al., 2009; Inoue et al., 2008; Millett et al., 1979; A.S.A. Silva et al., 2010). Ce mode de broyage apparaît comme le plus intéressant pour améliorer les rendements des bioconversions de la biomasse. Ces changements de cristallinité et l'augmentation de la surface spécifique (par la réduction de la taille) et peut être aussi d'autres changements dans la structure ligno-cellulosique (par ex. dissociation partielle des hémicelluloses) des produits a résulté en une augmentation importante de la réactivité de la biomasse vis-à-vis de l'hydrolyse enzymatique (Andren et al., 1976; Caulfield & Moore, 1974; Chang & Holtzapple, 2000; Gharpuray et al., 1983; Hiden et al., 2009; Inoue et al., 2008; Kawakubo et al., 2010; Millett et al., 1979; Moore et al., 1972; A.S.A. Silva et al., 2010; Zhu et al., 2009) et de l'hydrolyse acide (Millett et al., 1979; Sidiras & Koukios, 1989). De même, le broyage à disques en voie humide et le broyage à attrition en voie sèche ont été capables de réduire la cristallinité de la cellulose et ont mené à des améliorations lors des conversions enzymatiques (Hiden et al., 2009; Rivers & Emert, 1988; A.S.A. Silva et al., 2010).

Plus de détails sur les effets du broyage sur la structure des ligno-celluloses et leur bioconversions sont présentés dans les articles 3 et 4 du Chapitre V – Les bioconversions.

## **Conclusions du chapitre II**

La montée en puissance des bioraffineries se traduit par un besoin de procédés innovants, économes et efficaces. La disponibilité de la biomasse ligno-cellulosique offre une opportunité importante pour le développement de telles technologies. Tout le potentiel de transformation de cette matière n'est pas exploré notamment par des technologies alternatives à celles employées aujourd'hui, comme cela peut être le cas des broyages poussés. En s'appuyant sur l'expertise de l'INRA et en particulier de l'UMR Ingénierie des Agropolymères et Technologies Emergentes sur le fractionnement sec des produits céréaliers, nous nous sommes orientés vers le développement/application du broyage fin et ultrafin comme une étape pouvant s'insérer avec succès dans le schéma d'une bioraffinerie moderne.

# CHAPITRE III

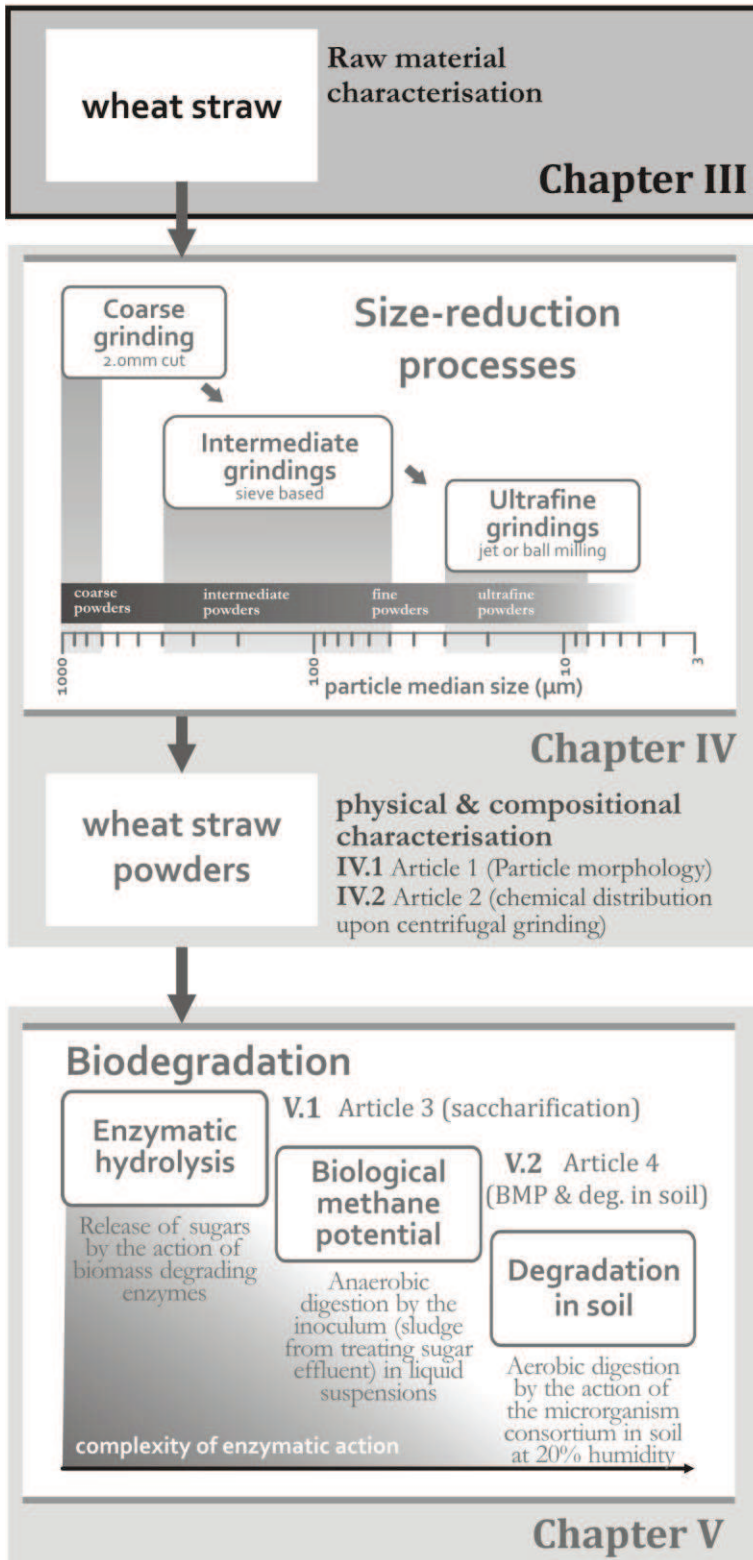
## CHARACTERISATION OF WHEAT

### STRAW

<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>49</b>
<b>2</b>	<b>Materials and methods.....</b>	<b>49</b>
2.1	Starting material .....	49
2.2	Composition of raw material .....	49
2.3	Microscopic observations.....	50
2.4	Grindability tests.....	50
<b>3</b>	<b>Results and discussion .....</b>	<b>50</b>
3.1	Composition of raw material .....	51
3.2	Composition of wheat anatomic parts –Macroscopic structure .....	52
3.3	Microscopic structure.....	54
3.4	Grindability of anatomic parts .....	56
	<b>Conclusions du chapitre III.....</b>	<b>57</b>



# Ultra-fine biomass processing





# III Characterisation of wheat straw

## 1 Introduction

L'objectif de cette partie de l'étude a été de caractériser notre matière de départ, la paille de blé. La composition de la paille est donc présentée en termes de composition biochimique (niveau moléculaire), composition en organes de la plante (niveau macrostructural) et structure histologique (niveau microscopique). Enfin, la broyabilité des différentes organes est présentée afin d'évaluer comment ces hétérogénéités macrostructurales peuvent affecter leur réduction.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Starting material

Squared-baled wheat straw (*T.aestivum* cv. Apache) was kindly provided by Fernand Meaux (St. Jean du Salès, Aveyron, France), harvested in 2007. It was received in squared packs. In the laboratory, these plant samples were hand-divided into 5 groups of anatomic parts: stem internodes, sheath (leaf), fermented stem and sheath, nodes and spikelet/chaff. Internode diameters were measured with a caliper in order to determine the diameter distribution of 550 internodes. For compositional analysis of wheat straw, it was first reduced using a cutting mill equipped with a 2 mm sieve (SM2000, Retsch, GE) and then, as necessary for biochemical analyses, using a centrifugal grinder (ZM200, Retsch, GE) equipped with a 0.5 mm sieve.

### 2.2 Composition of raw material

The cellulose and hemicellulose content of wheat straw was determined by gas-liquid chromatography (GLC) after prehydrolysis with sulphuric acid (26 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min at room temperature), hydrolysis (dilution to 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100 °C) and derivatisation as alditol acetates (Blakeney et al., 1983) using inositol as the internal standard. The alditol acetates were separated on a DB 225 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA). Cellulose content was calculated as the sum of anhydro-glucose and hemicellulose content, as the sum of anhydro-arabinose + anhydro-xylose.

Cell wall residues were the extractive-free fractions obtained by an adaptation of the Morrison's rapid extraction method (Chang et al., 2008; Morrison, 1972): approximately 1 g was soaked with 100 mL of 65 °C-deionised water for 30 min, filtered hot through a 0.7 µm glass-fibre membrane and washed with 200 mL of water then successively with 100

mL of ethanol, acetone and diethyl ether each. The cell wall residues were vacuum-oven dried at 40 °C for 48 h, weighed and conditioned in a vacuum desiccator over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> overnight prior to Klason-lignin analysis. Klason lignin of cell wall residue was determined as described by Monties (1984). Ash contents were determined at 900 °C until constant weight. Experiments were carried out in triplicates, at least.

The total C and N contents of the initial wheat straw were measured by elemental analysis (NA 1500, Fisons Instruments). The monomer composition of the ether-labile lignin fraction (*i.e.* uncondensed lignin fraction as  $\beta$ -O-4 linked monomers) was determined by thioacidolysis of the extractive-free fraction namely cell-wall residue. The cell wall (10 mg) was heated in 15 ml of dioxane: ethanethiol (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate for 4 h at 100 °C (Lapierre et al., 1986). Lignin monomer products *i.e.* the guaiacyl (G) and syringyl (S) moieties were analyzed by capillary column gas chromatography as trimethylsilyl derivatives. They were separated on a J&W DB-1 column (30 m long, 0.3 mm i.d.; 0.25  $\mu$ m film thickness) using a temperature gradient of 160–280 °C at 2 °C min<sup>-1</sup>. The carrier gas was helium at 60 kPa, detection was done by flame ionization and the internal standard was docosane.

## 2.3 Microscopic observations

Internodes, nodes and leaves were humidified for 2 days at 4°C with deionised water under vacuum in a desiccator. 50 and 100  $\mu$ m thick transverse sections were prepared with a vibratome Microcut H1200 (Bio-Rad, UK). These fresh sections were observed in a stereomicroscope MVX 10 (Olympus, JP) equipped to observe fluorescence (Optical objective x1,6, optical zooms x1 and x2).

## 2.4 Grindability tests

All anatomic parts were first comminuted using a cutting mill type SM2000 (Retsch, Germany) equipped with a 2.0 mm sieve. Then, they were ground using a laboratory-scale ball mill (~2 g sample, MM400, Retsch, Germany) for 2 min and 10 min.

Particle size was determined as the median diameter (d<sub>50</sub>) of distributions from 0.02  $\mu$ m to 2000  $\mu$ m using a laser diffraction particle size analyser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom).

## 3 Results and discussion

Harvested wheat straw was squared baled prior to reception and stored in an open shelter for the winter 2007 as usually practiced agronomically. When we received wheat straw, it was already partially fragmented/fractured as it can be observed in Fig. 23. Only

some wheat stems were still intact. These were manually selected in view of following characterisations: chemical composition, microscopic observations and grindability. For the global compositional analysis of wheat straw, it was ground as received.



Fig. 23 Wheat straw as received.

### 3.1 Composition of raw material

The composition of wheat straw is presented in Tab. 3. Cellulose was the major component of wheat straw followed by hemicellulose and lignin. Wheat straw hemicelluloses (arabinoxylans) were mainly linear (xylan chain) with few ramifications by the arabinose substitutions (0.15 ratio arabinose:xylose).

Tab. 3 Composition of wheat straw expressed as dry matters.

	Wheat straw
Total C (%)	45.7 ± 0.21
Total N (%)	0.6 ± 0.11
Ratio C:N	7 ± 1.3
Carbohydrates	
Cellulose (%)	32.0 ± 0.75
Hemicelluloses* <sup>1</sup> (%)	20.5 ± 0.45
Ratio arabinose:xylose	0.15 ± 0.00
Lignin	
Klason lignin (%)	17.4 ± 0.30
Uncondensed lignin* <sup>2</sup> (μmol/g Klason lignin)	910 ± 28
S units (μmol/g Klason lignin)	361 ± 14
G units (μmol/g Klason lignin)	505 ± 14
% H	4.6 ± 0.06
% G	55.6 ± 0.20
% S	39.9 ± 0.24
S/G	0.72 ± 0.01
Extractives (%)	9.5 ± 2.18
Ash (%)	6.1 ± 0.06

\*<sup>1</sup>Arabinoxylans were considered as total hemicellulose.

\*<sup>2</sup>Yield of lignin-derived thioacidolysis G and S monomers recovered from the cell-wall residue (after extractives removal); β-O-4 cross links.

### 3.2 Composition of wheat anatomic parts –Macroscopic structure

The anatomic compositions of wheat straw anatomic parts were published in the publication 2 which is placed in Chapitre IV - Size-reduction processes. Even though, the principal subject of this article was centrifugal grinding, a little part concerning the starting material was added in order to characterise it better. The paragraphs and the figure that are related to the present topic are copied here.

\*\*\* “*Anatomic composition of wheat straw*”

The composition of wheat straw is given in Tab. 3. Cellulose was the major component of wheat straw followed by hemicellulose and lignin. With respect to wheat plant parts (Fig. 24 at top) the stem internodes represented 36 % of wheat straw, followed by the fermented fraction composed mostly of internodes and sheaths. Nodes and spikelets were the minor anatomic components of straw.

The composition of each anatomic fraction is presented in Fig. 24 (bottom). In general, cellulose was the major component of each plant fractions followed by hemicelluloses and lignin. The most variable concentrations were proteins and ash contents. The internodes were the less concentrated in both components. It represented 36.2% of straw (yield) but only 21 % of total proteins of entire straw (protein concentration x fraction yield) and 15% of total ash (similar calculation). On the other hand, the fraction called “fermented” (parts which were impossible to identify as stem, sheath or dust) was visually darker and the richest in ash and proteins. This ash enrichment can be related to a partial environmental degradation of straw (light and humidity exposition).

Comparing stem internodes and sheaths, the higher ash concentration of sheath is probably due to its epidermal tissues which has high amounts of silica cells (Currie & Perry, 2007).

Separating the wheat straw into its anatomic parts – internodes, nodes and leafs, might be interesting in selecting particular characteristics, e.g. more easily hydrolysable/convertible fractions. For corn stover samples, fractions with high content of corn leaf were found to be more susceptible to hydrolysis by a cellulase (Chundawat et al., 2007). Moreover differences in soil decomposition of wheat parts were reported (Bertrand et al., 2006). The proportion of vascular tissues and sclerenchyma cells were the determinant factors in this degradability.” \*\*\*

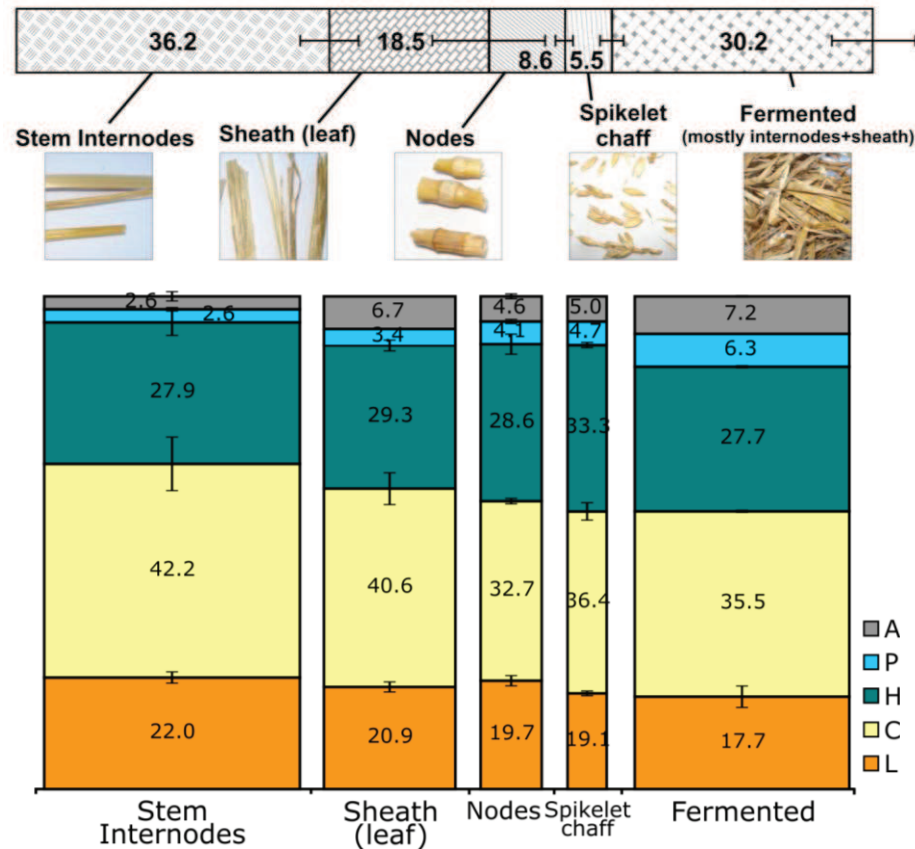


Fig. 24 Percent mass distributions of wheat plant parts (on top) and their biochemical compositions (at bottom, column widths are proportional to their fraction yields).

These results of the distribution between the biochemical composition are also in agreement with Haper & Lynch (1981) who verified that the highest ash content was that of leaves, the highest protein content was however exhibited for the nodes. The internode was also the richest in cellulose. They verified furthermore that the sugar released by enzymatic solubilisation followed the ranking established for the initial biochemical composition.

A large variability of size was observed within the group of internodes. The outer diameter distribution of 550 internodes is presented in Fig. 25. As this distribution exhibited a large peak from 1 to 5 mm diameter, it shows that our wheat straw sample was heterogeneous due probably to the presence of internodes from different positions in the wheat stems (the upper is the position of the internode in the stem axis, the smaller is its diameter).

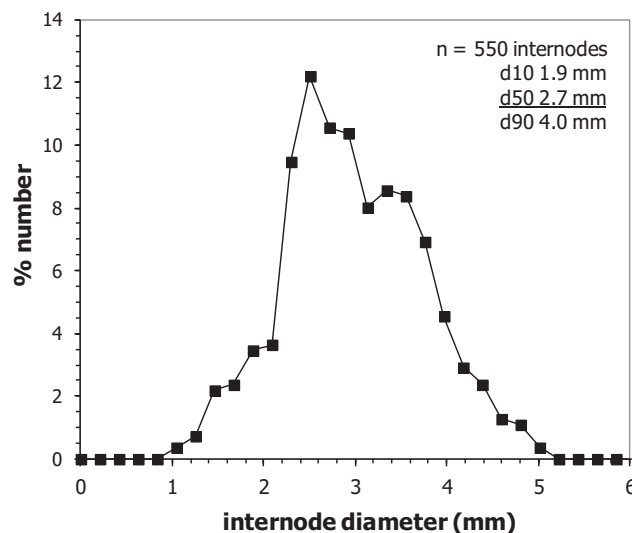


Fig. 25 Number distributions of wheat internode diameter.

### 3.3 Microscopic structure

The histological tissues composing the wheat straw anatomic parts (mainly nodes, internodes and leaves) are presented in Fig. 26. Their autofluorescence is related to phenolic components such as lignins and hydroxycinnamic acids (ferulic and *p*-coumaric acids). Similarly to internodes, nodes were varied also in diameter. Therefore, we present examples of the nodes, leaves and internodes even though other sizes were found within the wheat straw. At microscopic scale, each of these anatomic parts is naturally composed of several tissues such as epidermis, sclerenchyma, parenchyma, vascular bundles (xylem and phloem), fibres, with different spatial organisations. Their spatial locations were in agreement to those observed for *Poacea* organs (Graminae). As in all monocot stems, the vascular bundles are concentrated towards the outside. The leaf sheaths grow around the stem as a protection, thus the extremities of the transverse section are thinner than the middle of the leaf.

All tissues exhibited fluorescence unless the mesophyll of leaf sheaths and, as expected the parenchyma cells (which never become lignified), it shows that the plant was harvested after the lignification of almost all tissues. Furthermore, very thick cell walls can be observed for, in particular, sclerenchyma cells (near the epiderm) in each anatomic part especially in internodes. The comparison with wheat micrographs from the literature (Barry & Grenet, 1988; Bertrand et al., 2006) shows that our wheat straw was mainly from wheat at maturity stage, thus its cells were already very lignified (secondary cell wall very thick). Therefore, it can be expected that the behaviour upon grinding of these tissues would be overall more difficult than younger wheat and specifically different between the tissues presenting more or less lignifications or cell wall thickening (e.g. parenchyma *vs.* sclerenchyma).



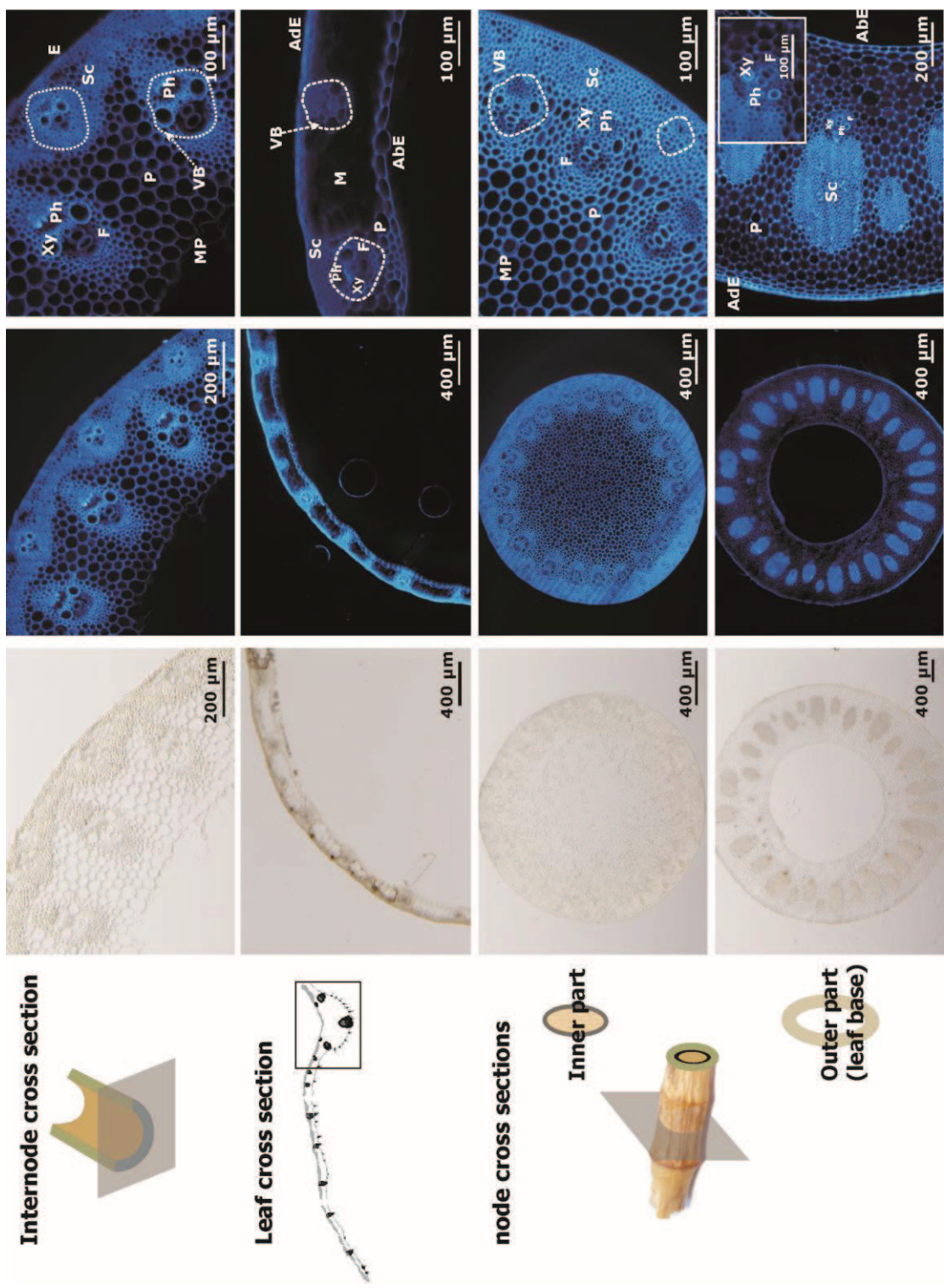


Fig. 26 Histology of wheat straw anatomic parts. E: epidermis; AbE=abaxial; epidermis; Ad,Sc=sclerenchyma; Ph=phloem; XY=xylem; F=perivascular fibers; P=parenchyma; M= mesophyll; MP=medullary parenchyma; VB=vascular bundle; E=adaxial epidermis.

### 3.4 Grindability of anatomic parts

In order to determine the differences in the behaviour of each anatomic part of wheat, the internodes, leaves and nodes (core + leaf base), were ground similarly for 2 min, representing a grinding mode where particle size reduces rapidly (slope), and 10 min which represents the final size that could be obtained (plateau). Differences in particles size exhibit more or less susceptibility to be ground. These results are present in Fig. 27.

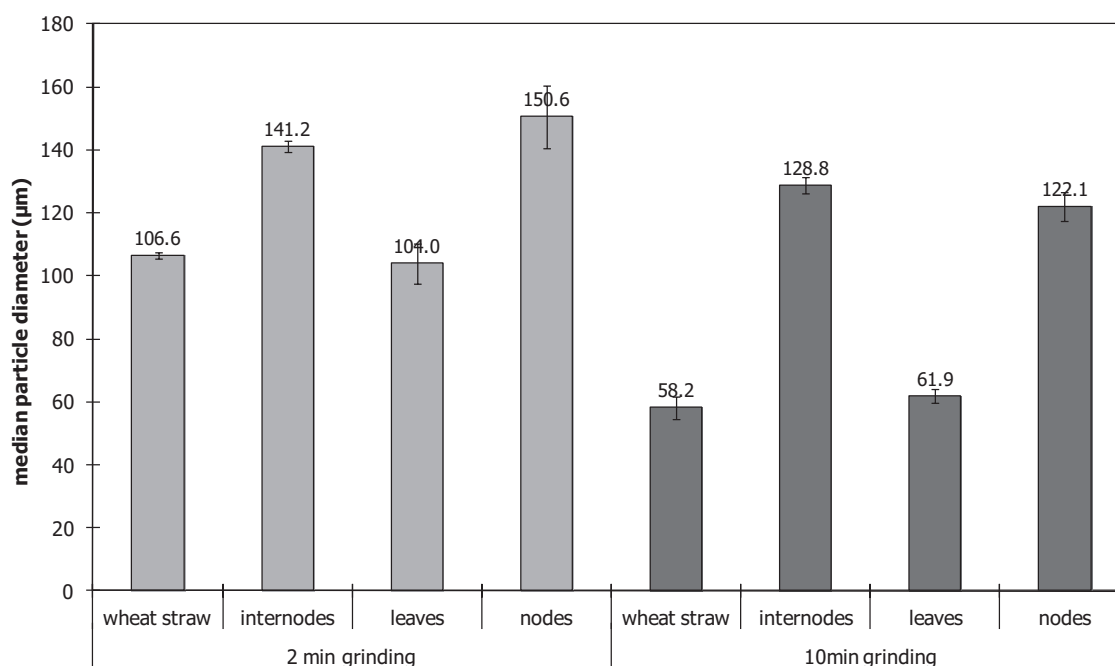


Fig. 27 Grindability of wheat-straw anatomic parts.

Generally, the behaviour upon ball milling (lab scale) of wheat parts are ranked similarly for 2 and 10 min grinding: the nodes are the most recalcitrant to be ground and the leaves, the less. These results are not directly related to the biochemical compositions owing probably to the few differences in the lignin and hemicellulose contents between these parts (less than 4 g lignin/ 100 g straw, less than 2 g hemicelluloses/g straw), cellulose however varied by 10 g cellulose / g straw but the grinding ability did not follow these increases (the nodes were the less cellulose concentrated, the internodes the most). The higher recalcitrance of nodes must be related to its compactness and double layer. In this part of the plant the leaves and nodes are highly attached to the leaf base and node core, both in the node structure. Furthermore, the macrostructure of leaves may also be responsible for its more easy grindability : it is more thin and more elongated. In addition, less sclerenchyma were observed in the leaves than in the other parts.



Interestingly, the behaviour of the straw ensemble was very close to that of leaves even though the latter represented only from 18 to 40 % of straw (considering leaf fraction only and leaf fraction + fermented fraction). It can be considered that the ensemble of part helped grinding by filling voids that must be created by grinding for instance only internodes. Thus, the ensemble of parts was further reduced than the parts individually ground.

### **Conclusions du chapitre III**

L'hétérogénéité de la paille de blé de cette étude a été présentée à plusieurs échelles. Au niveau macrostructural, la paille, composée majoritairement par des tiges et feuilles, a été reçue partiellement dégradée et fragmentée. Les parties anatomiques présentent des compositions biochimiques légèrement différentes surtout dans le cas de la cellulose. De plus, la broyabilité des ces parties est aussi différente et cela est davantage dû à leur structure microscopique et macroscopique qu'à leur composition biochimique.

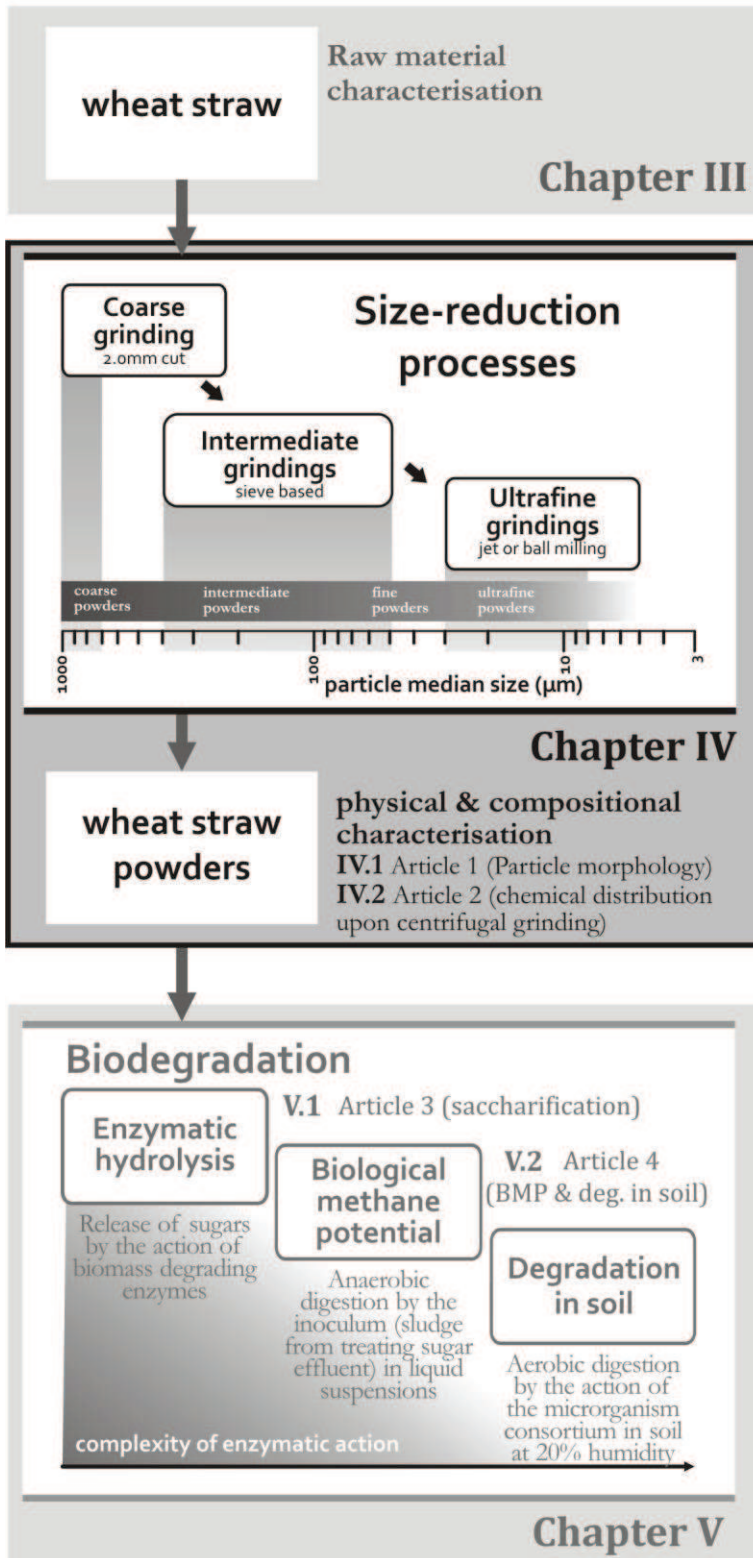


# CHAPITRE IV

## SIZE-REDUCTION PROCESSES

IV.1 Article 1: Morphological modulation of heterogeneous biomass powders by dry grinding .....	67
IV.2 Article 2. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw .....	95
IV.3 Note: Cryogenic grinding (intermediate steps) .....	105
Conclusions du chapitre IV .....	110

# Ultra-fine biomass processing



## IV Size-reduction processes

Les procédés de production de poudres ultrafines de paille ligno-cellulosique étant méconnus et quasiment nullement développés à ce jour, nous nous sommes basés d'une part sur l'expertise acquise au laboratoire sur le fractionnement du son de blé, et d'autre part nous avons aussi utilisé les données de la littérature sur les broyages considérés comme les plus performant pour augmenter la réactivité de la biomasse cellulosique pour établir des protocoles de broyages. Des procédés de broyage suivant trois modes ont été mis au point : les broyages utilisant une grille de sélection (le plus commun pour le traitement de la biomasse), le broyage à boulets (le plus performant théoriquement en termes d'amélioration de réactivité) et le broyage à jet d'air (une technique très utilisée dans le domaine pharmaceutique pour la production de poudres très fines). Le meilleur compromis a été trouvé pour l'obtention de poudres ultrafines par l'ajout d'une étape de broyage dite « intermédiaire » en utilisant un broyeur du premier groupe « à grille ». Selon le mode de broyage, les propriétés morphologiques peuvent changer de façon distincte. Le broyage est une opération mécanique complexe qui entraîne plusieurs types de contraintes mécaniques sur le matériau. Quand il est associé à cette matière complexe, la paille de blé (cf. Chapitre III), il produit naturellement une variabilité morphologique considérable. De même, les composés biochimiques se trouvent être distribués aussi de façon non homogène dans les différentes particules résultant du broyage.

Dans ce contexte, l'objectif de cette partie est de présenter les procédés de broyage utilisés et leurs effets sur la morphologie des particules (article 1), et sur la distribution des composés biochimiques au sein des broyages (article 2). Une troisième partie est présentée sous forme d'une note qui concerne le cas particulier de l'utilisation de la cryogénie appliquée à un broyage à grille de sélection.

### Grinding methods

The grinding experiments carried out in the present work were performed in multistep diagrams. Fig. 50 illustrates the strategy used to grind wheat straw. For all tested processes, wheat straw was preliminary reduced by cutting milling. Three types of grindings were tested: sieve-based grindings, ball and air-jet millings. In order to produce ultra-fine powders ( $<20\mu\text{m}$ ), suitable grinding conditions were obtained by carrying out an intermediate step of sieve-based grinding prior to ball milling or air-jet milling. The moisture content of wheat-straw was naturally at 8 % (w.b.) before grinding experiments.

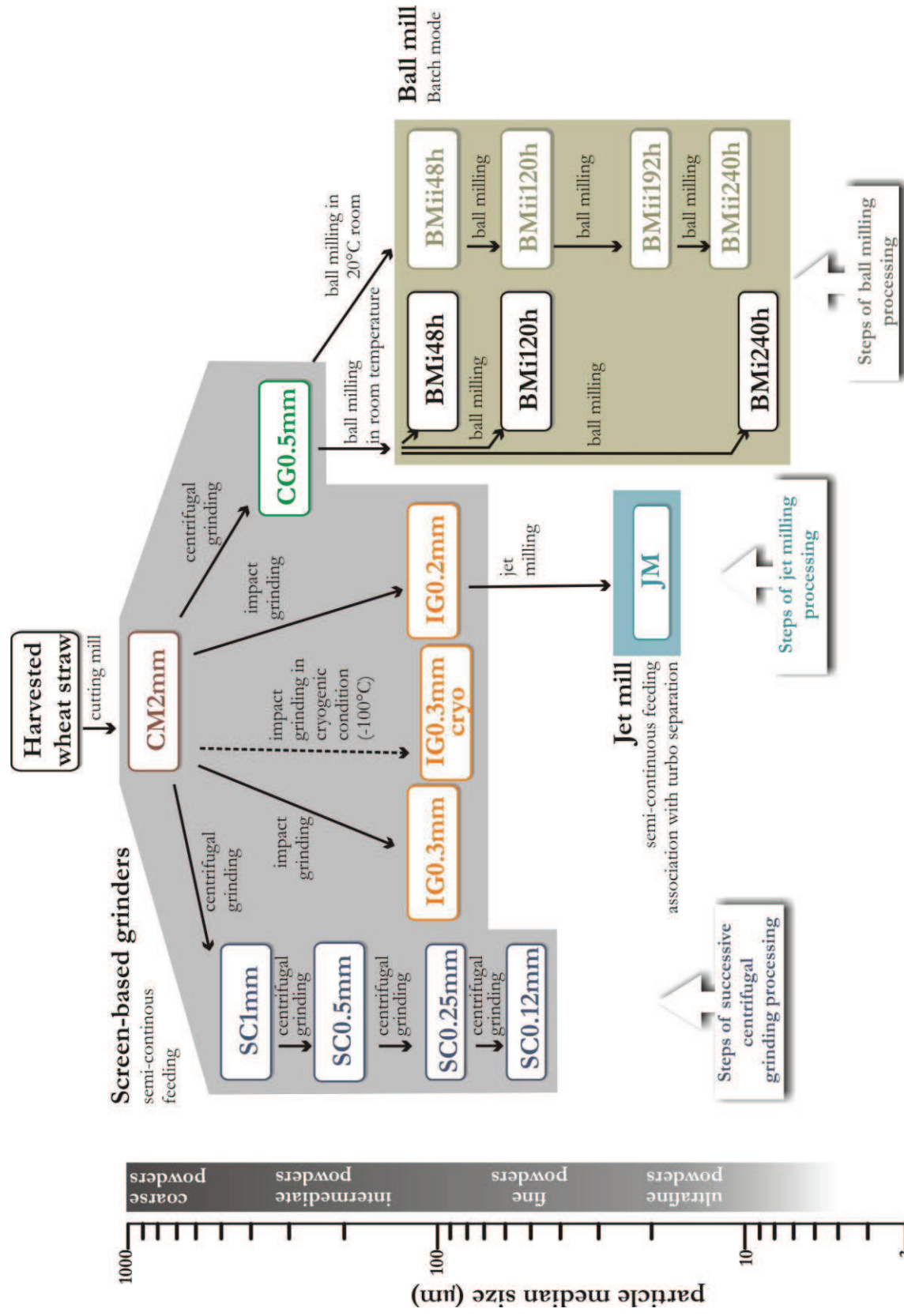


Fig. 28 Grinding wheat straw: diagrams of sample production and sample names.

## ➤ Sieve-based grindings

**Preliminary size reduction using a cutting mill:** Before all other grinding experiments, wheat straw was comminuted using a cutting mill type SM2000 (Retsch, Germany) with a 2.0 mm sieve, giving a sample called CM2mm.

**One-step centrifugal grinding** was carried out with a centrifugal grinder type ZM200 (Retsch, Germany) equipped with a 0.5 mm sieve (trapezoid holes), a rotor with 12 teeth, and output recovery by a cyclone module. To maintain centrifugal speeds and to minimize heating effects a suitable compromise was obtained operating at 12 000 rpm of rotation speed (62 m/s peripheral speed).

**Successive centrifugal grindings** were carried out with the same equipment as used for one-step centrifugal grinding (Retsch ZM200). CM2mm was reground successively with the 1 mm, 0.5 mm, 0.25 mm and 0.12 mm sieves are here abbreviated as SC1mm, SC0.5mm, SC0.25mm and SC0.12 mm.

In **impact grinding** experiments, CM 2mm was ground on a impact mill type 100 UPZ (Hosokawa Alpine, Germany), operated at 18000 rpm and equipped with a selection sieve (trapezoid holes), a 8-teeth rotor and an output recovery by cyclone associated with an aspirator. Two operating conditions were tested in varying sieve size and grinding temperature. The samples called IG0.2mm and IG0.3mm were ground at room temperature with a 0.2 mm and 0.3mm sieves, respectively. In order to make the WS more brittle, a cryogenic screw feeder with liquid nitrogen supply (Micronis, France) was combined to the UPZ 100 equipped with a 0.3 mm sieve. The temperature of the ground product (IG0.3mm cryo) was monitored during grinding and was adjusted at -100°C by varying the flow of liquid nitrogen. The impact grinding principle is similar to centrifugal grinding one; however, three differences on basic operating conditions can be pointed out: 118 m/s peripheral speed, 8 rotor teeth and the association of the aspiration module, which is used to favour input feeding and to avoid clogging.

## ➤ Ball milling

A ball mill type Marne 0 (Faure Equipments, France) was used to further grind CG0.5mm. An 8L jar, made of porcelain, was used and filled with porcelain balls (grinding media) at 25 % jar internal volume and with CG0.5mm at 50 % jar internal volume (1.2 kg straw). 25 and 19 mm -diameter balls (1:1 each diameter balls) were used from time 0 to 120 h milling time, thereafter grinding media was replaced by 7 and 9 mm -diameter balls (1:1 each diameter balls) until 240h milling time. This protocol was established to optimise milling time and reduce grinding media contamination (controlled

by ash content: an increase of 0.3 g ash/100 g d.m. was considered as acceptable). The temperature of the whole ball-milling system stabilised at  $40\pm 3$  °C in a 20 °C-tempered room. Two different procedures were performed for ball milling experiments. On the first one (BMi), grindings were performed separately for 48, 120 or 240 h without sampling (opening the jar). On the procedure (BMii), samples (10 to 15g) were taken each 24h until the end at 240h.

Since ball milling was carried out in batch mode, the reproducibility of series ii were verified in triplicates. The coefficients of variation of the resulting particle sizes were less than 10% between each sampling.

### ➤ **Air-jet milling**

The IG0.2mm (~1.4 kg) was ground in an air-jet mill type 100 AFG (Hosokawa Alpine, Germany). Jet milling experiment was carried out at room temperature, for 85 min with a product feeding of 1.1 kg/h. Air jets were made using compressed air at 6 bar.

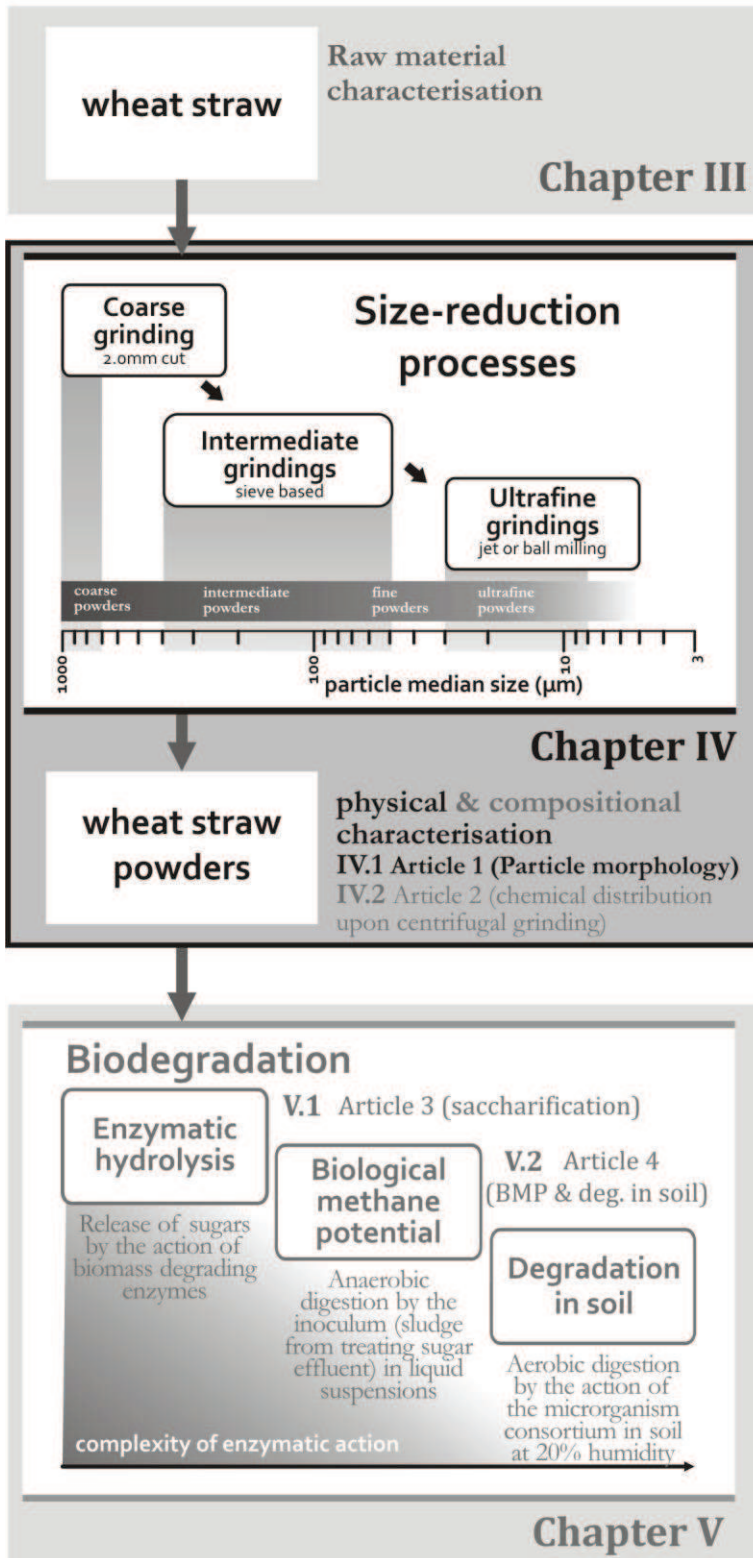


## CHAPITRE IV.1

# ARTICLE 1: MORPHOLOGICAL MODULATION OF HETEROGENEOUS BIOMASS POWDERS BY DRY GRINDING

Abstract.....	95
Graphical abstract.....	95
Keywords.....	95
1 Introduction.....	96
2 Experimental.....	97
2.1 <i>Sample preparations</i> .....	97
2.2 <i>Compositional analyses</i> .....	98
2.3 <i>Microscopic observations</i> .....	99
3 Results and Discussion.....	99
3.1 <i>Anatomic composition of wheat straw</i> .....	99
3.2 <i>Behaviour of the major straw components upon centrifugal grinding</i> .....	100
3.3 <i>Distribution of major components in fine straw powder</i> .....	102
Conclusions .....	103
Acknowledgements .....	104

# Ultra-fine biomass processing



## **IV.1 Article 1: Morphological modulation of heterogeneous biomass powders by dry grinding**

Gabriela Ghizzi D. Silva, Xavier Rouau, Abdelkrim Sadoudi, Cécile Barron. *In preparation.*

### **Keywords**

Multiblock analysis, Lignocellulosic powder, Particle size distributions, Dry grinding, Image analysis, Micronisation, Pulverization.

### **Abbreviations**

MCoA: Multiple Co-inertia analysis ; PCA: principal component analysis ; CC: common component ; PC: principal component ; Deq: equivalent diameter ; Fmax: max Feret diameter ; Ci: circularity ; Cv: convexity ; E: elongation.

### **1 Introduction**

Lignocellulosic biomass is a potential material resource for bio-based energies, composite materials and chemicals. Wheat straw is a by-product of cereal production, available annually in considerable amounts, which can be considered as a model of renewable lignocellulosic stock.

Wheat straw is structured differently at several levels. At macroscopic scale, it is composed of different anatomic parts of wheat plant (mainly nodes, internodes and leaves). At microscopic scale, each of these anatomic parts is composed of several tissues such as epidermis, sclerenchyma, parenchyma, vascular bundles, fibres, with different spatial organisations. Furthermore, from ultrastructural level to a molecular level, cell-walls comprise a series of concentric layers. The more external layer is the middle lamella between adjacent cells, then the primary cell-wall and the secondary cell-wall (the inner side of the cell). These cell wall layers are composed of partly crystalline cellulose fibres embedded in an amorphous hemicellulose/lignin matrix. Chemical heterogeneity of lignocellulosic biomass is then observed at different levels : plant species (Sánchez & Cardona, 2008), plant anatomic parts (Bertrand et al., 2006; Chundawat et al., 2007), plant tissues (Bertrand et al., 2006), cell wall layers (Lequart et al., 2000; Musel et al., 1997) and finally at the molecule assembly level. Therefore, the lignocellulosic composition varies considerably affecting biomass processability for end utilisations.

Dry grinding is a very common mechanical step which takes place between harvesting and further processing of lignocellulosic biomass. Applying grinding to comminute biomass is important because particle sizes and shapes may affect strongly their reactivity. Grinding biomass allows the fragmentation of the structures by either

dissociating tissues or breaking cells and cell walls depending on breaking mechanism and intensity (energy input). Furthermore, grinding can also promote internal changes in the macromolecular structure of the lignocellulosic matrix (e.g. reducing cellulose crystallinity) (Chang & Holtzapfle, 2000; Vidal et al., 2011). Grinding reduces particle size by several types of mechanical stress such as impact, shearing, attrition etc. Often, different types of breaking mechanisms occur inside the grinding chamber simultaneously. The result is affected both by grinding conditions but also by the behaviour of the product being ground. Therefore, the produced particles exhibit different characteristics depending on their origin, composition and the mechanical stress they were submitted. Understanding the grinding mechanisms and their relations with the characteristics of the biomass powders produced is challenging.

The objectives of this work are (i) to apply advanced grinding diagrams to wheat straw (from coarse to fine and ultrafine grindings); and (ii) to develop a novel approach to determine morphological characteristics of biomass powders by image analysis; (iii) to understand the relation between mechanical processes and biomass particle morphologies.

## 2 Strategy

Since lignocellulosic powders particles are fibre-like shaped thus non-spherical (Sánchez & Cardona, 2008; Zhu et al., 2009), two-dimensional analyses were previously applied by static image analysis (Dresbøll & Thorup-Kristensen, 2005) or in wet flow analysis (Zhu et al., 2009). As we aimed to produce ultrafine particles, the characteristics of fines (smaller particles within a given powder) were very important in order to follow the destination of particles upon grinding. On the other hand, observing the bigger particles gives information related to the overall behaviour of these powders, and especially on structures that more resist the grinding stress. Therefore, the image analysis of ultra-finely ground biomass must be able to describe both particle populations which need a good resolution of image and optimal magnification. As biomass powders are highly heterogeneous, the number of particles to be analysed is high (at least a thousand for wheat flour and semolina powders (Saad et al., 2011)). Therefore, automated methods reduce the time consumption to treat images and then to process their associated high amount of data (several size and shape descriptors for a high number of particles) (Pons et al., 1999). Ideally, an automated acquisition should be implemented as well, even in a second time. Probability distributions are an alternative to describe these results (*i.e.* classification of results by their frequency weightings within a given interval) (Tinke et al., 2005). Nevertheless, biomass powders exhibit distributions which do not follow normal law due to their heterogeneity of particles (Adapa et al., 2011). Even though, usually, these distributions are still reduced to discrete values as cumulative undersize centiles (Pye & Blott, 2004; Tinke et al., 2005), however, the resulting discrete values do not consider the

variability within a powder. An alternative to take into account all the variability of particles is using statistical tools, especially chemometrics tools, such as principal component analysis for one distribution (several samples) (Pons et al., 1999) or multiblock analysis when considering several groups of results (e.g. several distributions of size and shape descriptors). In this way, the ensemble of distributions is considered to make a global comparison of samples and particle populations (smaller vs. bigger ones). Multiple co-inertia analysis (MCoA), a multiblock statistical analysis, was successfully applied to ordination study in ecology (Dolédec & Chessel, 1994), or to manage high data set in genetic or metabolomics studies (Culhane et al., 2003; Mazerolles et al., 2011). This method allows the identification of trends and co-relationship in K tables and could be applied to datasets where the number of variables exceeds the number of samples.

### **3 Materials and methods**

#### **3.1 Raw material**

Wheat straw (*Triticum aestivum* cv. Apache) was kindly provided by Fernand Meaux (St. Jean du Salès, Aveyron, France), harvested in 2007. The moisture content of wheat-straw was naturally at 8 % (w.b.) before grinding experiments.

#### **3.2 Grinding methods**

The grinding experiments carried out in the present work were performed in three multistep diagrams as described in Silva et al. (published in Article 3-Chapitre V.1 but also the Grinding methods section in this chapter). Fig. 50 illustrates the strategy used to grind wheat straw. For all tested processes, wheat straw was preliminary reduced by cutting milling. Three types of grindings were tested: sieve-based grinding, ball and air-jet millings. In order to produce ultra-fine powders (<20  $\mu\text{m}$ ), suitable grinding conditions were obtained by carrying out an intermediate step of sieve-based grinding prior to ball milling or air-jet milling.



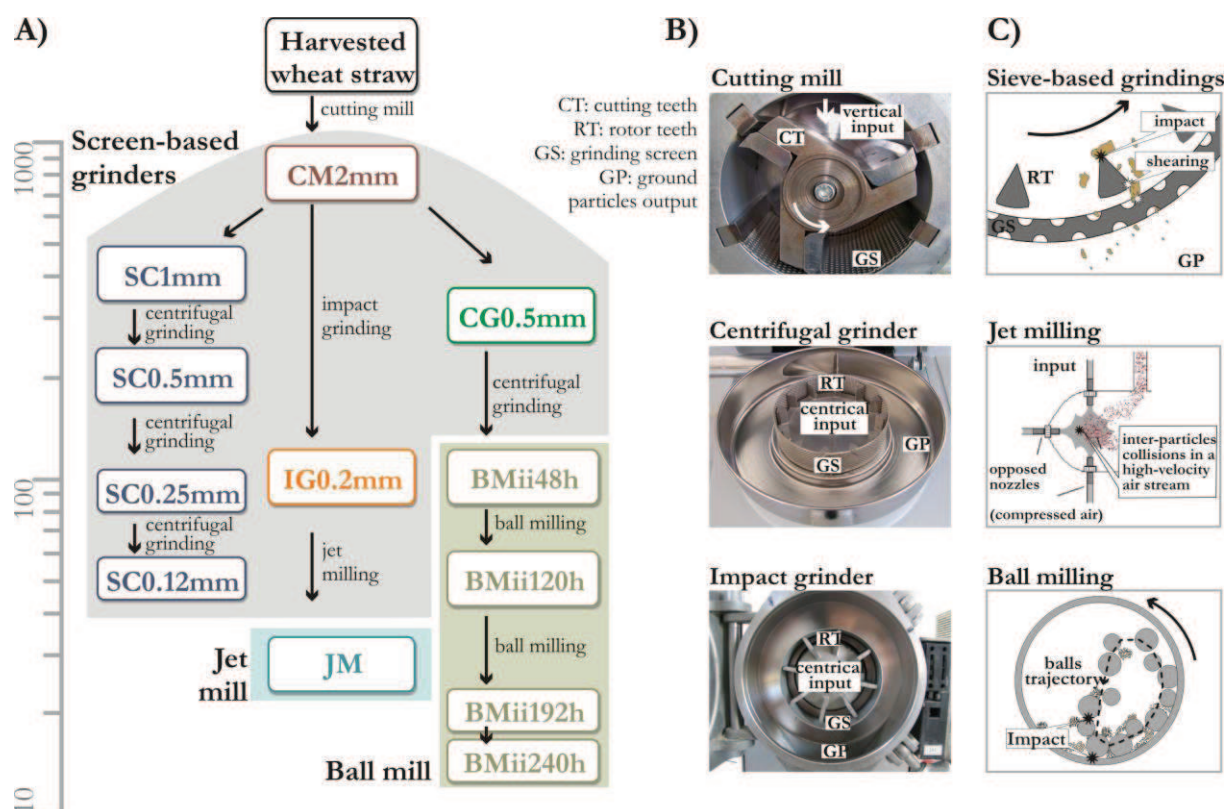


Fig. 29 Morphological modulation of wheat straw powders : A) processing diagram and sample names, B) details of sieve-based grinders, and C) breaking mechanisms of particles during the studied processes.

### 3.3 Particle size measurements by laser diffraction

Particle size distributions were determined from 0.02  $\mu\text{m}$  to 2000  $\mu\text{m}$  using a laser diffraction particle size analyser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Wheat-straw powders were suspended in ethanol directly in the measurement cellule, the suspensions were analysed when the obscuration was between 10 to 20%. No sonication was applied as it was preliminary determined to increase particle agglomerations. For wheat straw, it was found that sonication had an aggregation effect on particles (Pye & Blott, 2004). This was verified by an increase of measured particle size after applying sonication at several degrees. At least two analyses were carried out by sample. This technique allows measurements to be rapidly (5 to 10 minutes) carried out.

### 3.4 Morphological analyses by image analysis of microscopic views

Four main steps were carried out for morphological analysis of wheat-straw particles. At first, wheat straw powders were stained in order to increase the particle contrast, especially for transparent particles, using a histological stain for cell walls. Then, they were mounted in a viscous media in order to obtain well-isolated particles and a static dispersion under the microscope objective.

Second, for image acquisitions, magnifications were chosen in order to keep a good resolution of small particles. Consequently, bigger particles were more susceptible to be

ignored during the next step, the image treatment, as any particles touching an image edge would be discarded. To lessen this effect, large 4x4 images were assembled (mosaic images) increasing then the slide acquired area (more particles considered). Furthermore, since different particle sizes were present in wheat straw suspensions, different focal planes (depths in the Z axis) were possible. Therefore, an overall simple focus adjustment was not possible. To allow the analysis of particles of all sizes, several images were taken with different focal planes and a resulting image was created by selecting the sharpest pixel between the Z image series.

The third step, image treatment, was developed in order to circumvent the difficulties related to the presence of transparent (very thin particles) and well contrasted particles (dense or thick particles, more lignified structures) in the same image. To do so, an association of two techniques was implemented: the sum of edge detection and the direct threshold which is more conventional in image treatment.

The fourth step was data processing where the results of the images from the same sample were assembled. Since a large quantity of data was created (data from 2 000 to 20 000 particle), an automated software was implemented in order to process these amount of results rapidly.

The experimental details of these four steps are detailed in the following subsections.

### **3.4.1 Staining and mounting**

Approximately 20 mg of wheat straw samples were stained with 0.5 mL of Toluidine blue (1% in ethanol/water 50:50) in a 50 mL Falcon tube. The tubes were agitated for 20 s in a vortex mixer in order to disaggregate any lumps and then kept for 5 min (staining time). Four rinsing steps were carried out successively by completing the tubes until 45 mL with ethanol at different concentrations (2x at 50% then 2x at 95%), strongly agitating, centrifugating (4800 rpm for 2 min, room temperature) in a 3K10 centrifuge (Bioblock Scientific, Sigma, GE) and the supernatant was aspirated carefully to avoid any particle loss. After rinsing, 1.5 mL glycerol was added and the tubes were vortex mixed for 20 s. The residual ethanol was evaporated overnight (16 h) in the fume hood at room temperature. When necessary, in case of stuck bubble within the particle structure (verified by floating particles, especially for coarse particles), vacuum (twice for 1 min) was applied in desiccator to drive out these bubbles. The suspension concentrations were then adjusted sample by sample by adding glycerol or removing supernatant in order to obtain an image where particles were well isolated (without any overlapped particles) after mounting. CM2mm and SC1mm did not need to be stained as with their magnification under the microscope observation(x8), all particles were well contrasted.

When particles were very thick, placing the cover slip was not possible. For these cases (sample with coarse to intermediate particle sizes), handmade slides (cells) were prepared in order to make a support for the cover slip increasing the volume of analysed suspensions. The widths where the glycerol suspensions were dropped in were 35  $\mu\text{m}$  or 1 mm depending of sample particle sizes (given by the support thickness).

### 3.4.2 Image acquisition for morphological analysis

Images were acquired using a DS-Ri1 camera (colour mode RGB, 16 bit per channel, 1280 x 1024px) mounted on a AZ100 microscope (Nikon, JP) (magnifications from x1 to x40) in light transmission mode equipped with two optical lens (x1 and x5), smoothed multizoom system (x1 to x8) and motorised stage (x, y movements).

White balance and background corrections (necessary especially for bigger magnifications, more shading) were carried out to obtain a background with 8-bit values ranging between 180-190 for all channels (red, green and blue). The Z series images were taken with 15 or 17 images of each slide position (x, y) in different focal planes (different Z position, from the highest possible sharp object to the lowest one). An “Extended focus” image was then created by selecting the sharpest pixel between the different focal planes images using the algorithm within the imaging software NIS-Elements (Ar v3.2, Nikon, JP). The same software was used to assembly a square of 4 x 4 images acquired at different x,y-positions into a (mosaic) large image (4544 x 3634 px). A reference stage was used for pixel calibration for each magnification. At least 5 mosaic images were taken by each sample which were equivalent to 7.0 x 5.6, 3.8 x 3.0, 1.9 x 1.5 and 1.4 x 1.1 mm for the magnifications: x8 (optic x1 & zoom x8), x15 (optic x5 & zoom x3), x30 (optic x5 & zoom x6) and x40 (optic x5 & zoom x8), respectively. Magnifications were chosen depending on particle size (median and 90<sup>th</sup>-percentile values of volume-based distributions) measured by laser diffraction.

### 3.4.3 Image treatment

Image processing was adapted on methods described by (Pons et al., 2002; Pons et al., 1999; Saad et al., 2011). An image processing software (image treatment + data processing) was developed on Labview (7.0) platform using IMAQ Vision module 8.2 (National Instruments, USA) and is schematized in Fig. 31. Images were treated individually as illustrated in Supplementary fig. 1 (subroutine on Labview platform, page 91) and Supplementary fig. 2 (illustrations of each image treatment steps, page 92). Each image was treated in three steps before binarisation: first, the strengths of particle edges were enhanced (Sobel edge detection high-pass filter associated to look-up pixel value conversion table and Gaussian smoothing low-pass filter). In the second step, the contents of the projected particles were highlighted (look-up table and Gaussian



smoothing filter). In the third step, both highlighted steps were summed and then finally thresholded to obtain a binary image. A series of mathematical morphologic operations were then carried out: border killing, filling holes, debris removal (removing particles with less than 25 px<sup>2</sup>) and particle measurements.

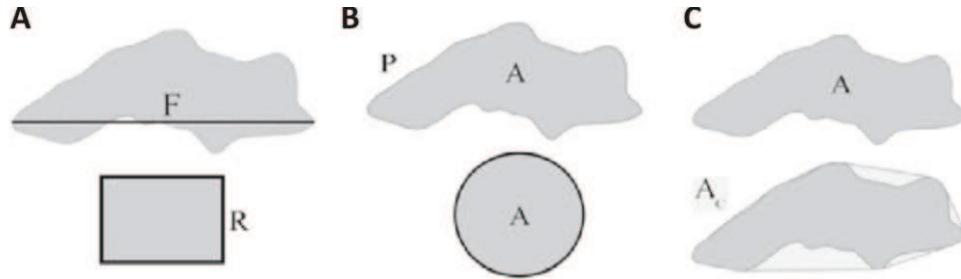


Fig. 30 Shape descriptor definitions. Dimensions used for calculating the A) elongation, B) circularity and C) convexity of particles (Saad et al., 2011).

Particle dimensions were measured by their area (A), perimeter (P) and max Feret diameter (Fmax, maximum axis inside the particle). The particle size was here expressed as equivalent diameter which is the diameter of a circumference with the same area. Furthermore, three shape parameters were calculated in order to describe the 2d-projected particle images: elongation (E), circularity (Ci) and convexity (Cv). Their calculations and dimensions are presented in Fig. 30 and Tab. 4.

Tab. 4 Macroscopic shape descriptors as illustrated in Fig. 30.

Descriptor	Formula	Comments
Elongation (E)	$\frac{E}{R}$	max Feret diameter divided by equivalent rectangle short side (rectangle with the same area as the particle with Fmax as its length); more elongated is the particle, bigger is E (far from 1).
Circularity (Ci)	$\frac{P}{2 \cdot (\pi \cdot A)^{0.5}}$	perimeter divided by the circumference of a circle with the same area; the closer the shape of a particle is to a disk, the closer the Ci is to 1.
Convexity (Cv)	$\frac{A_c}{A}$	area of the smallest convex polygon containing all points in the particle divided by the particle area; more convex is the particle, the closer Cv is to 1.

### 3.4.4 Data processing

The main routine of image treatment and data processing is presented in Fig. 31. After image treatment subroutine, two parallel data processing were done: 1) the variations of the particle area as their average and standard deviations were plotted as a function of increasing of analysed particles as proposed by Pons et al. (2002). The number of analysed particles varied from 2200 to 20500 particles depending on the analysed sample. For all samples, the quantity of particles were enough to well represent the powders (average and standard values stable). 2) Finally, the results of morphological characterisation were processed in order to classify the results by the particle frequency (number-based distributions) and the proportion of particle area (area-based distributions) within a given characteristic interval.

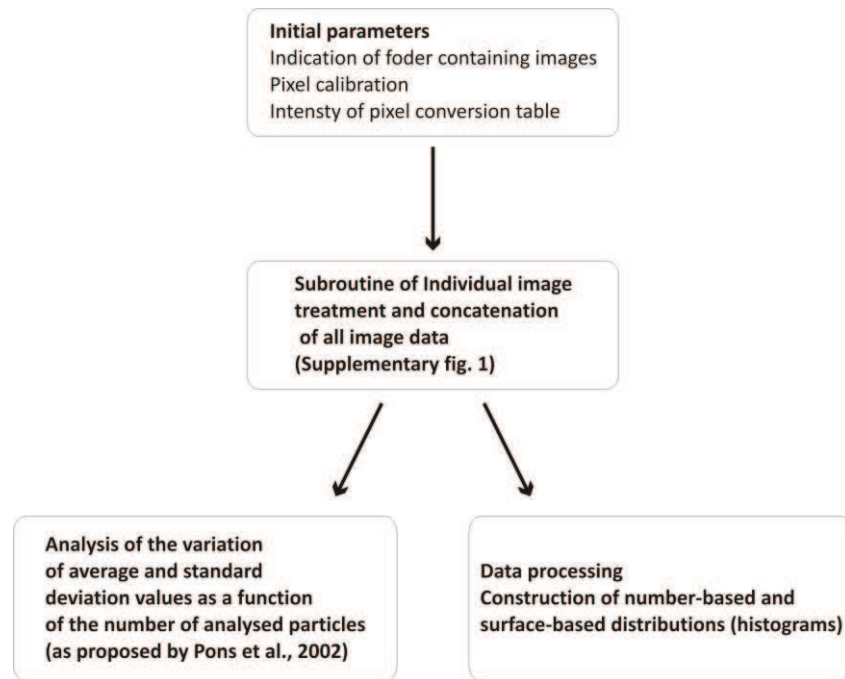


Fig. 31 Main routine of image analysis and data processing developed on Labview platform (7.0, National Instruments, USA).

### 3.5 Multiblock statistical analysis - Multiple co-inertia analysis (MCoA)

Multiple co-inertia analysis (MCoA) is an exploratory analysis that allows identifying trends and co-relationship in  $K$  tables describing the same samples (in rows) with different sets of variables (in columns). The mathematical principles were described by Chessel and Hanafi (1996) who extend the co-inertia analysis previously applied to two tables (Dolédec & Chessel, 1994) to  $K$  tables. MCoA relies on the basis that there are common structures within tables which could be highlighted in a compromise map. Individual PCA are given from each tables and could be interpreted individually. The compromise is obtained by finding successive orthogonal axes with maximization of the squared covariance (total co-inertia) between common component of the compromise and block latent variables of each individual PCA. The overall similarity was measured by the RV coefficient (Robert & Escoufier, 1976) which is calculated as the total co-inertia divided by the square root of the product of the squared total inertias from the individual (Culhane et al., 2003).

This method was first applied to compare particle size distribution given by two different methods (image analysis *vs.* laser diffraction) on 12 samples. In a second step MCoA was used to explore the variability within morphological distribution parameters on the same 12 samples, leading to the analysis of 10 tables with different size. Each table

was pondered by the square root of total inertia. MCoA was performed with Matlab R2010b (Mathworks Inc. Natick, MA) software using SAISIR package (Bertrand, 2008)<sup>1</sup>.

## **4 Results**

The results are presented in 3 parts: at first, we comment the general aspects and particle morphologies of wheat straw powders. Then, a comparison of both techniques (image analysis and laser diffraction) to determine particles size as their equivalent diameter is done by MCoA. The third part concerns the morphological analysis considering all size and shape descriptors by MCoA. Finally, in the discussion section, some hypotheses are proposed on the grinding breaking mechanisms issued from the MCoA of image analysis morphological data.

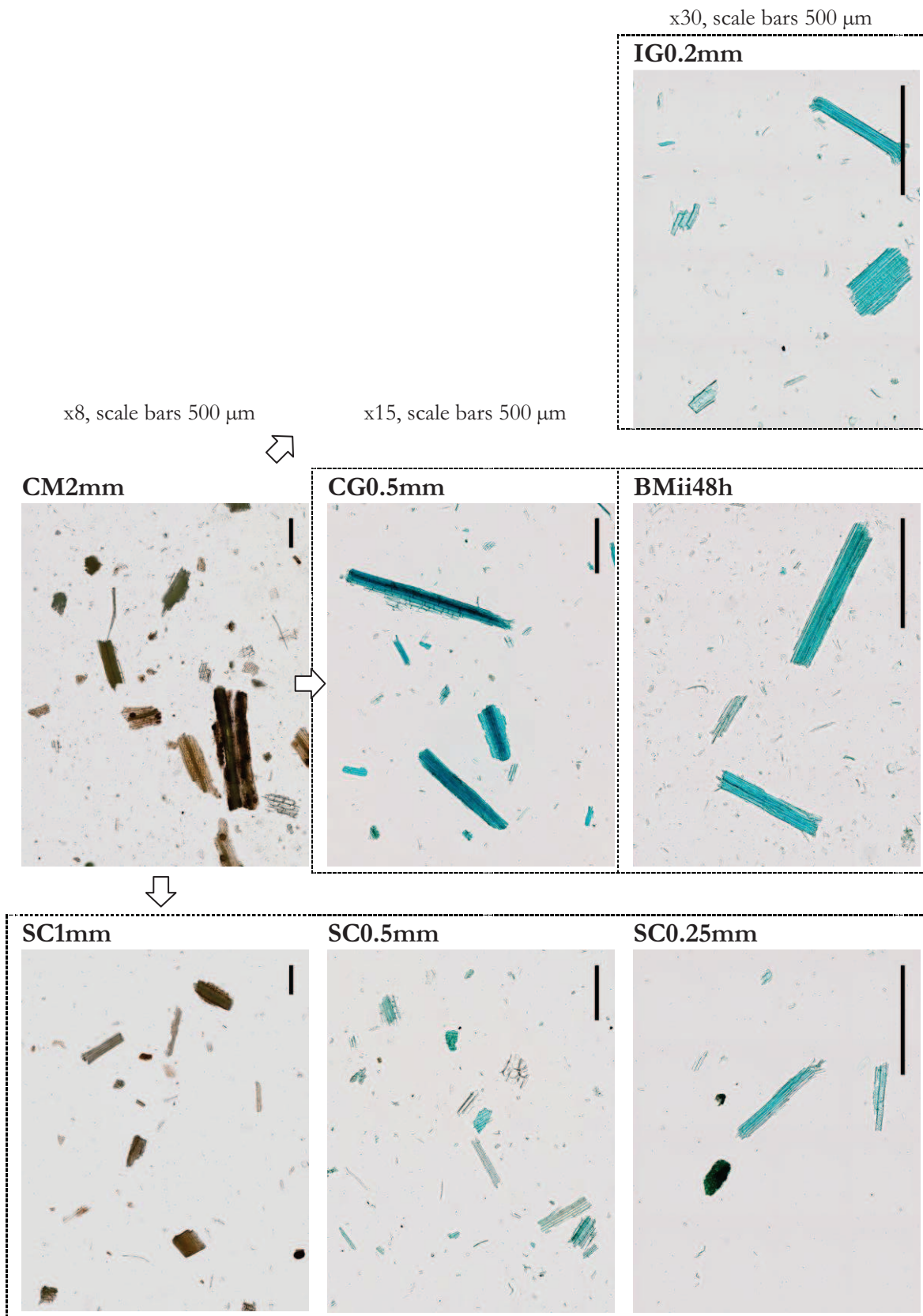
### **4.1 Qualitative analysis of particle morphologies**

Fig. 32 illustrates one image per sample which was used for morphological characterisation. As expected, grinding reduced significantly the particle size scale from mm down to  $\mu\text{m}$  orders (ultrafine).

These images show that wheat-straw powders were structured as the original organisation of the plant. Some histological tissues can be identified and are pointed out by arrows in Fig. 32. The bigger particles, especially in coarse and intermediate powders (initial steps of grinding diagrams), were fibre-likely shaped where very lignified tissues were present (very thick cell walls of sclerenchyma or xylem cells, Fig. 32).

---

<sup>1</sup> Les bases de l'analyse de la co-inertie multiple (MCOA) sont décrites plus profondément dans l'Annexe 1.



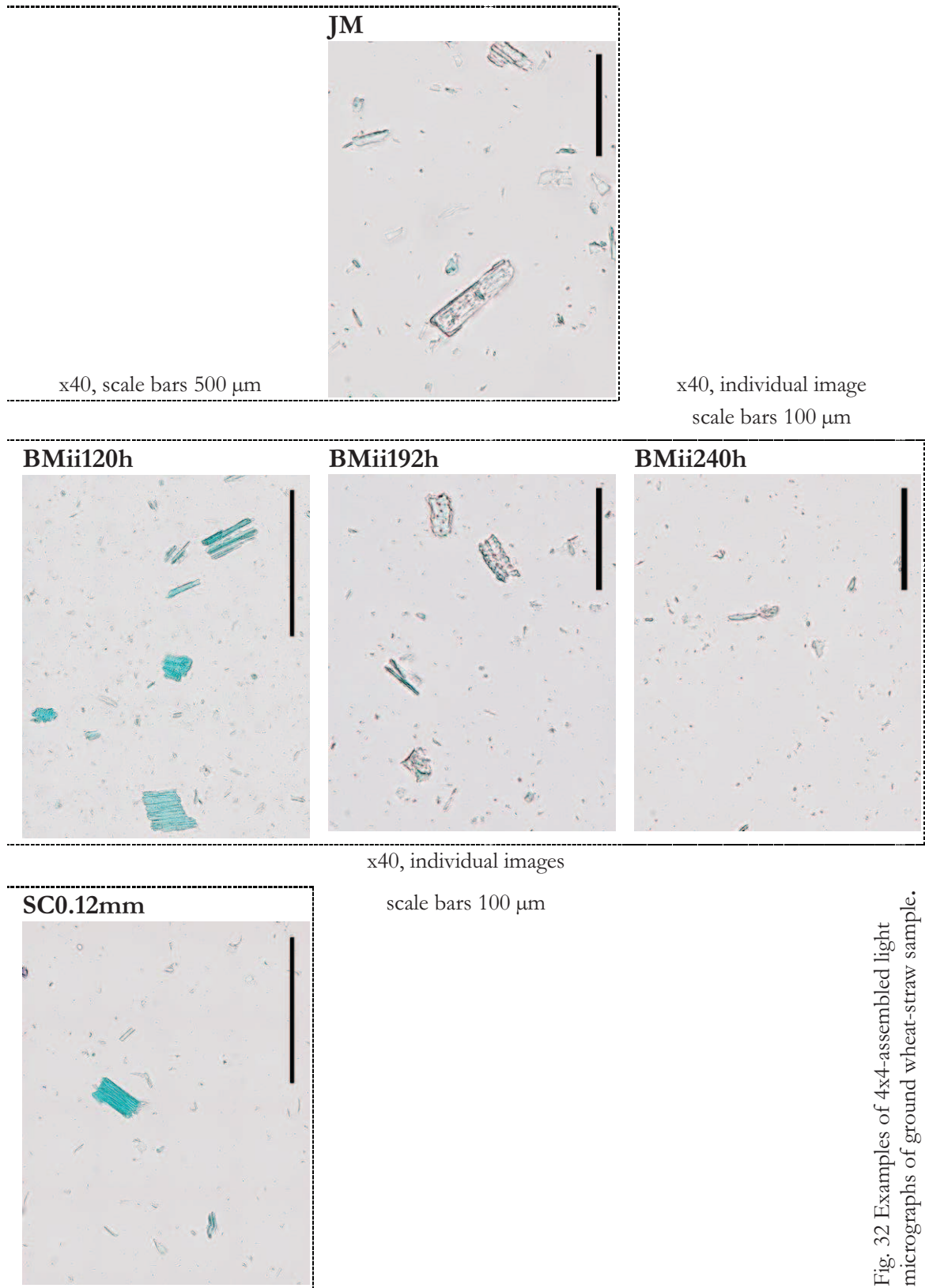


Fig. 32 Examples of 4x4-assembled light micrographs of ground wheat-straw sample.



Thin particles could also be identified as from parenchyma cells due to their thin cell walls; they are not identifiable within smaller wheat straw powders showing that they are probably the less mechanically-recalcitrant structure. More colourful particles were probably the most thick or lignified (more stained with Toluidine blue).

With regard to the shape of particles, the two-dimension projections (particle silhouettes) were mainly rectangular shaped. Bigger particles exhibited particles more or less as rectangles, even square were verified (Fig. 32), especially at the beginning (initial grinding steps). On the other hand, smaller particles were more irregularly shaped. One could expect that smaller particles would be as disks; however some elongated shapes were still distinguished within the smallest particles (Fig. 32).

Even though particles were elongated, no very elongated shape were verified as lignocellulosic fibres used for paper making (ratio between width: length  $\sim 100$ ) or textiles (width: length  $\sim 100$ , e.g. cotton fibres), which means that dry grinding had a more intense effect on breaking particles transversally than a defibrillating effect. Furthermore, since the dimensions of elementary fibres (sclerenchyma cells) of wheat internodes vary from 0.5 to 1.5 mm in length and from 7 to 30  $\mu\text{m}$  in widths (width: length ratio vary from 20-80) as described by McDougall et al. (1993), it confirms very clearly that grinding has indeed reduced the length of these fibres.

Although grinding generally disintegrated this histological structure, some resistant structure can still be identified in ultrafine powders (tracheids, Fig. 32). As lignified tissues exhibit plastic behaviour, these structures are rather deformed than ruptured during grinding. Wheat straw, as any other lignocellulosic biomass, is composed of these different histological tissues which are more or less disintegrate by grinding. Thus the heterogeneity of biomass particles was increased. This unevenly effect of disintegration upon different histological tissues are in agreement with the observations of Averous and Le Digabel (2006) for the preparation of wheat straw fibre to incorporation in biocomposites.

In summary, the size, shape, thickness, density and surface aspects of wheat straw particles varied strongly. Comparing samples is not an easy task due to these variations within each sample. For morphological characterisation (size and shape), a considerable number of particles must be analysed in order to represent this heterogeneity. Furthermore, since it may not be simply explained by means of averaging values, a good alternative to express these results is presenting them as distributions (classification of results). Nevertheless, as the characteristics of smaller and bigger particles within the same sample were different, two types of distributions can be of interest: the number-based ones which are the frequency histogram and the "size"-based ones which take into account the size of particles (*i.e.* in micrographs analysis, the size can be expressed as the

area of the two-dimension projection of particles). Since the smaller particles within a powder are very numerous, the number-based distribution expresses mainly their characteristics. On the other hand, as bigger particles represent an important amount of the cumulated area of all particles, the area-based distributions represent the information of the bigger particles within a given powder.

## 4.2 Size distribution data: Image analysis vs. Laser diffraction

As previously shown, wheat straw powders were highly heterogeneous consequently their particle size distribution could not be described by normal law and then reduced to discrete variables such as the median diameter, the standard deviation or any cumulative undervalue centile of their distributions. In order to take into account the overall characterization (*i.e.* the overall frequency distribution histogram), multiblock statistical analysis was carried out. MCoA allows the identification of trends or co-relationships in multiple data sets which contain the same samples and where the number of variables exceeds the number of observations. This statistical analysis was applied to compare size distribution issued from two methods: laser diffraction (volume-based distribution) and image analysis (area-based distribution of particle equivalent diameter). The first common component (CC1) of MCoA covered 57.6 % of total inertia while the second one (CC2), 22.4 %. This indicates that analysing the projections on both dimensions is an accurate way to take into account the majority (80%) of both dataset inertia.

The analysis of co-variance between one dataset (particle size distributions analysed by either image analysis or laser diffraction) and the compromise on each MCoA common component expresses the contribution of each table to the final MCoA compromise. Tab. 5 presents the results of the covariance analysis. Laser diffraction dataset contributed to both MCoA axes more than Image analysis (superior values of  $\text{Cov}^2$  in both CC1 and CC2). Specifically on CC1, laser diffraction dataset was mainly responsible for the information represented in CC1 ( $\text{Cov}^2$  0.65). This seems to be related to characteristics of the distributions curves obtained by laser diffraction which were more smoothed (presenting a clear peak) than by image analysis (several peaks with smaller relative intensities). In the case of the latter, in MCoA, smaller peaks were few pondered therefore representing less information.

Tab. 5 Covariance analysis between image analysis and laser diffraction datasets and MCoA compromise on both first MCoA axes (CC1 and CC2).

<b>Particle size distribution</b>	<b>CC1</b>	<b>CC2</b>
table1 : image analysis	0.20	0,14
table2 : laser diffraction	0.65	0.26

A simple way to measure the similarity between both dataset (image analysis and laser diffraction) structure is analysing the correlation between their normalised scores on each MCoA axes (CC1 and CC2). Significant high determination coefficients ( $R^2$ ) were verified between the normalised scores of both datasets on both components: on CC1, the  $R^2$  was 0.85 (significant with  $p < 0.0001$ ); on the second one (CC2),  $R^2$  was 0.63 (significant with  $p < 0.001$ ). These results show a good co-structure between both analyses of particle diameters. It means that the datasets agree very strongly especially in dimension 1. Another way to analyse the similarity between the dataset structures is the RV coefficient which takes into account all dimensions (measurement of global inertia). The overall similarity in the structure of image analysis and laser diffraction datasets (particle size distributions) was relatively high resulting in a RV coefficient of 0.59.

A graphical representation of results from the MCoA of both particle size distributions measured by laser diffraction and image analysis is presented in Fig. 33. The compromise (MCoA overall projection on CC1 and CC2, similarity map) of each sample is plotted. In this figure, scores were normalised to unit variance along each axis allowing the superimposition of scores obtained from each individual PCA carried out on each dataset. The distance between the data and the compromise can be considered as proportional to the contribution of this data to the composition of the MCoA common components (axes). Each sample is also characterised by an arrow beginning in the projected ordination of image analysis data and heading in laser diffraction data (normalised scores in CC1 and CC2). The size of the narrows represent the joint trends: the smaller is the narrow, the more similar is the structure (higher joint trend) between both data sets and *vice versa* (Culhane et al., 2003). Therefore, generally, the information by image analysis and laser diffraction datasets were strongly related (small arrows), confirming the overall correlation between scores. However, some samples can be pointed out where the image analysis information was far from laser diffraction measurements: JM, CG0.5mm and SC1mm. As the diameter calculations used for laser diffraction technique are based on spherical particles, this discrepancy could be probably related to the shape of particles which may be differently described for these samples (JM, CG0.5mm and SC1mm) compared to the other samples which were well co-structured in both technique results.



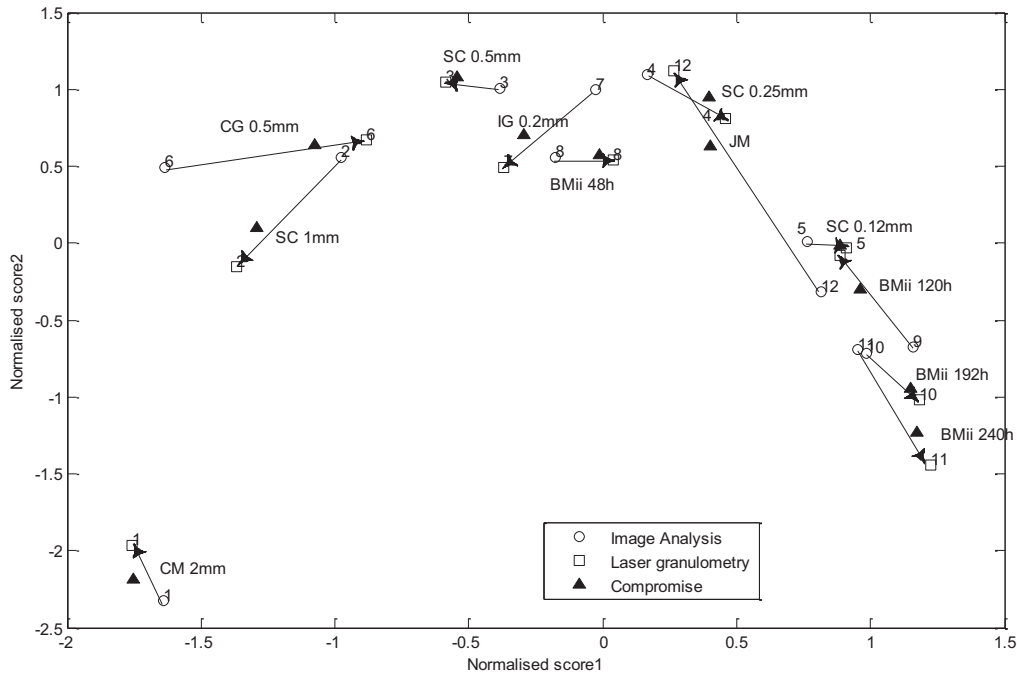


Fig. 33 Analysis of co-structure using MCoA of the equivalent diameter distributions obtained by image analysis (area-based distribution) and laser diffraction (volume-based distribution) measurements.

In conclusion, even if laser diffraction is more dedicated to the size analysis of spherical particles, it could be successfully applied to compare and classify samples, especially within a series produced by the same grinding process. This rapid method is then an acceptable alternative for screening samples prior to the further morphological characterisation by image analysis.

### 4.3 Quantitative analysis of particle morphologies by MCoA

Each result of size and shape parameter (equivalent diameter, max Feret diameter, elongation, circularity and convexity, abbreviated as  $Deq$ ,  $Fmax$ ,  $E$ ,  $Ci$  and  $Cv$ , respectively) of particles was treated in order to obtain two types of distributions: number based (frequency, indicated by the subscript  $N$ ) and area based (subscript  $A$ ). Both represent a classification of results as the ordinates were the interval of a given morphological characteristic and the coordinates, the percentage of either total number or total area of all particles presenting the given characteristic value within the ordinate interval. Examples of number-based and area-based distribution are presented in Fig. 34 and Fig. 36, respectively. All these ten distributions (5 shape/size parameters x 2 types of distributions) were analysed by MCoA. The objectives were to detect redundant/complementary information and to give an overall picture of morphological changes due to grinding processes without reducing these characteristic to discrete descriptors.

### 4.3.1 Overall relationships between the morphological descriptors

The RV coefficients between the 10 datasets from image analysis are presented in Tab. 6. The morphological characteristics of smaller particles (fines, number-based distributions) against bigger ones (area-based distributions) within a same wheat-straw powder were not related (low RV values between any characteristic described by number- or by area-based distributions). Therefore, both informations were relevant and complementary to describe grinding processes.

High similarities were verified (high RV coefficients from 0.72 to 0.998) between the Deq, Fmax and E, regardless of the expression of distribution (area or number based). This group of similar structure indicates a redundancy between the information of these three morphological parameters. Moreover, it shows that a fluctuation in one of these parameters was followed by a similar fluctuation in the other. These results can be related to the particle characteristics: the smaller the particles, the less elongated they were. However, these correlations could be also due to the calculations of each characteristic: indeed the elongation factor is calculated by the ratio between Fmax and the equivalent rectangle short side (the equivalent rectangle is the rectangle with the same area and the longest side equals to the Fmax).

Tab. 6 Similarities (RV coefficients) between the different datasets from morphological image analysis of ground-wheat straw samples as investigated by MCoA.

	<i>Area-based distributions</i>					<i>Number-based distributions</i>				
	Deq	Fmax	E	Ci	Cv	Deq	Fmax	E	Ci	Cv
<i>Area-based distributions</i>										
Deq	1.00									
Fmax	0.91	1.00								
E	0.80	0.79	1.00							
Ci	0.84	0.83	0.82	1.00						
Cv	0.55	0.71	0.50	0.49	1.00					
<i>Number-based distributions</i>										
Deq	0.57	0.50	0.49	0.50	0.13	1.00				
Fmax	0.57	0.50	0.49	0.50	0.13	0.998	1.00			
E	0.40	0.35	0.41	0.42	0.12	0.72	0.72	1.00		
Ci	0.22	0.21	0.20	0.23	0.11	0.25	0.26	0.43	1.00	
Cv	0.30	0.30	0.21	0.30	0.16	0.32	0.33	0.44	0.87	1.00

RV coefficients were calculated using the software using SAISIR package (Bertrand, 2008).

The circularity expressed by area-based distributions (bigger particles) was highly co-structured as the first group of similarities (RV 0.84, 0.83 and 0.82 between  $Ci_A$  and  $Deq_A$ ,  $Fmax_A$  and  $E_A$ , respectively). Likely, the convexity of bigger particles appeared to be only related to their max Feret diameter (RV 0.71 between  $Cv_A$  and  $Fmax_A$ ). Indeed, within the population of bigger particles, when the smaller the particles, the more convex and circular they were.

The circularity and convexity of smaller particles as expressed by number-based distributions were strongly related (RV 0.87 between  $C_{iN}$  and  $C_{vN}$ ). Fig. 34 shows their number-based distributions. Indeed, for all samples and for both shape descriptors, their patterns were very similar with a clear peak around 1 and 1.2 which are very low values for circularity and convexity. This result shows that the smaller particles were, since the first step until ultrafine grinding steps (all samples), very circular or convex and also that the variations within these two factors were similar.

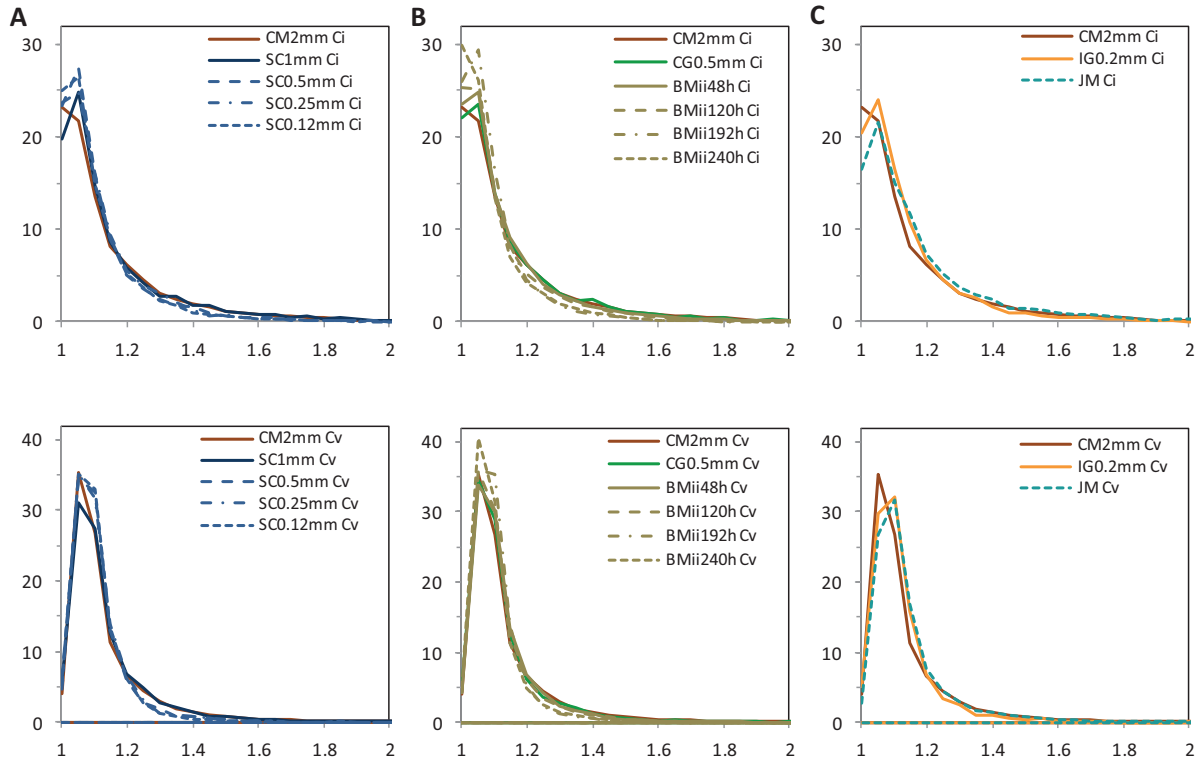


Fig. 34 Number-based distributions of circularity (on top) and convexity (at bottom) factors. Ordinates are the factor interval and coordinate, the percentage of total number of particles in the given interval. Wheat straw samples produced during different grinding processes (including intermediate steps): A) successive centrifugal grinding, B) ball milling and C) air-jet milling.

### 4.3.2 Ground wheat straw powders described by the common components from MCoA

Tab. 7 lists the results of the covariance analysis which indicates the contribution of each dataset on the first four MCoA common components.

Tab. 7 Covariance analysis between the different dataset from morphological image analysis of ground-wheat straw samples on MCoA components (CC1 to CC4).

<b>Cov<sup>2</sup></b>	<b>CC1</b>	<b>CC2</b>	<b>CC3</b>	<b>CC4</b>
<i>Area-based distributions</i>				
D <sub>eq</sub>	0.167	0.134	0.126	0.087
F <sub>max</sub>	0.138	0.139	0.150	0.084
E	0.158	0.071	0.106	0.184
Ci	0.185	0.131	0.155	0.080
Cv	0.044	0.049	0.177	0.098
<i>Number-based distributions</i>				
D <sub>eq</sub>	0.606	0.113	0.045	0.001
F <sub>max</sub>	0.617	0.112	0.043	0.001
E	0.792	0.012	0.017	0.018
Ci	0.387	0.142	0.007	0.004
Cv	0.323	0.313	0.004	0.002

The first component (CC1) was composed mostly of the data of the number-based distributions (highest cov<sup>2</sup> values): descending from to, the equivalent diameter, max Feret diameter and elongation (Cov<sup>2</sup> from 0.6 to 0.8) followed by circularity and convexity (cov<sup>2</sup> 0.32 and 0.39, respectively). It shows that the score of each sample in CC1 is strongly weighted by the characteristics of smaller particles. The dataset contributions on CC2 were more evenly distributed between the different datasets either by number- or area-based distributions. The most contributing dataset to CC2 was the convexity in number-based distributions; the less contributing one was elongation by number-based distributions (which were the most representative in CC1). CC3 and CC4 were mainly influenced by the morphological characteristics of bigger particles (area-based distributions) which were less represented by the first two dimensions than the smaller particle characteristics.

The similarity map from MCoA in CC1 and CC2 is presented in Fig. 35. CC1 and CC2 represented 45% and 19% of total inertia of all datasets. Generally as grinding steps increased, a bell-shape pattern (indicated with the cross-hatched arrow in Fig. 35) was verified: the compromise scores on CC1 decreased, the scores on CC2 increased until a maximum (0.2-0.4, samples from fine grinding and JM) and then decreased until negative values (-0.4, final point BMi240h). To understand what these score variations in common components represent in the original measured values, we analysed the individual PCA of the highest contributing datasets (high cov<sup>2</sup> values) within each CC1 or CC2. For the CC1, the E<sub>N</sub>, Deq<sub>N</sub>, Ci<sub>N</sub> and Cv<sub>N</sub> variations on their PC1 were detailed by their loadings. For the CC2, the Ci<sub>N</sub>, Cv<sub>N</sub>, Deq<sub>s</sub>, Ci<sub>s</sub> were analysed by their loading in PC2. We summarise here the general effect of each grinding mode on these morphological descriptors.

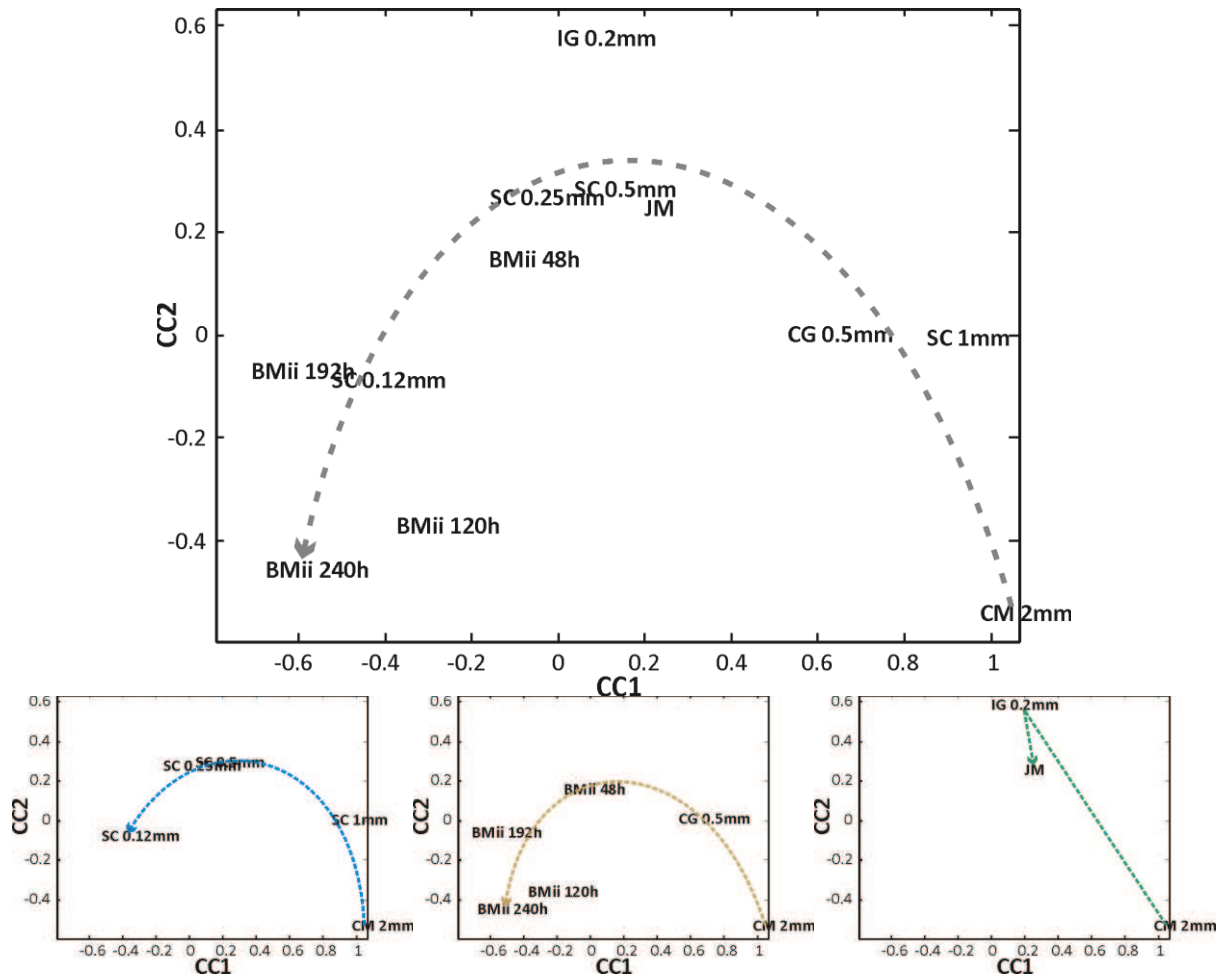


Fig. 35 MCoA model: similarity map (compromises) of ground wheat-straw samples in the planes defined by the two first components (CC1 and CC2, top). At bottom, the same similarity map separately for each grinding process (including intermediate steps): successive centrifugal grinding at left; ball milling at the middle and air-jet milling at right.

### 4.3.3 Pathway of grinding operations: effects on particle morphologies

The behaviour of the smaller particles upon grinding was represented mainly by the variations in CC1 and partially by the ones in CC2. As the grinding intensity increased, CC1 was decreased which means that the proportion of smaller particles exhibiting a  $Deq_N$  smaller than  $10 \mu m$  was increased by the reduction of particles larger than  $10 \mu m$ , especially between  $10$  to  $40 \mu m$ . Also, the elongation of the smaller particles was decreased down to values lower than  $E_N 2$  in detriment of particles more elongated in particular with  $E$  between  $2$  and  $4.5$ . Furthermore, as the  $Ci_N$  and  $Cv_N$  influenced both CC1 and CC2, their description was slightly more complex. Generally, grinding reduced the  $Ci_N$  and  $Cv_N$  values. As grinding steps were increased (decrease of CC1), the circularity of smaller particles was decreased to  $Ci$  values lower than  $1.12$  by the analysis on CC1 decrease, then the increase of CC2 indicates that particles with  $Ci$  between  $1.02$  and  $1.26$  were increased. Therefore, up to this point (CC1 and CC2 increased), we

observed an increase in the proportion of particles with  $C_i$  1.02 and 1.12. When further grindings than the maximum of CC2 (similarity map, Fig. 35) were carried out, the proportion of particles with  $C_i$  from 1 to 1.02 was highly increased (CC2 decrease). The  $C_{VN}$  values varied similarly as  $C_{iN}$ , as CC1 and CC2 increased, the particles with  $C_{VN}$  between 1.07 and 1.17 were more numerous. As CC2 decreased, the proportion of particle very convex ( $C_{VN}$  from 1 to 1.07) was increased. In summary, grinding reduced the size and the elongation of the smaller particles evenly during all grinding steps. The circularity and the convexity were also reduced (more circular and convex particles) but by two steps: first, an increase of intermediate  $C_{iN}$  and  $C_{VN}$  values (maximum of PC2) and finally, by the last grinding steps,  $C_{iN}$  and  $C_{VN}$  were reduced to values very close to 1.

The behaviour of bigger particles upon grinding is partially expressed by the variation on CC2. As the grinding intensity increased, CC2 was first increased and then decreased. At first, the diameter of bigger particles was decreased by the action of intermediate grindings transforming particles from 1900 to 2300  $\mu\text{m}$  and from 400 to 1300  $\mu\text{m}$  into smaller size particles with  $Deq_A$  from 200 to 400  $\mu\text{m}$ . As grinding proceed, CC2 decreased, the proportion of area of particles from 200 to 400  $\mu\text{m}$  was decreased resulting in an increase particles which were smaller than 200  $\mu\text{m}$ . Fig. 36 illustrates the  $Deq_A$  distributions; indeed the equivalent diameter was significantly reduced. Furthermore, the circularity of bigger particles was also affected by grinding. Particularly, any step of grinding step after the 2 mm-cutting milling allowed an increase of particles with  $C_{iA}$  between 1.5 and 2.5. After that (PC2 of  $C_{iA}$  PCA was reduced), grinding produced particles more circular as the area proportion with  $C_{iA}$  between 1 and 1.3 was increased.

## 5 Discussion – grinding mechanisms

Generally, samples were relatively placed/ordered in the MCoA similarity map (Fig. 35) as they were placed in the individual similarity map from  $Deq_N$  and  $Deq_A$  PCAs. It represents that the main morphological effect of grinding was the size reduction (Fig. 36). However, some intermediate steps of grinding and jet milling did not follow the general pattern of variations in some of the individual PCA, e.g. the elongation of bigger particles were very similarly distributed with exception of SC0.25mm and BMi120h samples. As a consequence, these samples were placed in the similarity map (Fig. 35) differently to the similarity maps of  $Deq_N$  or  $Deq_A$ .

The general behaviour of grinding is intuitively easily understood: grinding reduces the particle size making particles each time more compact, more convex and less elongated as a trend to elementary particles. On the other hand, when some grinding steps do not follow this pattern, it can give some further information about the type of



breaking occurring during the grinding step. Therefore, we discuss here some hypotheses on breaking mechanisms of the three types of studied grinding taking into account the general pattern of morphology changes in addition to the steps that behaved as exceptions during grinding processes.

### 5.1 Successive centrifugal grinding

With regard to the successive centrifugal grinding (Fig. 35, at bottom and left), the step using the 0.5 mm sieve exhibited an increase in the convexity of smaller particles (increased weightings for  $C_{VN}$  more than 1.17). The circularity values of bigger particles were increased also by this 0.5 mm step (increased weightings for  $C_{IA}$  from 1.5 to 2.5). Smaller particles became less convex, bigger particles became less circular. These results may indicate that during this step, the material was being fragmented producing particles composed of several parts of tissues. An increase in circularity of smaller particles may indicate that the smaller particles were composed of e.g. several, non-organised or fractured epidermal or sclerenchymal tissues still partially associated. The increase of convexity values of bigger particles is probably related to the fragmentation producing particles with association of different tissues (which are differently shaped, e.g. sclerenchyma still associated to parenchyma cells). Thus, the shapes of these particles are more concave. At the next step of grinding (0.25 mm) this dissociation/fragmentation was increased (further reduction of particle size).

The 0.25 mm-sieve step produced a different effect on the elongation values of smaller and bigger particles: this step increased the proportion of particles exhibiting  $E_N$  higher than 2 and the area weightings of bigger particles with  $E_A$  higher than 4.5. It seems that this size of sieve holes was limiting particles to pass the sieve longitudinally. We can consider that during the 0.5 mm step, particles with several fibres packed together were being dissociated (defibrillating effect and breaking particles longitudinally). This effect was enhanced by the aspiration effect which is produced by the centrifugal speed of rotation. The elongated particles were probably oriented along the flow allowing the impact at their extremities and shearing through their length against the sieve. When the sieve hole size decreased for the next step (0.12 mm), the elongation of bigger and smaller particles were again reduced (as the overall grinding pattern). As the elementary fibres of wheat straw (sclerenchyma cells) exhibit lengths from 500 to 1500  $\mu\text{m}$  (McDougall et al., 1993), it seems that with sieve sizes below 0.25 mm these elementary fibres are more probably to be fragmented upon their length reducing the elongations of particle which were composed of a fibre assembly (technological fibre *i.e.* fibre bundles of sclerenchyma cells).



## 5.2 Ball milling processing

The compromise of ball milling samples is presented at bottom of Fig. 35 (middle). Two periods of ball milling (from 48 h until 120 h and from 192 h until 240 h) allowed a slight increase in the elongation of smaller particles (increased weighting for  $E_N$  higher than 2). Therefore, the less elongated  $E_N$  distribution was observed for BMii192h. Nevertheless, no further size reduction was obtained by ball milling from 192 h to 240 h as their particle size distribution (Fig. 36B) was very similar.

It seems that at a certain moment before the end of the first period of grinding, until 120h which was when grinding media was changed, the particles were more or less crushed allowing the dissociation of more fibre-liked particles. When developing the ball-milling diagram, 120 h was chosen to change the grinding media in order to reach finer particles (after that none or few reductions in size were observed with the same sizes of grinding media) and to diminish the grinding media contamination (controlled by released ash). Likely, the last period of ball milling (192 h to 240 h) increased the elongation of smaller particles by probably the same effect: once the size was not anymore reduced (or few reduced) particles were crushed dissociating their fibrillated structures.

## 5.3 Jet milling processing

The samples of the jet milling diagram followed the less the general pattern (Fig. 35, at bottom and right). It was related mainly to the different behaviour of smaller particles. Jet milling (between IG0.2mm and JM samples) allowed an increase of smaller particles with  $E_N$  higher than 2. Likely, it slightly increased the proportion of particles with  $Ci_N$  more than 1.2 and with  $Cv_N$  more than 1.17. To understand this it is necessary to know that jet milling is associated with a turbo separator (air classifier). It means that particles are ground by high speed impacts allowed by the high-pressure air inlets and can entry in the selecting rotor depending on their aerodynamic properties. Considering that smaller particles are firstly produced by breaking/dissociating the outer histological tissues (epidermis and parenchyma which are also the less resistant to rupture), when these tissue particles are dissociated they can pass into the selector even being still elongated and less concave or convex owing probably to the structure still partially irregularly shaped by the presence of several cells more or less aligned and stuck together. Thus, the convexity and circularity were increased for the smaller particles and their elongation increased.

## 5.4 Particle size reduction

Since the particle size reduction was the main effect observed, further distinguishing the sample with this regard must be of interest. Fig. 36 shows that indeed the equivalent diameter was significantly reduced. We can consider the “pseudo” median value, namely

$D_{50}$  (*i.e.* since the distribution did not follow a normal law of distribution, we cannot consider as a median value as the central peak of the distributions). The grinding steps were able to reduce the  $D_{50}$  from 1100  $\mu\text{m}$  until 87, 21 and 8  $\mu\text{m}$  after the successive centrifugal grinding, the jet milling and the ball milling diagrams, respectively. To the best of our knowledge, these small particles sizes ( $<20 \mu\text{m}$ ) of biomasses were only reported for different types of lignocellulosic materials using planetary ball milling and jet milling of psyllium seed husk (Van Craeyveld et al., 2008), and vibrational rod mill and jet milling of micro-crystalline cellulose (Suzuki & Nakagami, 1999).

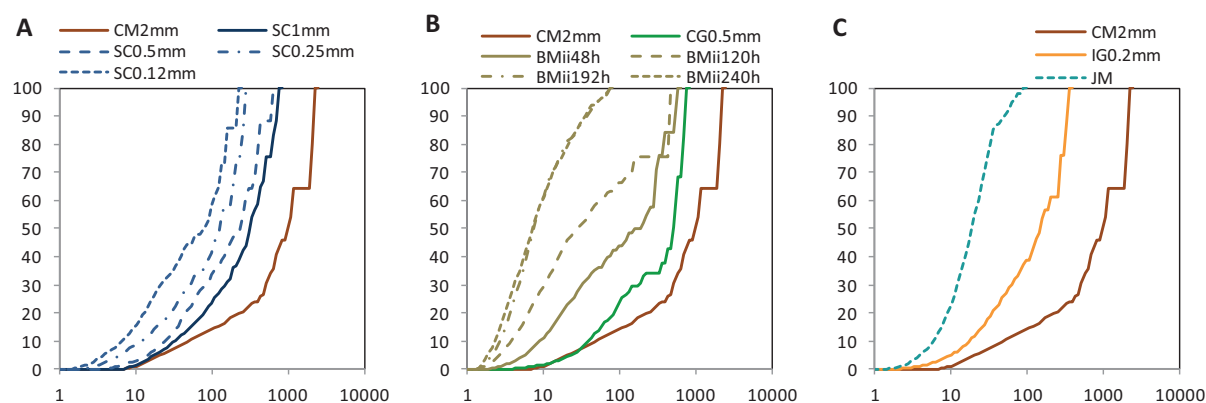


Fig. 36 Cumulated area-based distribution of equivalent diameter. Ordinates are the equivalent diameter interval ( $\mu\text{m}$ ) and coordinate, the cumulated percentage of total area of particles in the given interval. Wheat straw samples produced during different grinding processes (including intermediate steps): A) successive centrifugal grinding, B) ball milling and C) air-jet milling.

## Conclusions

A large range of biomass powders was produced with different structures showing an important role of grinding mode on morphological modulation. Laser diffraction seemed to be related to image analysis to determine particle diameter distributions within the tested range of particles.

We developed a method to analyse heterogeneous powders including image analysis acquisition, data processing and multiblock statistical analysis. This allowed to take into account all the variability of size and shape of wheat straw powders produced by complex grinding operations. In addition, the multiblock statistical analysis allowed the understanding of these complex powders generation and therefore (indirectly) the breaking mechanisms for the dry grinding methods applied to biomass.

As future prospects issued from this work, more studies are necessary to understand the destination of the different wheat tissues upon grinding. This could be helped by the development of spectroscopic analyses (e.g. by Raman effect or fluorescence) to identify structures or specific staining methods as markers to be followed before and after grinding. Moreover, it seems to be of interest to produce isolated tissues by e.g. hand or

laser dissection to apply them mechanical stress similar to those occurring in grinding and subsequently analyse size and shapes of produced particles. Also, model particles can be used to validate the developed method using material of known polydispersity of size and shape. .

## **Appendix**

Supplementary data includes the additional methodology illustrations.

## **Acknowledgements**

Charles Ghommidh is greatly thanked by his precious advice in image acquisition and treatment. Y. Mellerin, N. Beaubras, G. Maraval and M.Chaurand are also acknowledged for technical assistance. This study was funded by the Languedoc-Roussillon Region (FR).

## **Supplementary data**



Gray level image  
(intensity plane extraction)

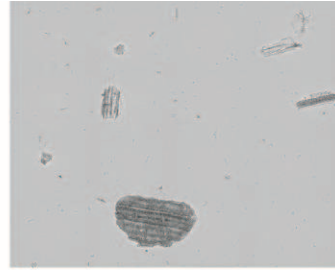


Image of highlighted particles  
(after pixel intensity conversion table in order to darken the darkest pixels and Gaussian smoothing filter)

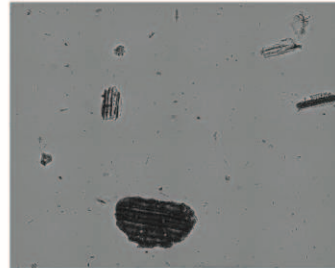
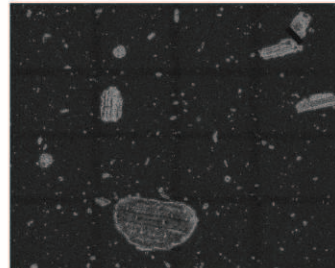
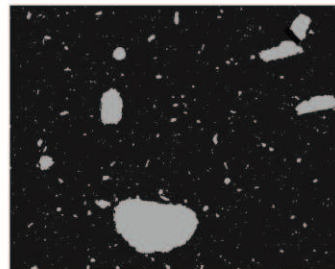


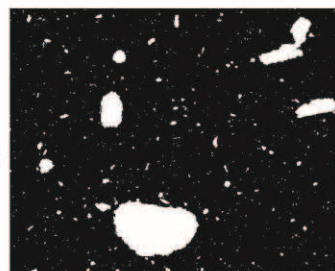
Image of highlighted particle edges  
(after Sobel edge detection followed by pixel intensity conversion table in order to brighten the brightest pixels and Gaussian smoothing filter)



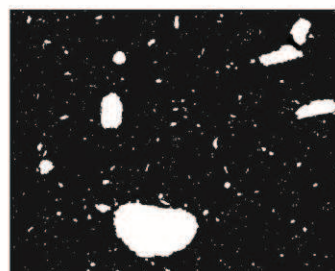
Highlighted particles after threshold, fill holls, erosion, and rescaling to gray levels by multiplying by 150.



Sum of both images and highlighting  
Well contrasted particles (even with poorly defined edges) and transparent particles (found by their edges) are well apparent.



Thresholding followed by border killing, filling holes and removing particles with less than 25 px<sup>2</sup>



Supplementary fig. 2 Schematic image processing steps.

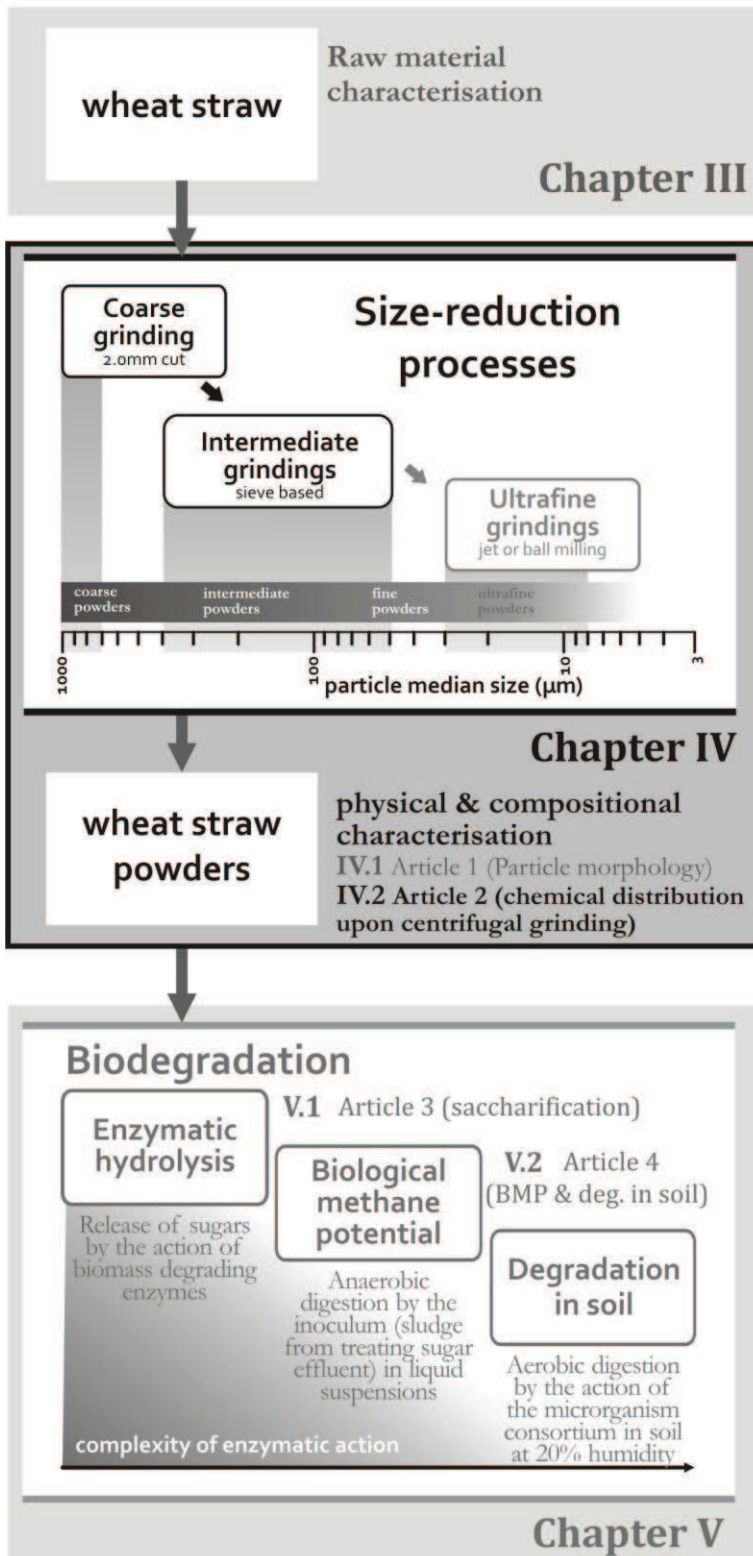


## CHAPITRE IV.2

# ARTICLE 2. SUCCESSIVE CENTRIFUGAL GRINDING AND SIEVING OF WHEAT STRAW

Abstract.....	95
Graphical abstract.....	95
Keywords.....	95
1 Introduction.....	96
2 Experimental.....	97
2.1 <i>Sample preparations</i> .....	97
2.2 <i>Compositional analyses</i> .....	98
2.3 <i>Microscopic observations</i> .....	99
3 Results and Discussion.....	99
3.1 <i>Anatomic composition of wheat straw</i> .....	99
3.2 <i>Behaviour of the major straw components upon centrifugal grinding</i> .....	100
3.3 <i>Distribution of major components in fine straw powder</i> .....	102
Conclusions .....	103
Acknowledgements .....	104

# Ultra-fine biomass processing





## IV.2 Article 2. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw

Gabriela Ghizzi D. Silva, Stéphane Guilbert, Xavier Rouau.

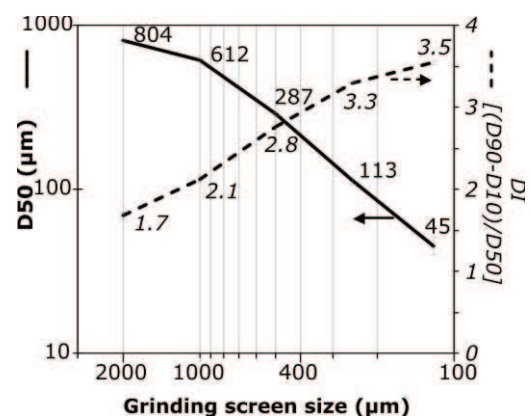
presented in Colloque Science et Technologie des Poudres Matériaux Frittés, 27-29 mai 2009, Montpellier and published in *Powder Technology*, 208, 266-270. 2011.

### Abstract

Grinding plant biomass may allow the lignocellulosic assembly to become more reactive/accessible by providing energy for polymer dissociation, increasing contact surface (particle size reduction) and reducing cellulose crystallinity. Moreover lignocellulosic composition varies considerably affecting biomass processability as resource for bio-based energies, composite materials and chemicals. The aims of this work were: (i) to analyse composition of wheat anatomic parts present into wheat straw, (ii) to characterize the behaviour of major components upon successive centrifugal grinding steps (2mm-screen cutting milling followed by 4-step centrifugal grinding) and (iii) to relate particle size distribution and component concentrations into the finest sized product (0.12mm-screen ground). The powders from successive centrifugal grindings were sieved and their chemical compositions were determined. Ground straw powders were heterogeneous according to different particle aspects: size, shapes and roughness. In general fractions with lower particle size had higher ash and protein contents whereas cellulose contents are higher in the larger fractions. Wheat straw exhibited a non homogeneous reduction behaviour when finely ground. Fractions compositions were only slightly distinct suggesting that although sieving can constitute a preliminary fractionation step, it is necessary to reduce still more the particle size to reach more effective dissociation of macromolecules assembly.

### Graphical abstract

Centrifugal grinding of wheat straw was studied. The lignocellulosic assembly was partially and unevenly dissociated during grindings steps. Ash and proteins were easily dissociated and cellulose was more recalcitrant (present in larger fractions). Produced powders were heterogeneous according to different particle aspects: size, shapes and roughness. Wheat straw presented a non homogeneous reduction behaviour when finely ground.



### Keywords

Biomass, particle size, lignocellulose, milling, grinding.

## 1 Introduction

Agricultural biomass is an attractive material for ethanol production, methanisation, combustion, chemicals and composite-material production. Lignocellulosic biomass is composed of a cellulose network embedded in a hemicellulose/lignin matrix consisting mostly of secondary cell walls. Cellulose is a high molecular weight polymer composed of glucose units linked together by  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds. Intra and inter-chain interactions (hydrogen bonds) are responsible for a high crystallinity of cellulose microfibrils. Hemicelluloses are polysaccharides of various sugars. In the case of wheat straw, the main hemicelluloses are composed of  $\beta$ -1,4 linked-xylose chains occasionally substituted at C2 or C3 position by arabinose units. Hemicellulose interacts both with cellulose and with lignin due to its many hydroxyl groups. Lignin is a complex polymer of *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl units that are present in various proportions according to their botanical origin. Lignin and hemicelluloses principally represent the amorphous phase of plant cell wall (Monties, 1980).

Grinding biomass may allow this molecule assembly to become more reactive/accessible by providing energy for polymer dissociation, increasing contact surface (particle size reduction) and reducing cellulose crystallinity (Keshwani & Cheng, 2009; Sánchez & Cardona, 2008; Sun & Cheng, 2002). These materials have a large particle size distribution after conventional grinding processes (Averous & Le Digabel, 2006; Bitra et al., 2009; Bridgeman et al., 2007). Chemical composition heterogeneity of biomass is observed at different levels : plant species (Sánchez & Cardona, 2008), plant anatomic parts (Bertrand et al., 2006; Chundawat et al., 2007), histological tissues (Bertrand et al., 2006), cell wall layers (Lequart et al., 2000; Musel et al., 1997) and finally at the molecule assembly level. Size reduction can allow dissociation of each level depending on the magnitude of final particle size.

Thus, one can take advantage of biomass heterogeneity to offer choices of fractions with specific compositions and/or particle sizes for different uses. Understanding these differences is important to improve or create biomass applications as a resource for energies, composite materials and chemicals.

Previous studies reported the positive effect of size reduction of biomass on cellulose hydrolysis (Bridgeman et al., 2007; Inoue et al., 2008; Sun & Cheng, 2002). However few (Chundawat et al., 2007; Van Craeyveld et al., 2008) presented powders with median particle sizes lower than 100  $\mu\text{m}$  although biomass particle size substantially affects both pretreatments and enzymatic hydrolysis (Chang & Holtzapple, 2000; Chundawat et al., 2007).

The aims of this work were: (i) to differentiate wheat anatomic parts presents into straw with respect to cellulose, hemicellulose, lignin, proteins and ash concentrations, (ii) to characterize the behaviour of these major components upon successive centrifugal grinding steps and (iii) to relate particle size distribution and component concentrations into the finest product.

## 2 Experimental

### 2.1 Sample preparations

Wheat straw (*T.astivum* cv. Apache) was grown in Aveyron (FR) and harvested in 2007. In the laboratory, these plant samples were divided into 5 groups of anatomic parts: stem internodes, sheath (leaf), fermented stem and sheath, nodes and spikelet/chaff.

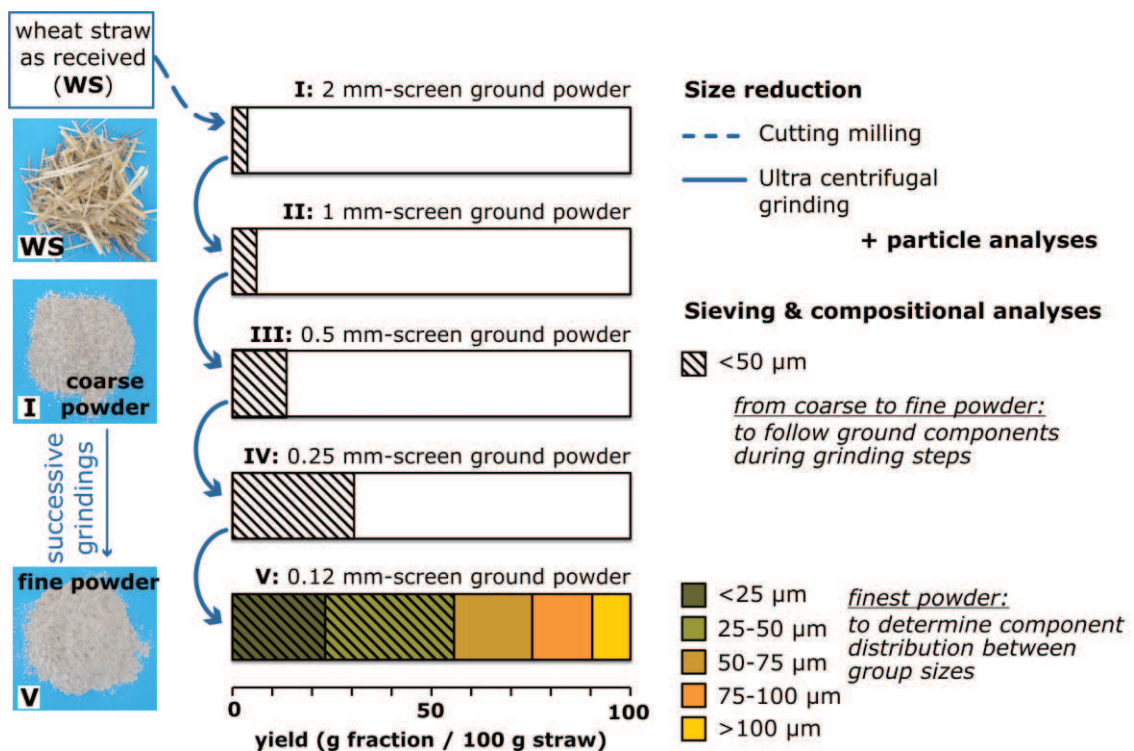


Fig. 37 Working steps to size reduction and fraction preparations of wheat straw.

Fig. 37 shows the scheme of size reduction and fraction preparations of this study. Firstly wheat straw was comminuted using a cutting mill (Retsch SM2000, Haan, Germany) with a 2.0mm screen<sup>2</sup>. Next, the wheat straw was ground successively by centrifugal grinding (Retsch ZM200, Haan, Germany). Particle milling inside both

<sup>2</sup> In this article, the term “screen” is used to indicate the grinding “sieve”. The latter was suggested by one of the reviewers of the article 3 which is presented in the next chapter (V.1) but was chronologically the second to be published. For all other parts of this document, the term “sieve” is used.

<sup>3</sup> L'article 3 résulte des travaux menés lors d'un séjour à Marseille-Luminy en Juillet 2009 à l'UMR Biotechnologie

equipments is illustrated in Fig. 38. Cutting milling promoted mostly an axial reduction of plant stem. Centrifugal grinding results in multiple mechanical effects. Shearing and impact are maximised by high-speed projections of particles inside the grinding chamber. To maintain centrifugal speeds and to minimize heating effects a suitable compromise was obtained operating at 12 000 rpm of rotation speed with 4 steps (1.0, 0.5, 0.25 and 0.12 mm screens).

The powders from successive grinding were 50 $\mu$ m-sieved and the fine fractions were analyzed. Along grinding steps the fine fractions (<50 $\mu$ m) represented the material the most susceptible to breakdown from coarse to fine powder (Fig. 37). When wheat straw was the most finely ground (after the last grinding step) the resulting fine powder were entirely analysed. Thus, in a separate experiment, the 0.12mm-screen ground powder was fractionated into 5 particle size groups (>100, 100-75, 75-50, 50-25 and <25  $\mu$ m) in an Air Jet sieve (200LS-N, Alpine Hosokawa) for 6 minutes. Experiments were performed in duplicates.

Analyses of particle size distributions were carried out by laser diffraction granulometry (Mastersizer 2000, Malvern, England) at room temperature. Particle size distribution is characterized by the median diameter (d50) and by the dispersion index (DI), also commonly called span, defined by (d90-d10)/d50 (Allen, 1997) where the d10, d50 or d90 values represent the 10<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile of particles that have a diameter lower than this criterion. Two measurements were carried out for each sample.

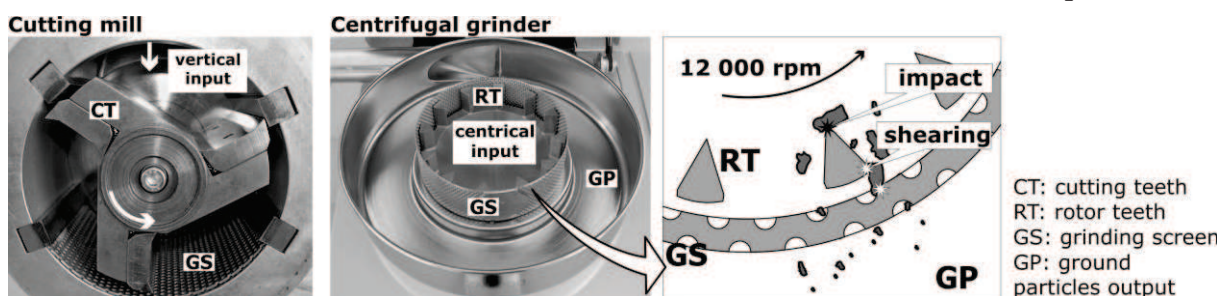


Fig. 38 Mechanism of size reduction by cutting milling and centrifugal grinding.

## 2.2 Compositional analyses

The cellulose and hemicellulose content of fractions were determined by gas-liquid chromatography (GLC) after a two-step sulphuric acid hydrolysis (36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min at 25 °C then 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100 °C) and derivatisation as alditol acetates (Blakeney et al., 1983). The alditol acetates obtained were injected on a DB 225 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA), using allose as the internal standard. Cellulose content was calculated as the sum of anhydro-glucose content. Hemicellulose content was

calculated as the sum of anhydro-arabinose, anhydro-xylose, anhydro-mannose and anhydro-galactose contents.

Klason lignin was determined as the insoluble residue remaining after a two-step sulphuric acid hydrolysis of cell wall polysaccharides (Monties, 1984). Briefly, 200 mg of sample were suspended in 2 mL of 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 20 °C. These acidic suspensions were then diluted to 5% with deionised water and boiled for 3 h then filtered. The remaining residues were dried at 105 °C and ash measurements performed at 900 °C for 3 h.

Moisture and ash contents were determined according the ISO 711-1978 and ISO 2171-1980 method, respectively. The protein content was determined by the KJELDAHL method (total nitrogen X 6.3).

## **2.3 Microscopic observations**

The 0.12 mm-screen ground powder was dispersed with a Particle Disperser (EK 100, Malvern, England) on glass slides. Environmental scanning electron microscope (ESEM) micrographs were taken from dispersed powder.

## **3 Results and Discussion**

### **3.1 Anatomic composition of wheat straw**

The composition of wheat straw is given in Fig. 39a. Cellulose was the major component of wheat straw followed by hemicellulose and lignin. With respect to wheat plant parts (Fig. 39b) the stem internodes represented 36% of wheat straw, followed by the fermented fraction composed mostly of internodes and sheaths. Nodes and spikelets were the minor anatomic components of straw. The composition of each anatomic fraction is presented in Fig. 39c. In general, cellulose was the major component of each plant fractions followed by hemicelluloses and lignin. The most variable concentrations were proteins and ash contents. The internodes were the less concentrated in both components. It represented 36.2% of straw (yield) but only 21% of total proteins of entire straw (protein concentration x fraction yield) and 15% of total ash (similar calculation). On the other hand, the fraction called “fermented” (parts which were impossible to identify as stem, sheath or dust) was visually darker and the richest in ash and proteins. This ash enrichment can be related to a partial environmental degradation of straw (light and humidity exposition).



Comparing stem internodes and sheaths, the higher ash concentration of sheath is probably due to its epidermal tissues which have high amounts of silica cells (Currie & Perry, 2007).

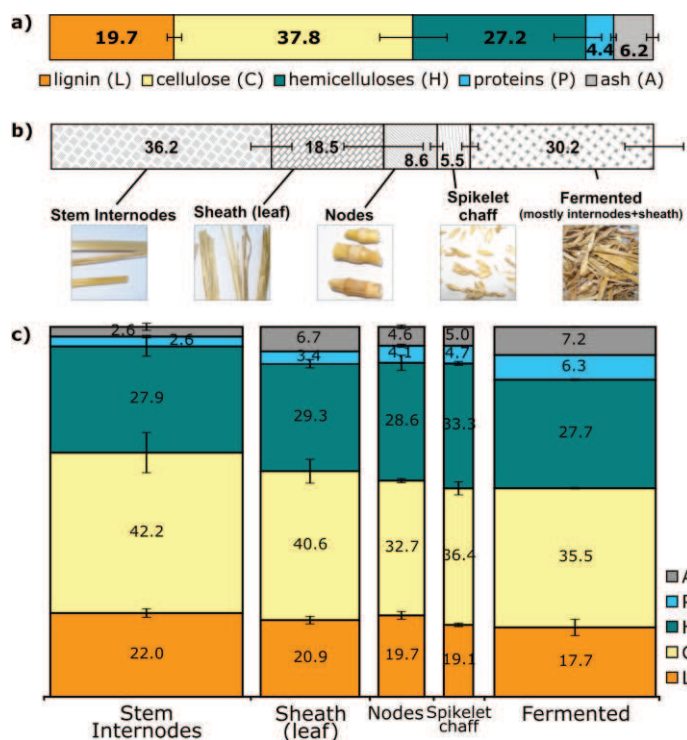


Fig. 39 a) Biochemical composition of wheat straw. b) Percent mass distributions of wheat plant parts and their c) biochemical compositions (column widths are proportional to their fraction yields).

Separating the wheat straw into its anatomic parts – internodes, nodes and leaves, might be interesting in selecting particular characteristics, e.g. more easily hydrolysable/convertible fractions. For corn stover samples, fractions with high content of corn leaf were found to be more susceptible to hydrolysis by a cellulase (Chundawat et al., 2007). Moreover differences in soil decomposition of wheat parts were reported (Bertrand et al., 2006). The proportion of vascular tissues and sclerenchyma cells were the determinant factors in this degradability.

### 3.2 Behaviour of the major straw components upon centrifugal grinding

As expected, sequential grinding steps reduced progressively particle sizes that reached 45 µm as median particle size (D50 – Fig. 40). These particle sizes were lower than previously reported for similar types of grinding (Bitra et al., 2009; Bridgeman et al., 2007; Mani et al., 2004; Zhu et al., 2009) and similar to corn stover powders that were ground with a same equipment (Chundawat et al., 2007). As particle size decreased, spread distribution (DI) increased, meaning that there existed different particle groups

exhibiting different behaviours upon grinding. Ground powders were 50  $\mu\text{m}$ -sieved and the fractions that passed through the sieve were analysed to follow the component “grindability” range during the sequential grinding (Fig. 41).

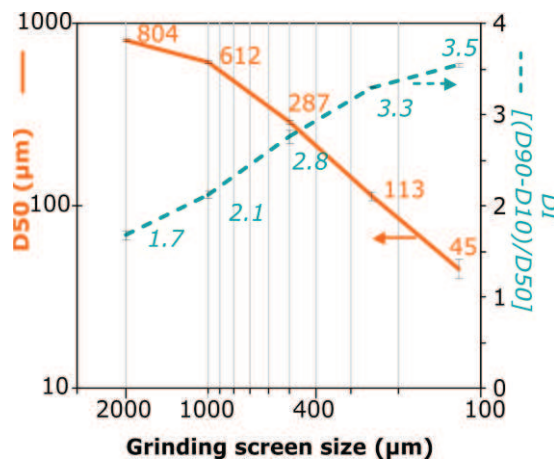


Fig. 40 Median size (D50 value) of particle and dispersion index (DI) defined by the difference between the 90th and 10th percentile values (D90 and D10) divided by the mean value (D50).

The composition of the fine fraction from the firstly ground powders differed the most from the entire straw compositions (Fig. 41a). Fraction compositions tended to resemble entire straw composition with the increment of grinding steps (I to V). Proteins and ash were relatively much more concentrated in the fine fraction of 1-fold ground straw, indicating that these compounds were already (or easily) dissociated.

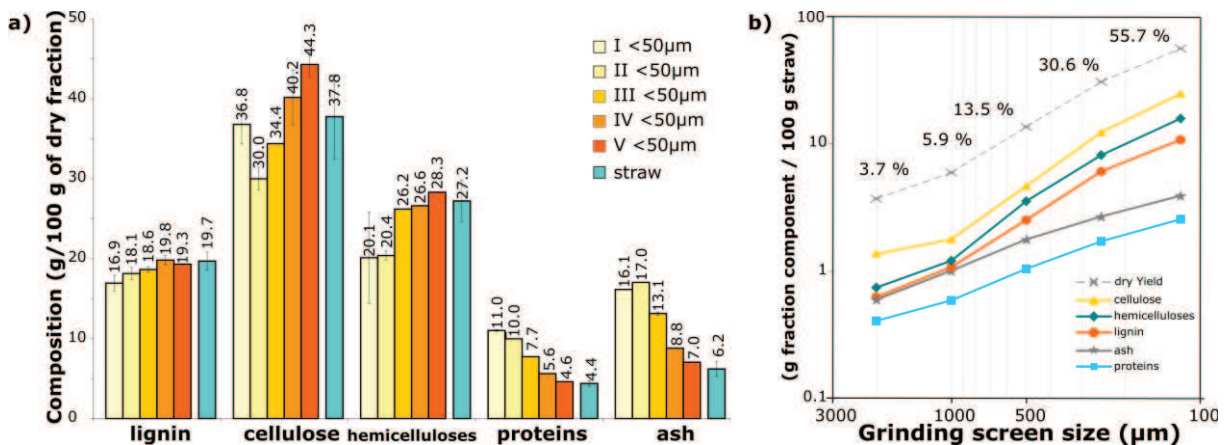


Fig. 41 a) Compositions of fine fractions (<50  $\mu\text{m}$ ) of wheat straw successively ground and b) component recoveries. Sample were successively reduced with I) 2 mm, II) 1 mm, III) 0.5 mm, IV) 0.25 mm and V) 0.12 mm screens by 12,000 rpm centrifugal grinding. b) Cellulose, hemicellulose, lignin, ash and protein grinding curves represented by their component recoveries at each grinding step. The recovery is calculated by  $Y \times C$  where Y is the dry yield (%g <50  $\mu\text{m}$  fraction/g straw) and C is the fraction concentration (%g component/g <50  $\mu\text{m}$  fraction).



On the grinding curves (Fig. 41b), when a component curve is parallel to the yield curve it means this component was ground evenly at each step. Ash and proteins seemed to be ground similarly due to their parallel grinding patterns. Likely, hemicellulose and lignin exhibited similar “grindabilities” (sharper than others). In contrast, cellulose had a different grinding behaviour. Therefore, there were three different groups of components exhibiting different behaviours upon grinding, in straw: ash+proteins, lignin+hemicelluloses, cellulose.

### 3.3 Distribution of major components in fine straw powder

Coarse straw powders were highly heterogeneous with respect to particle characteristics: size (Fig. 40 – DI), particle shapes and roughness, as shown in Fig. 42. However fine straw powder produced by centrifugal grinding was much more homogeneous when compared to powders with larger particle sizes.

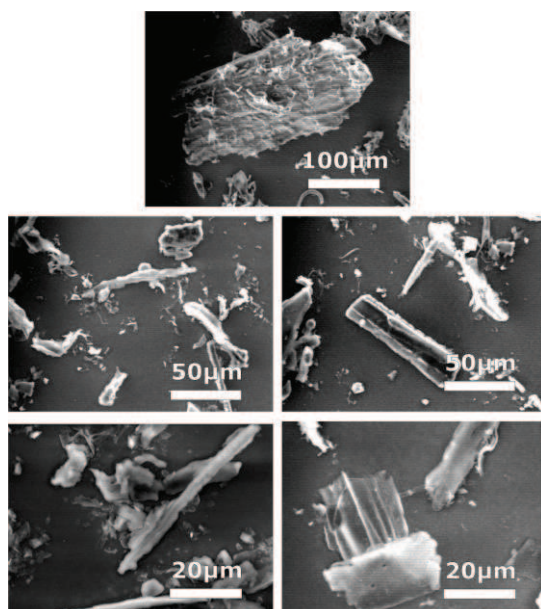


Fig. 42 Scanning electron micrographs of 0.12mm-screen ground wheat straw.

Particle size classes exhibited different compositions (Fig. 43). More than 50% of 0.12 mm-screen ground straw passed through a 50 μm sieve with two distinct fractions. The 0-25 μm fraction was high in ash and protein whereas the 25-50 μm fraction was richer in cellulose. Chundawat et al. (2007) also observed that larger sized particle had higher cellulose and hemicellulose contents and finer fractions were richer in proteins and water soluble components and had lower hemicellulosic content. The fractions 0-25 and 25-50 μm may be interesting due to their contrasted compositions together with their reduced particle sizes (higher reactivity). Bridgeman et al. (2007) suggested that the smallest size fractions with high ash content would be the lowest quality streams for fuels

but still suitable for combustion, and enabling recycling of mineral nutrients to the soil. Other applications of plant ash fraction can be conceived due to its high silica content with specific characteristics such as high solubility (Currie & Perry, 2007) in contrast to inorganic silica. However, more efficient separation techniques should be implemented in order to obtain fractions of more contrasted compositions.

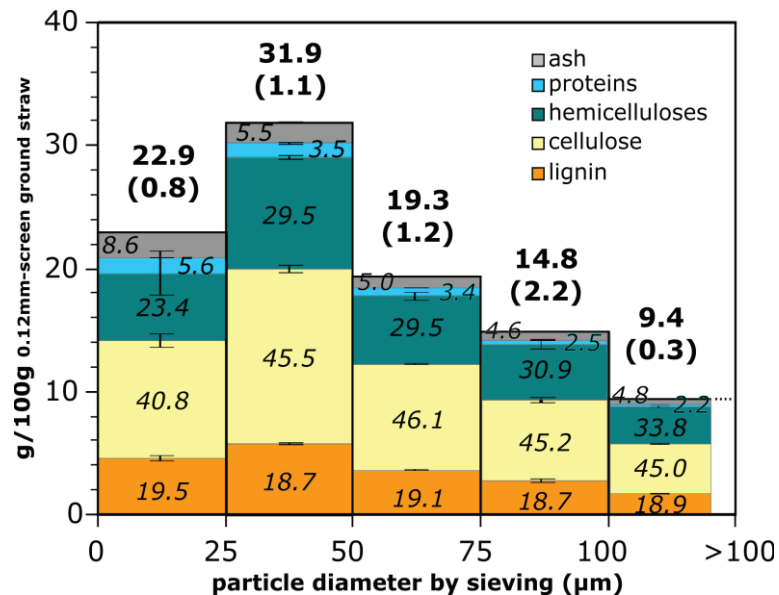


Fig. 43 Size distribution by sieving intervals in mass percentage of 0.12 mm-screen ground wheat straw. Inside colours represent the cellulose, hemicellulose, lignin, proteins and ash concentrations of sieved fractions. Values in Bold are the fraction dry yield (g dry fraction/100 g dry ground straw) (standard deviation), values in Italic are the component concentration (g/100 g dry fraction).

## Conclusions

Wheat straw presented a non homogeneous reduction behaviour when finely ground. Distinct sieved fractions were produced suggesting that sieving can constitute a first dry fractionation step resulting in a preliminary enrichment of desirable components of biomass into suitable fractions for different applications. Selection of anatomic parts might also compose a stage of biomass fractionation giving direction to specific ways of conversions and improving their effectiveness.

There is a need to reduce still more the particle size to reach more efficient dissociation of component assembly by accessing the suitable level of heterogeneity. The association of centrifugal grinding with other reduction modes are being studied in order to breakdown lignocellulose assembly more efficiently and to increase straw reactivity. Additionally these grinding steps can be also interspersed with sieving. The resulting fractions will be tested to determine their reactivity (enzymatic saccharification and anaerobic fermentation).

Energy requirement remains a limiting factor for grinding to be an economic pretreatment for lignocellulose conversion. More work is necessary to enhance benefits of dry pretreatments compared to hydrothermal and chemical pretreatments of biomass.

## **Acknowledgements**

The authors thank Yannick Mellerin for excellent technical assistance.

## **IV.3 Note: Cryogenic grinding (intermediate steps)**

### **1 Introduction**

This note presents a further study on wheat straw grinding which aimed to produce still finer particles by impact grinding. The objectives were to evaluate the effects of two conditions of impact grinding affecting the mechanical behavior of fibrous materials: the cryogenic conditions (temperatures lower than 0°C) in order to make wheat-straw more brittle; and ii) the effect of varying wheat-straw water content since this impacts its plastic behavior (more water, more plastic behavior as water acts as plasticizing).

### **2 Materials and methods**

After the preliminary tests using the wheat-straw lot from 2007 (samples IG0.2mm, IG0.3mm and IG0.3mm cryo in Fig. 50), a second lot of wheat straw was used which was harvested in 2008 from the same origin.

Impact grinding (type 100 UPZ, Hosokawa Alpine, Germany) was carried out varying: the size of grinding sieve (0.1, 0.2 and 0.3mm), the temperature of grinding (room temperature, -30°C and -100°C) and the water content of wheat straw (natural = 9%, dried at 40°C = 5% and mixed with water overnight to ~20% w.b.) The feeding product was CM2mm.

Particle size distributions were determined from 0.02 µm to 2000 µm using a laser diffraction particle size analyser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Particle size distribution is characterised by the median diameter (d50) and span defined as  $(d90-d10)/d50$ , where the d10, d50 or d90 values represent the 10th, 50th and 90th percentile of total volume assuming a spherical shape of particles.

### **3 Results and discussion**

The results of final particle size and span of varying impact grinding conditions are presented in Tab. 8.

Tab. 8 Median particle size ( $\mu\text{m}$ ) and span of size distribution of wheat straw by impact grinding.

Grinding conditions		Particle size			Grinding conditions		Particle size		
Water content (%)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Sieve size (mm)	median size ( $\mu\text{m}$ )	span	Water content (%)	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Sieve size (mm)	median size ( $\mu\text{m}$ )	span
<b>Effect of sieve size</b>					<b>Effect of grinding temperature</b>				
9	RT	0.5	171	2.6	9	RT	0.3	116	3.1
9	RT	0.3	116	3.1	9	- 30	0.3	100	3.2
9	RT	0.1	69	2.9	9	- 100	0.3	98	3.6
<i>Successive impact grinding</i>					<b>Effect of grinding temperature and water content</b>				
9	RT	0.5 + 0.1	103	3.3	5	RT	0.3	119	3.1
9	RT	0.3 + 0.1	101	3.6	9	RT	0.3	116	3.1
<b>Effect of sieve size and water content</b>					18 ( <i>after 10</i> )	RT	0.3	123	3.1
5	RT	0.3	119	3.1	5	- 30	0.3	106	2.2
9	RT	0.3	116	3.1	9	- 30	0.3	100	3.2
18 ( <i>after 9.9</i> )	RT	0.3	123	3.1	5	- 100	0.3	108	3.6
5	RT	0.1	68	3.1	9	- 100	0.3	98	3.6
9	RT	0.1	69	2.9	20 ( <i>after 31</i> )	- 100	0.3	79	2.3
<i>Successive impact grinding</i>									
5	RT	0.3 + 0.1	97	3.1					
9	RT	0.3 + 0.1	101	3.6					

**SIEVE SIZE** Generally, as discussed in the previous section (article 1 and 2), as the sieve size is reduced, the particle size is reduced as well. Therefore, the best results on particle size reduction were obtained by using the 0.1 mm grinding sieve ( $\sim 70\mu\text{m}$ ).

**SUCCESSIVE OPERATIONS** Since grinding with the 0.1 mm sieve produced smaller sized wheat straw than successively grinding with a 0.5 or 0.3 then with a 0.1 mm sieve, successive operations of impact grinding are not effective to produce more fine particles. This result was different to that observed for centrifugal *vs.* Successive centrifugal grinding (particle size of CG0.5mm > SG 0.5mm, presented in Article 1). It seems that in impact grinding bigger sized feeding material allow more impact thus breaking of particles. When the particles were smaller sized by the 0.5 or 0.3 mm prior operation they could pass through the sieve with less size reduction. This different effect of sieve size on successive operations of centrifugal grinding and impact grinding is probably due to the additional effect of the output type, which means: how ground particles are recovered? In centrifugal grinding, particles are pulsed by the action of centrifugal rotation (generated air flow), after exiting the grinding chamber, they pass into a cyclone where they loss speed, reach the cyclone wall and descend to the recovery vessel, with the air going up. In impact grinding, in addition to the pulsing effect created by centrifugal rotations, the air is forced to go up by aspiration which is connected to the top of the cyclone. This aspiration device is used to avoid clogging and to facilitate the particle exhaust flow; however, in the case of elongated particles, it can promote their orientation along the air flow. It allows the oriented particles to pass through the sieve longitudinally and not to be further ground in their major axis. As the most elongated particles were the biggest (discussed in article 1, Chapitre IV.1), the final median particle size is also increased.

**CRYOGENIC GRINDING** Very few differences in particle size were obtained by grinding at -30 or -100°C compared to room temperature grinding. We observed an improvement of 16% in size reduction (-100°C particle size / RT particle size). This result was already observed for the first lot of wheat straw (harvested in 2007), where cryogenic IG allowed a 20% enhancement in particle size reduction (22 µm between IG0.3mm and IG0.3mm cryo). Only by grinding in cryogenic condition a higher moistured product allowed further reduction (~20 µm) using a 0.3 mm sieve. This may be related to the congelated water which render the structure more brittle, leading to slightly better reduction. Nevertheless, the particle size obtained with the 0.1 mm sieve was still inferior to that condition (-100°C and 20 % water).

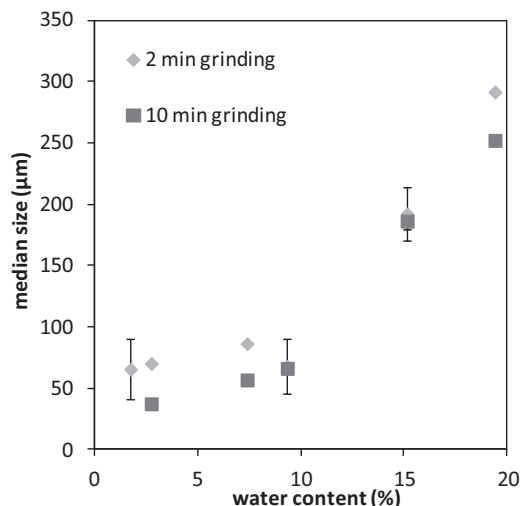
These enhancements allowed by cryogenic temperatures were relatively smaller than the results obtained by Hemery et al. (2011) who verified a 72% improvement in particle size reduction of wheat bran using similar conditions (median particle sizes ~180 µm and ~50 µm at RT and -100°C, respectively). In order to dissociate the effect of passing through a sieve from the cryogenic temperature effect on WS, CM 2mm was ground with another type of mechanical solicitation using a lab-scale ball mill (~2 g sample, MM400, Retsch, Germany). With this lab mill, the cryogenic condition allowed a further reduction in median particle size of 45% compared to RT condition (5 min milling time). This positive effect of cryogenic condition demonstrates that wheat straw particles were indeed more brittle in low temperatures. However, in a sieve-based grinder (impact), they were probably oriented along the air flow and passed through the sieve without further reduction in spite to their better ability to be reduced. Apparently, another type of pilot-scale grinder than sieve-based grinding would be more profitable in order to maximise the positive effect of low temperatures on particle breaking-down ability.

Tab. 9 Effect of cryogenic grinding CM2mm in a lab-scale ball mill (MM400, Retsch, GE).

milling time (min)	Temperature condition	median size (µm)	span
5	RT	65.9	4.9
5	Cryo	37.3	5.5
10	RT	36.7	4.9
10	Cryo	22.9	4.4

**VARYING MOISTURE CONTENT** Preliminarily to this study, we verified that moisture content was directly related to the final particle size after grinding in a lab-scale ball mill (Fig. 44). In the latter experiment CG0.5mm product was equilibrated in different relative humidities or dried in order to vary its moisture content. These preliminary results were expected since water has a plasticizing effect of mechanical properties of materials. Furthermore, Hemery et al. (2010) had already reported this effect on wheat bran.

Fig. 44 Median particle size as a function of moisture content. CG0.5mm with different moisture contents was ground with a lab-scale ball mill (MM400, Retsch, GE).



Even though final particle size of wheat straw ground in a ball mill was affected by moisture content, in impact grinding this effect was not verified : the final particle sizes of wheat straw ground at 5, 9 and 20 % water were similar ( $\sim 120$  and  $\sim 70$   $\mu\text{m}$  for 0.3- and 0.1 mm-sieve sizes, respectively). It seems that the mechanical properties of wheat straw were indeed modified by moisture content but in this type of impact grinder this modification did not overcome the aspiration effect discussed before. The particles were mostly selected by their elongated shape which reduced the probabilities of impacts inside the grinding chamber.

These results observed for wheat straw are related to the shape of particles, the mechanisms inside the impact grinding chamber and also to the recalcitrance of wheat straw. The latter can be explained partially by the contrasted results between wheat straw and wheat bran (Hemery et al., 2011; Hemery et al., 2010). It is probably related to : i) the presence of lignin in wheat straw which allows more plastic mechanical behaviour to this material (they are deformed rather than ruptured) and ii) to their macro and microstructure differences. In summary, within the same wheat plant, the outer layers of the grain are more susceptible to be reduced than its straw. Silva et al.(2011) also noted that sugar cane straw was more difficult than sugar cane bagasse to be ball milled, seeming to be very recalcitrant owing to the presence of lignin..

## 4 Conclusions

Impact grinding wheat straw was more efficient when equipped with smaller sized sieves. Moisture content and grinding in cryogenic temperatures affected wheat straw grindability at lab-scale (less water and lower temperatures allowed more brittleness). However, owing to the configuration of the impact grinder, the particles were oriented to pass the sieve without further reduction. Nevertheless, the best compromise must be



found with the best operating conditions considering not only final particle size but also technical feasibility (e.g. aspiration module is compulsory in some grinding systems, choice of rotational speed to avoid heating...), time and energetic requirement of grinding operations. Finally, neither cryogenic condition nor varying moisture content appeared to be worthwhile for our impact grinding system to grind wheat straw. Further studies on the effects of cryogenic temperatures during grinding should be applied to grinding modes where particles do not exit the grinding chamber (e.g. ball milling). Only cryogenic grinding associated to the increase of moisture content exhibited slight enhancement of size reduction. Further studies must be carried on with higher moisture contents to verify the effectiveness of this effect. In addition, this can be of interest to treat ligno-cellulosic products exhibiting high moisture after harvest, which generally is very detrimental to grinding at room temperature.

## **Conclusions du chapitre IV**

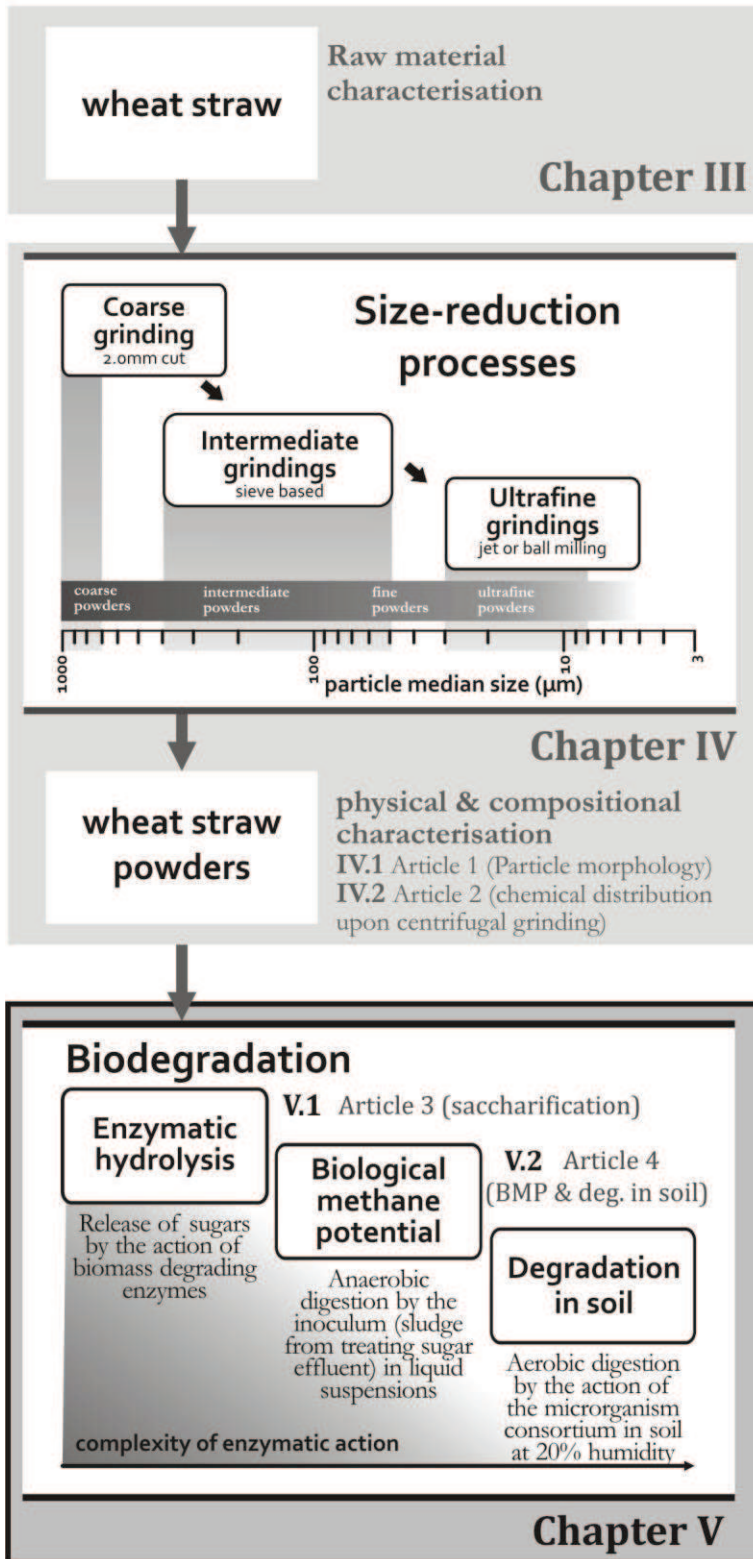
Les diagrammes de broyage fin et ultrafin de la paille ont été développés en utilisant trois modes de broyage. La complexité de ces opérations, associée à la structure complexe de la paille, s'est traduite par l'obtention d'une grande variété de particules en termes de propriétés morphologiques et de distribution des constituants. La paille de blé est donc une matière première dont la réduction est difficile et complexe.

# CHAPITRE V

## BIODEGRADATIONS

V.1 Article 3. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw	117
V.2 Article 4. Bioconversion of ultra-finely ground wheat straw: anaerobic degradation and decomposition in soil.....	141
Conclusions du chapitre V .....	162

# Ultra-fine biomass processing



## V Biodégradations

Nous avons vu que la paille de blé était une matière complexe et que ses particules présentent une variabilité considérable au sein de chaque broyat. De plus, nous avons produit des poudres de paille de blé plus fines qu'usuellement décrites dans la littérature.

Cette réduction de taille poussée affecte potentiellement les procédés enzymatiques par plusieurs effets: i) l'augmentation de la surface de contact peut accélérer les vitesses de réaction, ii) par la réduction de la taille et la dissociation des tissus/parois cellulaires, de nouvelles zones sont exposées aux enzymes, augmentant ainsi l'extension des réactions et iii) grâce aux changements de structure interne du réseau ligno-cellulosique, les réactions peuvent être accélérées et plus extensives. De même, les variations de structure au sein des particules d'un même broyat peuvent aussi entraîner des variations des dégradations par particules, affectant ainsi la dégradation globale.

Lors des dégradations enzymatiques (saccharification), ces effets sont plus susceptibles d'avoir lieu. Dans le cas des dégradations biologiques par des microorganismes, ces effets sont plus complexes, du fait de l'action d'un pool microbien comprenant différentes étapes, ce qui apporte de nouvelles contraintes à la conversion. Enfin, quand ces dégradations biologiques ont lieu dans des systèmes à mobilité réduite (avec peu d'eau), d'autres contraintes sont encore imposées concernant par exemple la migration des substrats solubles et la colonisation de la surface du substrat par les microorganismes.

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à évaluer comment les caractéristiques des poudres de paille, et notamment leur état de structuration, pouvait affecter les dégradations enzymatiques avec différents niveaux dans la complexité des conditions d'attaque (enzymes, pool microbien, mobilité, présence ou absence d'oxygène) : l'hydrolyse enzymatique en suspension liquide (article 3<sup>3</sup>), la digestion anaérobie en milieu liquide et solide (article 4), et la décomposition aérobie dans le sol (article 4<sup>4</sup>). De cette manière, nous pouvons aussi évaluer le potentiel de production de bioéthanol (grâce à la solubilisation enzymatique de glucose et de pentoses) et de biogaz (méthanisation). La décomposition dans le sol, quant à elle, présente un intérêt particulier lié à la compréhension de ses mécanismes en lien avec les études de biodégradabilité des matériaux composites (pouvant incorporer la paille broyée comme charge dans une matrice biodégradable<sup>5</sup>).

---

<sup>3</sup> L'article 3 résulte des travaux menés lors d'un séjour à Marseille-Luminy en Juillet 2009 à l'UMR Biotechnologie des Champignons Filamenteux sous l'encadrement du Dr. Jean-Guy Berrin. L'état des broyats quant à la cristallinité de leur cellulose a été évalué en collaboration avec le Dr. Alain Buléon et Bruno Pontoire de l'Unité INRA Biopolymères Interactions Assemblages à Nantes.

<sup>4</sup> Les tests de méthanisation ont été réalisés en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement à Narbonne sous l'encadrement de la Dr. Claire Dumas. Les décompositions dans le sol ont été effectuées à l'UMR Fractionnement des Agroressources et Environnement à Reims sous la direction de la Dr. Sylvie Recous et Oliver Delfosse, le démarrage a été initié lors d'un stage d'une semaine en Juillet 2010 dans cette unité. Les résultats issus de ces bioconversions sont compilés dans l'article 4.

<sup>5</sup> Dans le cadre d'une collaboration avec la Dr. Hélène Angelier et la Dr. Valérie Guillard, les pailles produites dans cette thèse ont été utilisées pour l'incorporation de films de gluten. Cette collaboration a donné lieu à une publication en cours de préparation sur les propriétés mécaniques et barrières de ces biomatériaux.



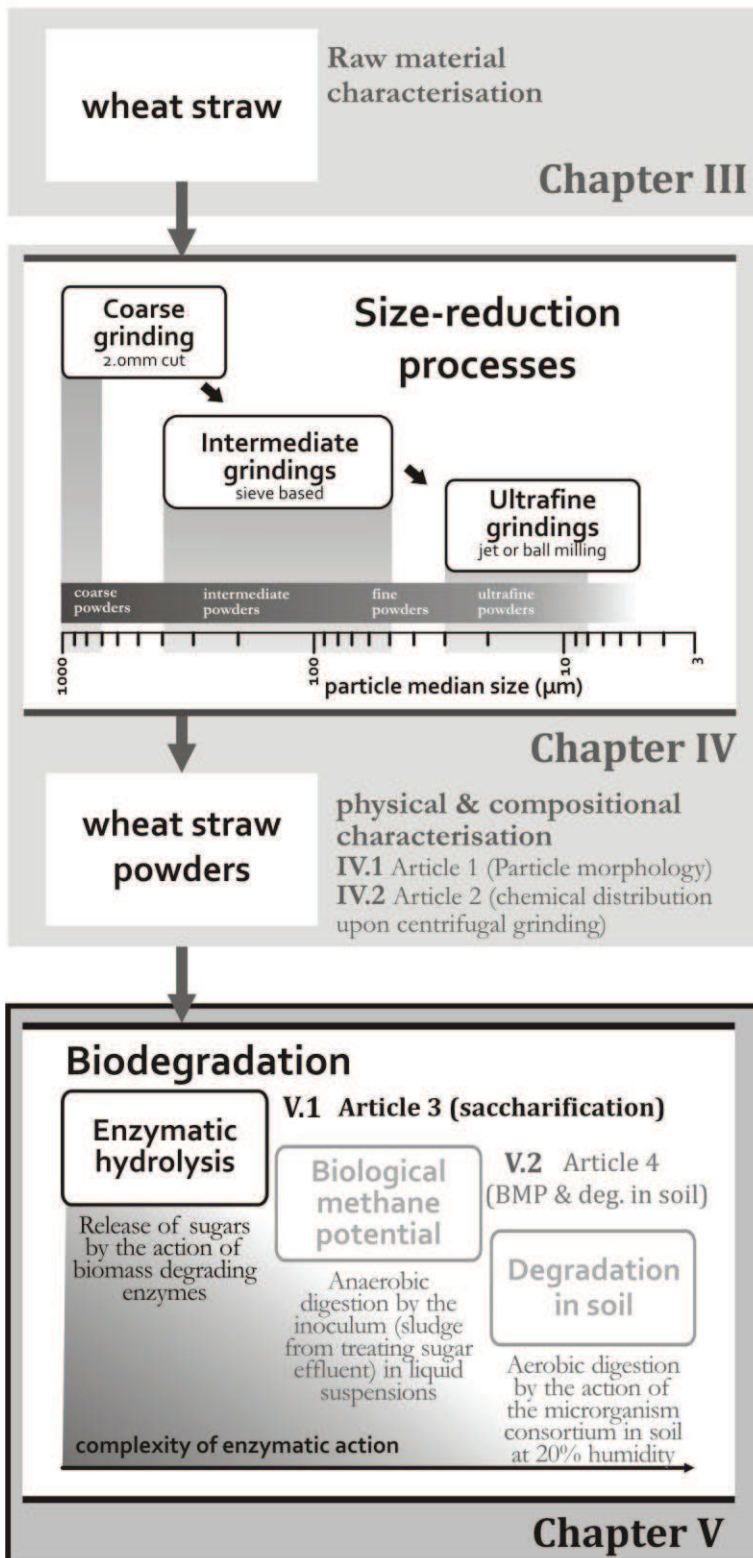
# CHAPITRE IV.1

## ARTICLE 3. EFFECTS OF GRINDING PROCESSES ON ENZYMATIC DEGRADATION OF WHEAT STRAW

Abstract.....	117
Highlights .....	117
Keywords.....	117
1 Introduction.....	118
2 Materials and methods.....	119
2.1 <i>Starting material</i> .....	119
2.2 <i>Grinding methods - Particle size reduction</i> .....	120
2.3 <i>Particle size measurements</i> .....	120
2.4 <i>Relative crystallinity</i> .....	120
2.5 <i>Enzymatic hydrolyses</i> .....	121
2.6 <i>Statistical Analysis</i> .....	122
3 Results.....	122
3.1 <i>Composition of raw materials</i> .....	122
3.2 <i>Particle size reduction</i> .....	123
3.2.1 <i>Sieve-based grindings</i> .....	123
3.2.2 <i>Grinding to ultra-fine particles</i> .....	125
3.3 <i>Effects of particle size reduction on the kinetics of enzymatic degradability</i> .....	126
3.4 <i>Enzymatic saccharification of ground wheat straw</i> .....	127
3.4.1 <i>Sieve-based grindings</i> .....	127
3.4.2 <i>Ball and air-jet millings and comparison to steam explosion</i> .....	128
3.5 <i>Cellulose structure</i> .....	130
4 Discussion.....	132
4.1 <i>Overall effect of grinding on enzymatic hydrolysis</i> .....	132
4.2 <i>Main effect of rapid grindings: effect of particle size until a threshold of carbohydrate release</i> 132	
4.3 <i>Ball milling: further effect on structure</i> .....	133
4.4 <i>Grinding vs. steam explosion: similar enzymatic carbohydrate solubilisation</i> .....	134
Conclusion.....	134
Acknowledgements .....	135
Appendix A. Supplementary methodology.....	135
Supplementary Materials and Methods .....	136
<i>Supplementary methodology 1. Compositional analyses</i> .....	136
<i>Supplementary methodology 2. Grinding methods - Particle size reduction</i> .....	136



# Ultra-fine biomass processing



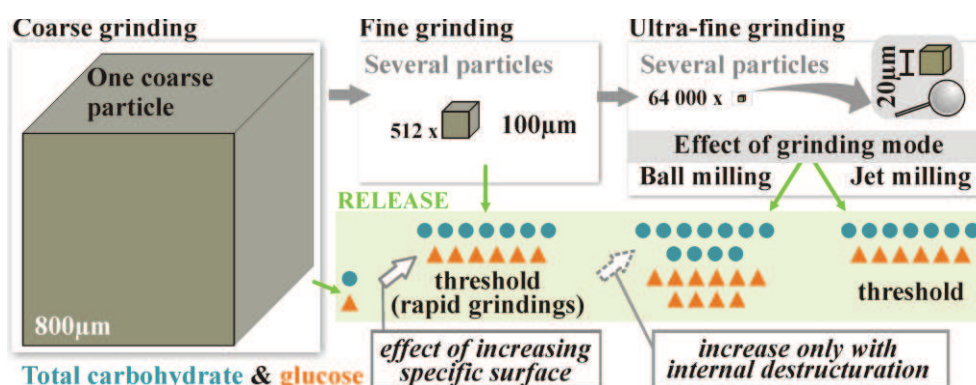
## V.1 Article 3. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw

Gabriela Ghizzi D. Silva, Marie Couturier, Jean-Guy Berrin, Alain Buléon, Xavier Rouau.

Published in *Bioresource Technology*, 103, 192-200. 2012.

### Abstract

The effectiveness of wheat straw fine to ultra-fine grindings at pilot scale was studied. The produced powders were characterised by their particle-size distribution (laser diffraction), crystallinity (WAXS) and enzymatic degradability (T. reesei enzymatic cocktail). A large range of wheat-straw powders was produced: from coarse (median particle size  $\sim 800 \mu\text{m}$ ) to fine particles ( $\sim 50 \mu\text{m}$ ) using sieve-based grindings, then ultra-fine particles  $\sim 20 \mu\text{m}$  by jet milling and  $\sim 10 \mu\text{m}$  by ball milling. The wheat straw degradability was enhanced by the decrease of particle size until a limit:  $\sim 100 \mu\text{m}$ , up to 36 % total carbohydrate and 40 % glucose hydrolysis yields. Ball milling samples overcame this limit up to 46 % total carbohydrate and 72 % glucose yields as a consequence of cellulose crystallinity reduction (from 22 to 13 %). Ball milling appeared to be an effective pretreatment with similar glucose yield and superior carbohydrate yield compared to steam explosion pretreatment.



### Highlights

Grinding wheat straw favours both its rate and extent of enzymatic hydrolysis. Particle size reduction improves biomass accessibility to enzymes up to a limit. Depending on grinding process, structural changes occur in addition to fragmentation. Ball milling improved hydrolysis to similar yields as with steam explosion.

### Keywords

Micronization, pulverization, particle size, lignocellulose, saccharification.

## 1 Introduction

Lignocellulosic biomass is a potential material for bioethanol production, methanisation, combustion, chemicals and composite-material production. It is composed of a cellulose network embedded in a hemicellulose/lignin matrix. Hydrogen bonds and van der Waals forces between cellulose chains result in a crystalline structure. In the case of wheat straw, the hemicelluloses are mainly composed of xylan chains substituted with arabinose units. Lignin is a complex polymer of *o*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl units that are present in various proportions according to their botanical origin. Lignin and hemicelluloses principally represent the amorphous phase of plant cell wall (Fengel & Wegener, 1984).

(Enzymatic) hydrolysis is one of the first steps of bioconversions (e.g. 2<sup>nd</sup> generation bioethanol or biogas productions). This essential step is considered as a limiting stage for biomass conversion (Hendriks & Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005; Palmowski & Muller, 2003; Sánchez & Cardona, 2008). During this stage, cellulose and hemicelluloses are broken down to their monomeric components to be further fermented for bioenergy production (bioethanol, biogas and biohydrogen).

Substrate characteristics affecting enzymatic degradation of biomass have been largely reviewed. Cellulose has been held as the main factor responsible for biomass recalcitrance due to its degree of crystallinity (Hall et al., 2010; Mosier et al., 2005). However, many researchers have concluded that it was only one of the influential factors. Other factors affecting enzymatic degradation of complex substrates (in contrast with model substrates), are polymerisation degree, cellulose porosity, particle size (specific surface area), lignin and hemicellulose content and their spatial distribution (Chandra et al., 2007; Hendriks & Zeeman, 2009; Mansfield et al., 1999; Park et al., 2010).

Several pretreatments (alkaline, acid, oxidative, solvent, physical, thermal etc) have been developed in order to alter these biomass properties allowing it to be more accessible to enzymes (Hendriks & Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005). These processes are expensive and generally imply effluents treating and/or solvent recovery. Dry grinding potentially pretreat biomass increasing its reactivity without any effluent production. However, energy consumption is held to be the limiting factor of applying biomass fine grinding industrially. Nevertheless, understanding the maximum potentials of these processes may be the first step before optimising their energy consumption and, finally, determining the general economical feasibility.

The degree of polymerisation, crystallinity degree, porosity and specific surface are potentially altered by grinding processes, depending on the grinding conditions, intensity

and/or type (breaking mechanism). Specifically, final particle size can vary greatly depending on type and conditions of grinding. Consequently, reduction of particle size improved the degradabilities of different biomasses (Palmowski & Muller, 2003; Vidal et al., 2011; Zhu et al., 2009). The best effects of particle size reduction were associated to structural alterations carried out by different grindings modes. Ball milling and vibratory (rod or ball) milling have been shown to reduce cellulose crystallinity and thus to improve hydrolysis yield (Chang & Holtzaple, 2000; Hidenon et al., 2009; Inoue et al., 2008; Kawakubo et al., 2010; Millett et al., 1979; A.S.A. Silva et al., 2010). These ball milling processes were often carried out in laboratory scale grinders (e.g. vibratory ball mill, planetary ball mill...) using high frequency vibrations (from 250 to 1800 rpm) up to 50 g loading. These conditions are industrially unviable to be applied on biomass pretreatment. To the best of our knowledge, no ball milling studies were developed under more realistic conditions (pilot scale: more than 1 kg, less frequent vibrations than lab-scale grinders). Owing to the fact that comminution of agricultural biomass is usually carried out by chipping (30-10 mm) and grinding down to 2-0.2 mm (Sun & Cheng, 2002), studies on pilot-scale grindings concern mainly chipping, hammer and cutting milling with sieve sizes down to 1.6 mm (median particle sizes until ~0.5 mm) (Adapa et al., 2011; Bitra et al., 2009; Mani et al., 2004).

There is a need to understand the effects of particle size and other structural changes produced by different grinding modes, especially at pilot-scale and on untreated biomass as substrates. Since grinding can affect hydrolysis, it is interesting to assess both technical feasibility and impact of smaller particle size reducing methods (fine, <100 µm, and ultra-fine, below ~25 µm). Additionally, one must be able to decouple the effects of internal cellulose changes to those of particle size reduction.

In this study, we developed wheat straw grinding processes in pilot scale by means of cutting milling, centrifugal and impact grinding, and two potentially ultra-fine grindings: ball milling and air-jet milling. We further investigated how these different grinding modes impacted particle size, cellulose crystallinity and saccharification and compared results to with steam-exploded wheat straw (SE-WS).

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Starting material**

Wheat straw (*T.aestivum* cv. Apache) was kindly provided by Fernand Meaux (St. Jean du Salés, Aveyron, France), harvested in 2007 and used for grinding experiments with 8 % (w.b.) moisture content. SE-WS (*T.aestivum* cv. Apache) was provided by VALAGRO (Poitiers, France) and was processed as described in (Tabka et al., 2006). The

final yield of the fraction SE-WS was 46 g SE/100 g starting wheat straw. The compositional analyses of wheat straw and SE-WS are described in Supplementary methodology 1 (p. 136). The 5C-rich liquid fraction of steam explosion treatment was not used in this work, although other uses are possible (Gravitis et al., 2004).

## 2.2 Grinding methods - Particle size reduction

The grinding experiments carried out in the present work were performed in a multistep diagram. The sample preparations and grinding principles are summarised in Supplementary methodology 2 (page 136). For all tested processes, wheat straw was preliminary reduced by cutting milling. In order to produce ultra-fine powders, suitable grinding conditions were obtained by carrying out an intermediate step of sieve-based grinding prior to ball milling or air-jet milling. The water content of wheat straw was ~8 % for all grinding operations. Please consult the Supplementary methodology 2 (p. 136) for detailed methodology of grinding experiments: preliminary size reduction by cutting milling, one-step centrifugal grinding, successive centrifugal grindings, impact grinding, ball milling and jet milling.

## 2.3 Particle size measurements

Particle size distributions were determined from 0.02  $\mu\text{m}$  to 2000  $\mu\text{m}$  using a laser diffraction particle size analyser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Particle size distribution is characterised by the median diameter (d50) and span defined as  $(d90-d10)/d50$ , where the d10, d50 or d90 values represent the 10th, 50th and 90th percentile of total volume assuming a spherical shape of particles. Although biomass particles are known to be elongated (not spherical), this technique allows an acceptable comparison between samples. It was chosen due to its rapidity (few minutes per measurement) and reproducibility.

## 2.4 Relative crystallinity

Wide angle X-ray scattering (WAXS) diffractograms were recorded from 20 mg ground samples using a Bruker D8 X-ray diffractometer (Karlsruhe, Germany) equipped with a two dimensional Gadds detector. The X-ray radiation Cu  $K\alpha_1$  ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ), produced in a sealed tube at 40 kV and 40 mA (500  $\mu\text{m}$  beam diameter). All diffractograms were normalized at the same total area under the scattering curve over the Bragg angle range 3–40° (2 $\theta$ ). Relative crystallinity was determined using the method of Wakelin et al. (1959). Crystalline standard was acid hydrolysed cellulose of tunicin. Amorphous standard was water reprecipitated cellulose from sulphuric acid solutions. This method allows the determination of %Crys with a  $\pm 3$  % precision.



Tab. 10. Grinding conditions used for the preparation of wheat straw powders and their principles.

Process (equipment)	Conditions*	Abbreviation	Feeding**	Principle
<b>Sieve-based grindings</b>				
Cutting milling ( <i>SM 2000, Retsch, GE</i> )	2 mm	CM2mm	harvested	Particles are ground until passing through a sieve. Inside the grinding chamber, they are reduced by the high-speed mechanical impacts and shearing occurring between the material and the rotor tooth and/or sieve. In the case of cutting milling, the rotor teeth are knives, therefore, reduction is allowed also by cutting the particles.
Successive centrifugal grinding	1 mm	SC1mm	CM2mm	
Grinding ( <i>ZM 200, Retsch</i> )	0.5 mm	SC0.5mm	SC1mm	
	0.25 mm	SC0.25mm	SC0.5mm	
	0.12 mm	SC0.12mm	SC0.25mm	
Centrifugal grinding ( <i>ZM 200, Retsch</i> )	0.5 mm	CG0.5mm	CM2mm	
Impact grinding ( <i>100 UPZ, Hosokawa Alpine, GE</i> )	0.2 mm	IG0.2mm	CM2mm	
	0.3 mm	IG0.3mm	CM2mm	
<b>Ball milling</b> ( <i>Marne 0, Faure Equipements, FR</i> )				
series i (no sampling)	48 h	BMi48h	CG0.5mm	Particles are ground inside a grinding jar which is supported by two rollers. One roller is driven by an electric motor, the other turns freely. It allows the jar filled with product and grinding media (balls of different diameters) to turn. This movement allows a lifting effect resulting in several impacts of the materials located between the grinding media or jar walls.
	120 h	BMi120h	CG0.5mm	
	240 h	BMi240h	CG0.5mm	
	24 h	BMii24h	CG0.5mm	
series ii (sampling)	48 h	BMii48h	-	
	72 h	BMii72h	-	
	96 h	BMii96h	-	
	120 h	BMii120h	-	
	144 h	BMii144h	-	
	168 h	BMii168h	-	
	192 h	BMii192h	-	
	216 h	BMii216h	-	
240 h	BMii240h	-		
<b>Jet milling</b>				
( <i>100 AFG, Hosokawa Alpine, GE</i> )		JM	IG0.2mm	In air suspension, particles are strongly accelerated (around 500m/s for 6bar pressure) by three air jets. Particles are comminuted by their inter-particle collisions in the focal point of the jet nozzles.

\*For sieve-based grindings: size of sieve hole. For ball milling: milling time.

\*\* Starting material to feed this step of grinding.

## 2.5 Enzymatic hydrolyses

The digestibilities of samples were determined according the automated method described by Navarro et al. (2010). Briefly, suspensions of wheat straw or SE-WS were prepared in a concentration of 6 mg cellulose/mL (10 mg/mL for ground wheat straw samples and 6 mg/mL for SE-WS sample) in sodium acetate buffer (50 mm pH 5 in the presence of 30 µg/mL cycloheximide and 40 µg/mL tetracycline) and maintained under agitation. 96-well microplates were manually filled with 100µL of suspensions per well (at least 8 wells per sample). Using the handling robot (Tecan, Switzerland), 30 µg per well of xylanase-rich enzyme preparation (Tabka et al., 2006) from *T. reesei* CL847 strain was added, then the enzymatic reaction was allowed to proceed for 48 h at 37 °C with constant shaking (8 Hz). *T. reesei* enzyme cocktail contained 0.12 U of filter paper activity, 0.33 U CMCCase, 0.2 U β-glucosidase, 1.6 U xylanase, 0.02 U mannanase and 0.02 U arabinofuranosidase per mg of total protein at 37°C, pH 5.0 (Couturier et al., 2011). All enzymatic releases were calculated as raw data minus control (without enzyme, at least 2 per sample). Results are expressed as mmol glucose equivalent/g wheat straw (dry matter) and referred to in the text as mmol reducing sugar/g. The glucose release was also assessed by adding 10µL of solubilised fraction in 200µL of the Glucose RTU™ kit

(bioMérieux, France) following manufacturer's instructions. Results are expressed as mmol glucose/g. The theoretical maximum of reducing sugars and glucose of wheat straw were measured by the same techniques after acid hydrolysis ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  26N 30 min + 2 h 100 °C 2 N). The hydrolysis yields were calculated as molar ratios.

## 2.6 Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out using OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation) and Matlab R2006a (The MathWorks, Inc.). Results are reported as their replicate means  $\pm$  SD. The normality of each treatment was verified by the Shapiro-Wilk's test. The group of results were first analysed by the Levene's test to verify their homoscedasticity. In cases of normality of treatments and homoscedasticity, the parametric analysis of variance (ANOVA) was carried out. In the other cases, the nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA was done. The Tukey's post-hoc test was used to compare multiple treatment means. All significant levels were set at 0.05.

## 3 Results

The results of this study are presented in four parts. In the first one, wheat straw powders produced by these different grinding processes are characterised by their particle size. The second part presents the effects of grinding processes and conditions on enzymatic hydrolysis kinetics; and third, their effects on the hydrolysis extent. The fourth part concerns the measurements on crystallinity to help understanding the previously presented results. Finally, the discussion section expresses the general effects of grinding on biomass characteristics and its effects on degradation.

### 3.1 Composition of raw materials

Wheat straw was composed of cellulose  $32.0 \pm 0.7$ , hemicelluloses (arabinoxylans)  $20.5 \pm 0.4$ , lignin  $17.4 \pm 0.3$ , extractives  $9.5 \pm 2.2$  and ash  $6.1 \pm 0.1$  g /100 g dry wheat straw. SE-WS was composed of cellulose  $52.8 \pm 0.4$ , hemicelluloses (arabinoxylans)  $3.8 \pm 0.2$ , Klason lignin  $18.6 \pm 0.4$ , extractives  $11.2 \pm 2.5$  and ash  $4.1 \pm 0.0$  g /100 g dry SE-WS.

Cellulose was the major component of wheat straw followed by hemicellulose and lignin. Wheat straw hemicelluloses (arabinoxylans) were mainly linear (xylan chain) with few ramifications by the arabinose substitutions (0.15 ratio arabinose:xylose). The ramification "level" of SE-WS arabinoxylans was comparable with initial wheat straw (0.17 arabinose:xylose) while the hemicellulosic content was strongly reduced. The main effect of steam explosion process of wheat straw was the solubilisation and extraction of 92 % of original hemicelluloses (SE-WS content  $\times$  0.46/wheat straw content, 0.46 is the



mass recovery of SE-WS fraction after steam explosion). Moreover, cellulose was also partially removed (24 %). Furthermore, 51 % of lignin was eliminated either by the washing operations or by the preparation of extractive-free residues needed for Klason lignin analysis (see Supplementary methodology 1). In any case, the lignin structure was indeed altered, and then partially solubilised. As a consequence, the cellulose content of SE-WS was strongly increased. These effects of steam explosion were previously reported (Kristensen et al., 2008).

## **3.2 Particle size reduction**

Median particle size and span of particle size distribution of samples prepared by grinding operations and steam explosion are presented in Fig. 45. The multistep grinding operations of this work allowed the production of wheat straw powders within a large range from 760  $\mu\text{m}$  (CM2mm) up to 9  $\mu\text{m}$  of median particle size (BMi240h).

The first step of grinding experiments, CM2mm (760  $\mu\text{m}$ ), was comparable to common particle size reduction on biomass (0.2-2mm as reviewed by Sun & Cheng, 2002). Its median particle size was similar to those observed by Adapa et al. (2011) and Mani et al. (2004) using a larger sized sieve-grinder (3.2 mm-hammer mill resulting in median particle sizes  $\sim$ 760  $\mu\text{m}$  and 640  $\mu\text{m}$ , respectively), owing to the additional chipping step prior to the hammer milling step.

Comparing one-step processing which started with harvested wheat straw, steam explosion produced finer particles than CM2 mm but with a wider particle size distribution (span = 3.8, Fig. 45B), showing that SE-WS was more heterogeneous than CM2 mm. SE-WS median particle size was similar to 0.5 mm centrifugal grinding (CG0.5 mm).

### **3.2.1 Sieve-based grindings**

Generally, as the sieve size used was smaller, the particle size was also reduced (Fig. 45A), the span in turn was increased (Fig. 45B). Since the overall median particle size decreased, the increase of span shows that fractions of particles were ground differently, consequently increasing the overall heterogeneity in particle size of powders. The initial feeding particle size slightly affected the final particle size since SC0.5mm, which was fed with SC1mm, was smaller (206  $\mu\text{m}$ ) than CG0.5mm (270 $\mu\text{m}$ ), which was fed with CM2mm (their spans followed the overall observation: finer the sample, higher the span). As a consequence, the finest sample was wheat straw successively ground up to a 0.12 mm sieve (SC0.12mm, 47  $\mu\text{m}$ ).

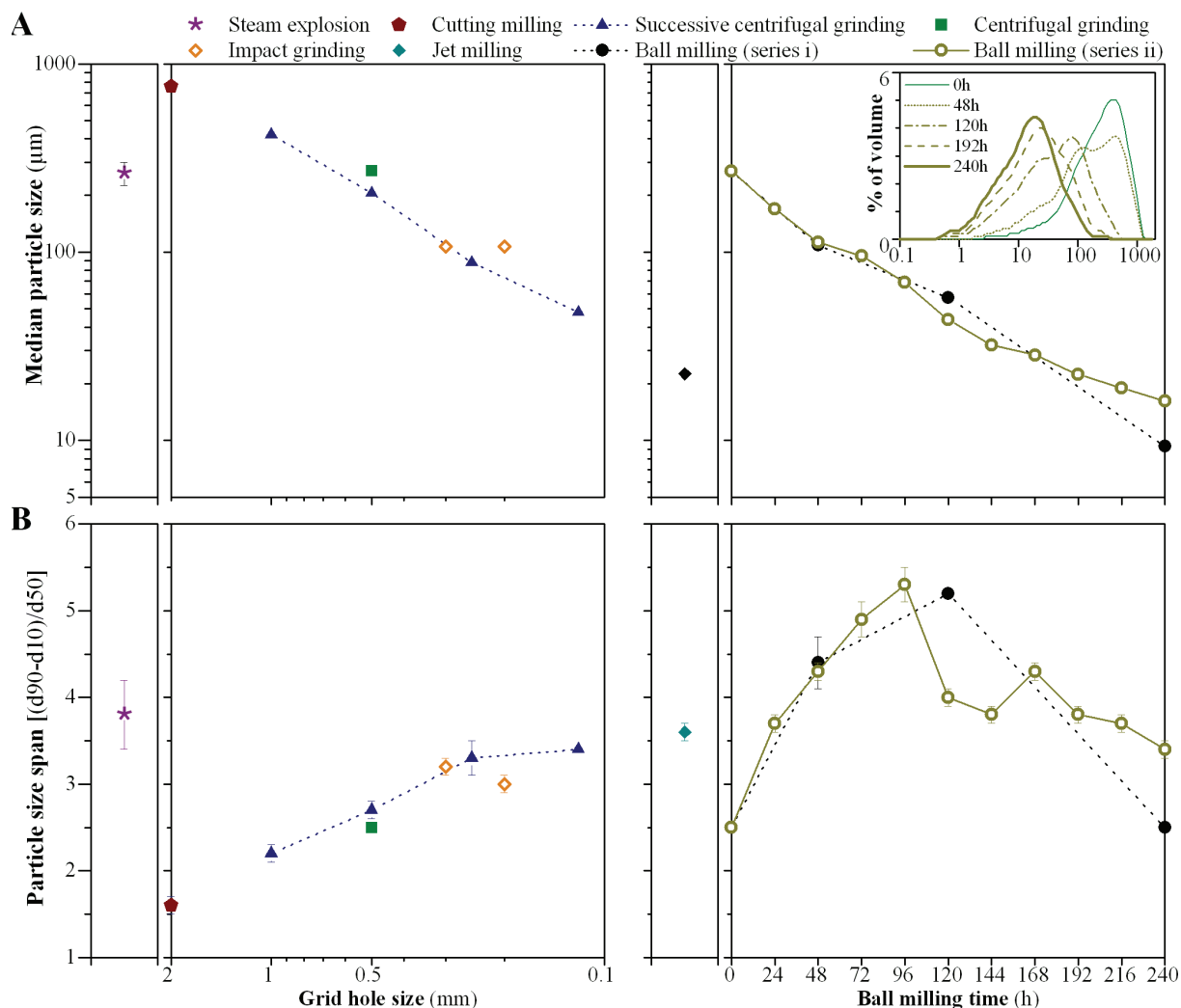


Fig. 45. Median particle sizes (A) and span of particle size distributions (B) as a function of operating conditions (when appropriate). Inset graph (top right): particle size distribution of series ii of ball milling where the abscissa is the diameter ( $\mu\text{m}$ ).

In contrast, impact grinding was not affected by the sieve size as described, median particle size of IG0.3mm was similar ( $107 \mu\text{m}$ ) to that of IG0.2mm; on the other hand, the IG0.2mm span was smaller than IG0.3mm span showing that particles were reduced more homogeneously with a 0.2 mm sieve than with 0.3 mm sieve. This different effect of sieve size on one-step or successive centrifugal grinding is probably due to the additional effect of forced aspiration during the impact grinding. In the case of elongated particles, this aspiration device can promote their orientation along the air flow. It allows the oriented particles to pass through the sieve longitudinally and not to be further ground in their major axis. Thus, the aspiration module in impact grinding can explain the absent difference in particle size between IG0.2mm and IG0.3mm. Indeed, Averous and Digabel (2006) verified this elongated shape of wheat straw particles.

In summary, these sieve-based grindings were more efficient when feeding materials were lower sized, with smaller sieve holes, and with minimum air aspiration. Nevertheless,

the best compromise must be found with the best operating conditions considering not only final particle size but also technical feasibility.

### 3.2.2 Grinding to ultra-fine particles

Ball and jet millings were effective methods to produce ultra-fine wheat straw samples. Their particle size reduction and span of particle size distributions are presented in Fig. 45. Ball milling allowed the reduction from 270  $\mu\text{m}$  to 9  $\mu\text{m}$  (BMi) and 16  $\mu\text{m}$  (BMii). Jet milling reduced wheat straw from 107  $\mu\text{m}$  until 22  $\mu\text{m}$  median particle size. To the best of our knowledge, these small particles sizes ( $<25 \mu\text{m}$ ) of biomasses were only reported for planetary ball milling and jet milling applied on psyllium seed husk (Van Craeyveld et al., 2008), and vibrational rod mill and jet milling of micro-crystalline cellulose (Suzuki & Nakagami, 1999).

Ball milling experiments were carried out over two periods (0-120 h; 120-240 h) with use of different grinding media sizes. The particle size reduction rates were faster during the first 120 h. In that period the span increased implying that ball milling reduced heterogeneously the whole particle population. After 120 h, when grinding media was changed, the rate of particle size reduction was very slow: about 10  $\mu\text{m}/\text{day}$  (6<sup>th</sup> day) and less (7<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> day milling time). In contrast, during this second period of ball milling, the span decreased reaching at the end 2.5 and 3.4 (BMi and BMii, respectively). The multimodal curves (inset graph in Fig. 45A) of particle size distributions from intermediate ball milling times can explain the changes in span values. During the first period, ball milling attacked the larger particles but not all of them; thus the particle distribution exhibited a broadening towards smaller particle sizes and also a little peak around  $\sim 40 \mu\text{m}$  (BMii48h) appeared. As the grinding proceeded, the particle ensemble became smaller; the distribution was displaced but was still spread. Up to this point, different group of particles were ground differently, in such a way that the population was more heterogeneous (increase of span). After 120 h, the curve was slightly displaced (small reductions of median values) but tended to be narrower suggesting that during this period the population of larger particles were being ball milled while smaller particles were already reduced to their final size.

Jet milling produced a wheat straw powder which was equivalent to 192 h of BMii (same particle size and span). Jet milling was fed with a lower sized product than ball milling and was an operation much more rapid than ball milling.

### 3.3 Effects of particle size reduction on the kinetics of enzymatic degradability

Representative samples were enzymatically hydrolysed using a reference fungal enzymatic cocktail for 4, 24 and 48 h in order to assess the initial hydrolysis rate (0-4 h) and hydrolysis total release (24 and 48 h) according to Navarro et al. (2010). Samples were chosen in order to cover the whole range of particle sizes generated in this study: CM2mm, SC1mm, CG0.5mm, SC0.12mm, JM and BMi240h with median particle sizes of 760  $\mu\text{m}$ , 420  $\mu\text{m}$ , 270  $\mu\text{m}$ , 48  $\mu\text{m}$ , 22  $\mu\text{m}$  and 9  $\mu\text{m}$ , respectively.

Generally, the patterns of reducing sugar release were changed as an effect of grinding intensity: the initial rate (0 to 4 h) and the final extent (48 h) of the enzymatic hydrolyses were increased by grinding operations. Comparing to coarsely ground wheat straw (CM2mm), all other grindings consequently led to better yields. Fig. 46 shows that decreasing particle size from 760  $\mu\text{m}$  to 48  $\mu\text{m}$  allowed a 5-fold increase in rate (4 h) and 7-fold increase ( $p < 0.05$ ) in extent of hydrolysis. No improvement in either hydrolysis rate or extent were observed by reducing particle size from 48  $\mu\text{m}$  (SC0.12mm) to 22  $\mu\text{m}$  (JM,  $p > 0.05$ ). Only BMi240h with 9  $\mu\text{m}$  exhibited a further hydrolysis-pattern improvement (7-fold and 11-fold increases on hydrolysis initial rate and extent).

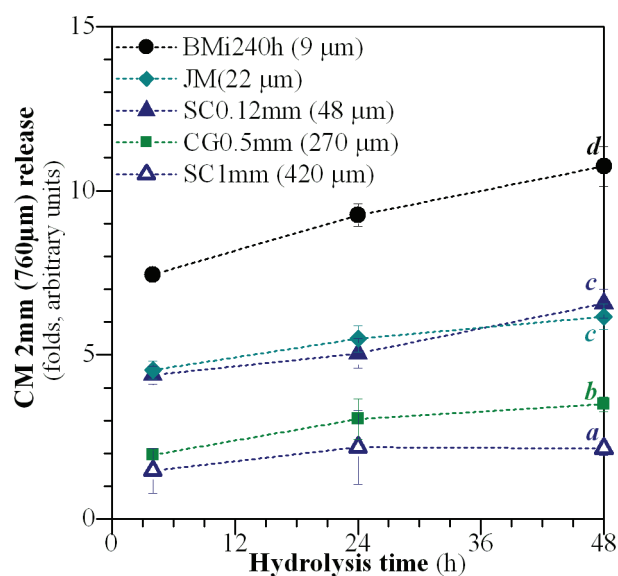


Fig. 46. Improvements allowed by (finer-than-2 mm) grindings on time-dependent enzymatic hydrolysis. These improvements are calculated point-by-point as the reducing sugar release from ground wheat straw (see Tab. 10 for sample abbreviations). Symbols with the same superscripts are not significantly different ( $p > 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison test after ANOVA.

### 3.4 Enzymatic saccharification of ground wheat straw

The subsequent experiments of enzymatic hydrolysis were carried out for 48 h in order to compare carbohydrate release at the plateau.

#### 3.4.1 Sieve-based grindings

The releases of reducing sugars and glucose from wheat straw samples produced by sieve-based grindings (Fig. 47) were inversely related to sieve-hole size therefore, to particle size. However, slight differences in particle size (e.g. as obtained thanks to the effect of feeding particle size prior to grinding: SC0.5mm vs. CG0.5mm) did not significantly ( $p>0.05$ ) affected hydrolysis extent. Thereby, the results on hydrolysis releases can be classified within different groups of ranging particle sizes. The release of reducing sugars (Fig. 47A) can be classified as follows: I) 0.2 mmol/g (4 % hydrolysis yield) for coarsely ground CM2mm (760  $\mu$ m), II) values between 0.4 and 0.6 mmol/g (9 - 15 % hydrolysis yield) for 420 to 206  $\mu$ m median particle sizes (SC1mm, SC0.5mm and CG0.5mm) and III) a third group can be composed, even being statistically equivalent to the second one ( $p>0.05$ , by Kruskal-Wallis ANOVA + Tukey's test), between 1.0 and 1.5 mmol/g (24 - 36 % hydrolysis yield) for samples from 107  $\mu$ m to 48  $\mu$ m median particle size (SC0.25mm, SC0.12mm, IG0.3mm and IG0.2mm).

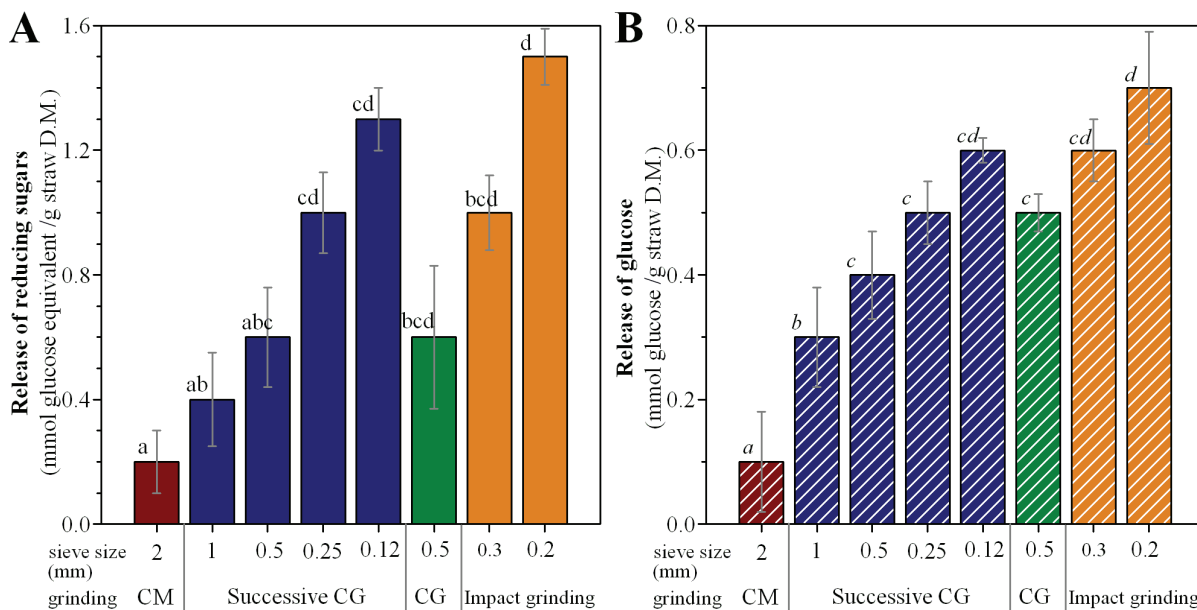


Fig. 47. Saccharification of wheat straw prepared by sieve-based grindings. A) Total release of reducing sugars (solid bars) and B) glucose (crosshatched bars) after enzymatic hydrolysis carried out for 48h. Same superscripts within bars are not significantly different ( $p>0.05$ ) by Tukey's multiple comparison test after Kruskal-Wallis ANOVA (reducing sugars data) or parametric ANOVA (glucose data). Abbreviations: CM for cutting milling, CG for centrifugal grinding.

The release of glucose (Fig. 47B) seems to be less intensified by the particle size decrease than the release of reducing sugars (total carbohydrates). Three groups can also be assembled as different ( $p < 0.05$ ): a) 0.1 mmol/g (6 % hydrolysis yield) for CM2mm (760  $\mu\text{m}$ ), b) 0.3 mmol/g (13 % hydrolysis yield) for SC1mm (420  $\mu\text{m}$ ) and c) between 0.4 and 0.6 mmol/g (21 - 34 % hydrolysis yield) for 270 to 48  $\mu\text{m}$  median particle sizes (SC0.5mm, SC0.25mm, SC0.12mm, CG0.5mm, IG0.3mm and IG0.2mm). The large range of particle size of this third group of glucose release can announce that cellulose solubilisation is less affected than hemicellulose one by the particle size and/or by the conditions of sieve-based grinding, especially by the smaller particle size.

In summary, considering sieve-based grindings only, the release of glucose and reducing sugars was mostly ruled by the particle size enhancing the enzymatic release (from 4 to 36 % and from 6 to 34 % hydrolysis yields of theoretical reducing sugar and glucose maximum potentials, respectively) until a size threshold below which no further release was obtained ( $\sim 270 \mu\text{m}$  for glucose release and  $\sim 100 \mu\text{m}$  for reducing sugars).

### 3.4.2 Ball and air-jet millings and comparison to steam explosion

The effects of ball milling and jet milling on enzymatic degradability were different (Fig. 48). Fig. 48A illustrates that ball milling improved the enzymatic release of reducing sugars compared to CG0.5mm. For ball milling series ii, the release was increased gradually and successively as the particle size decreased (ball milling time increased). Ball milling series i and ii for 240 h led to the release of 1.9 mmol reducing sugars/g (47 % hydrolysis yield,  $\text{BM}_i = \text{BM}_{ii}$ ,  $p > 0.05$ ) and 1.1 and 1.2 mmol glucose/g (Fig. 48B, 56 % and 61 % hydrolysis yield,  $\text{BM}_{ii240h}$  and  $\text{BM}_i240h$ , respectively).

Surprisingly, jet milling appeared not to favour the enzymatic degradability of wheat straw. The reducing sugar release from jet milled wheat straw was 1.2 mmol/g (29 % hydrolysis yield) and similar ( $p > 0.05$ ) to 120 h of ball milling. Unexpectedly, the starting material for jet milling, IG0.2mm, exhibited similar releases to those from jet milling:  $\text{IG}_{0.2\text{mm}} = 36 \pm 3$  and  $\text{JM} = 29 \pm 3$  % reducing sugar yields,  $\text{IG}_{0.2\text{mm}} = 34 \pm 4$  and  $\text{JM} = 36 \pm 1$  % glucose yields. It demonstrates that jet milling did not lead to an enhancement of wheat straw enzymatic accessibility even producing a much smaller sized sample ( $\text{JM} = 22 \mu\text{m}$  vs.  $\text{IG}_{0.2\text{mm}} = 107 \mu\text{m}$ ). Comparing to ball milling with equivalent particle size (22  $\mu\text{m}$ ,  $\text{BM}_{ii}$  192h and JM), both reducing sugar and glucose releases from ball milled wheat straw were superior to JM ( $p < 0.05$ ). These results confirm that grinding principle plays an important role in modifications of the substrates regarding their accessibility to enzymes and it is beyond the effect of particle size.



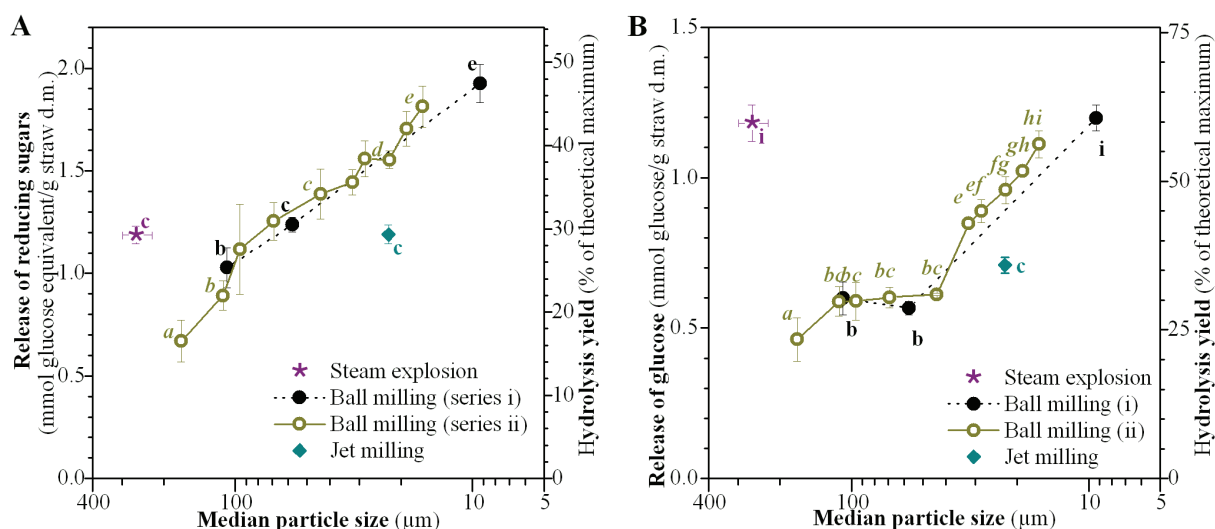


Fig. 48. Total releases and hydrolysis yields of reducing sugars (A) and glucose (B) after enzymatic hydrolysis carried out for 48h. Wheat straw samples prepared by ultra-fine grindings and by steam-explosion. Results of steam explosion are plotted as raw data  $\times 0.46$  which takes into account the mass yield of steam explosion (0.46 g steam exploded wheat straw /g initial wheat straw); its units are then g /100 g initial wheat straw. Symbols with the same superscripts are not significantly different ( $p > 0.05$ ) by Tukey's multiple comparison test after ANOVA.

Taking into account the group III of similar reducing sugar release discussed in section 3.4.1, it seems that a threshold was reached by the high-speed grindings (sieve-based grindings and jet milling). These operations were able to reduce particle size from 760 down to 22  $\mu\text{m}$ , however, their release of reducing sugar was only increased as particle size decreased from coarse particles (0.2 mmol/g = 4 % hydrolysis yield) down to  $\sim 100 \mu\text{m}$ ; for the finest samples (from  $\sim 100$  until 22  $\mu\text{m}$ ) reducing sugar release seemed to remain stable and averaged  $1.2 \pm 0.2$  mmol ( $29 \pm 4$  % hydrolysis yield). On the other hand, ball milled samples exhibited a continuous increase in reducing sugar release without any size threshold.

A threshold of glucose release was also observed (0.6 mmol glucose/g, Fig. 48B). This limit was much clearer than that observed on reducing sugar release and included also some samples produced by ball milling (from 0 to 120 h). The glucose release remained stable between particle sizes from 108  $\mu\text{m}$  (BMi48h) until 43  $\mu\text{m}$  (BMii120h) (similarities verified as  $p > 0.05$ ). These results are in agreement with those observed for sieve-based grindings (group c of similar glucose releases, 3.4.1): the release of glucose was increased with the reduction of particle size from coarse until  $> 200 \mu\text{m}$  particles, for smaller particles the release plateaued at  $0.6 \pm 0.1$  mmol/g ( $29 \pm 4$  % hydrolysis yield). Only the second period of ball milling (120-240 h, second grinding media diameter) was able to induce a substantial further increase of glucose release. Indeed, after 120 h ball milling time, the glucose release was suddenly increased until 240 h milling time reaching 47 % reducing sugar yield and 61 % glucose yield.



The releases of carbohydrates from SE-WS were the highest of all samples:  $2.6 \pm 0.1$  mmol reducing sugars/g SE-WS and  $2.6 \pm 0.1$  mmol glucose/g SE-WS which represented  $55 \pm 4$  % and  $79 \pm 4$  % hydrolysis yields of both, respectively. As hemicelluloses were removed during steam explosion process (as discussed in 3.1), similar releases of both reducing sugar and glucose were observed. Considering the whole steam-explosion process, results are calculated and presented including SE-WS mass recovery (SE-WS results  $\times 0.46$ ) of the starting material (wheat straw) (Fig. 48), therefore it can be compared to the ground samples (all in the same untreated-wheat straw basis). In this way, the glucose release from SE-WS ( $1.2 \pm 0.1$  mmol/g wheat straw; Fig. 48B) was similar to the glucose release from BMi240h showing that both steam explosion and ball milling allowed the enzymatic solubilisation of 60 % of cellulose enhancing considerably the untreated wheat straw cellulose solubilisation (less than 4 % glucose hydrolysis yield). Taking into account the hemicellulosic solubilisation in ground samples, the total carbohydrate solubilisation (reducing sugar release: glucose and pentose releases) of BMi240h was much superior to that of SE-WS (SE-WS = 29 % vs. BMi 240h = 47 % hydrolysis yields).

### 3.5 Cellulose structure

The relative crystallinities %Crys of all rapid grindings (CM2mm, SC1-0.12mm, CG0.5mm, IG0.2mm, IG0.3mm and JM) ranged between 20 to 25 % independently of particle size (Fig. 49A); their WAXS diffractograms were very similar (e.g. Fig. 49B – most crystalline curve).

Only ball milling samples were significantly less crystalline. The ball milling WAXS profiles were smoothed gradually from the beginning of ball milling until the end (240 h, less crystalline diffractogram - Fig. 49B). Thus, the %Crys of ball-milled samples was decreased to 13 and 14 % for BMi240h and BMii240h, respectively. Fig. 49B shows that during ball milling the peaks corresponding to crystallites diameters ( $2\theta_{100} \approx 16^\circ$  and  $2\theta_{200} \approx 22^\circ$  referring to directions perpendicular to crystallites), were reduced, especially 200 peak ( $2\theta_{200}$ ). The peak corresponding to crystallite length ( $2\theta_{004} \approx 34^\circ$ ) was slightly reduced as wheat straw was ball milled. Therefore, these results show that ball milling disrupts the cellulose ordered structure by principally reducing crystallites thickness and slightly shortening crystallites.

The %Crys of SE-WS was higher (51 %) than the initial wheat straw and also than wheat straw ground by rapid methods (20 %) (Fig. 49A). Indeed, the WAXS diffractogram (Fig. 49B) of SE-WS differed from the ground wheat straw samples. Peaks corresponding to crystallite diameters  $I_{110}$  and  $I_{200}$  ( $2\theta \approx 16^\circ$  and  $22^\circ$ ) and to crystallite length  $I_{004}$  ( $2\theta \approx 34^\circ$ ) were more narrow. The amorphous contribution  $I_{AM}$  ( $2\theta \approx 18^\circ$ ,

considered as the minimum between the 200 and 110 bands) was also reduced compared to coarsely-ground wheat straw (CM2mm). This result suggests that removing the amorphous compounds such as hemicelluloses (72 % hemicellulosic removal, as presented in section 3.1) was responsible for the increase in the overall relative crystallinity. Furthermore, steam explosion could also completely disrupt amorphous regions of cellulose microfibrils therefore the cellulose content was partially removed (24 %, section 3.1). Therefore, the overall crystallinity was increased compared to the initial wheat straw.

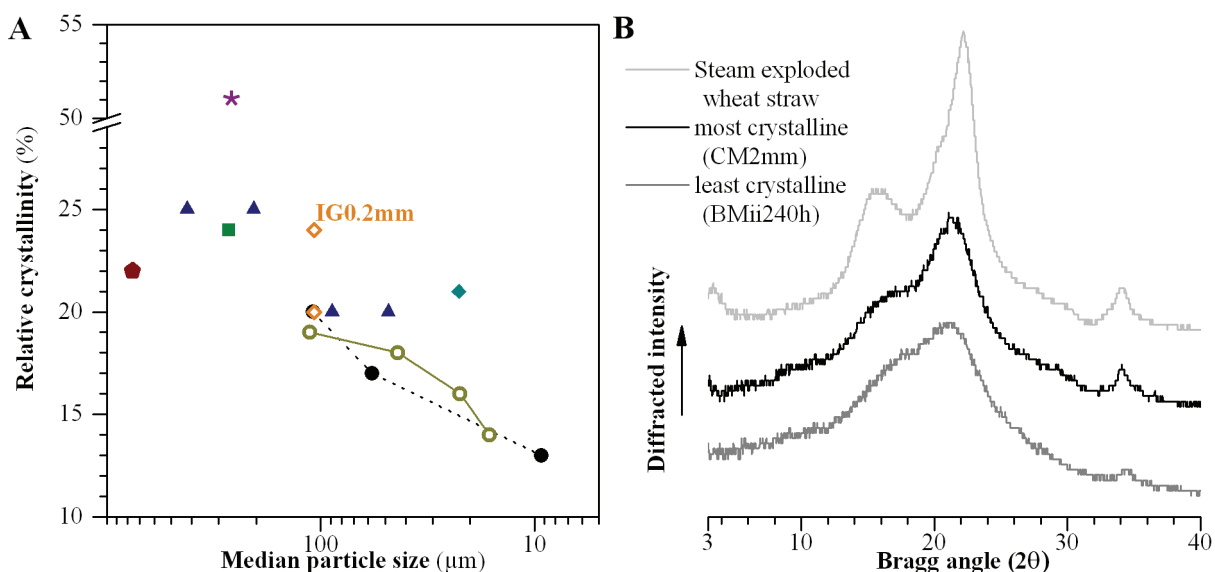


Fig. 49. A) Crystallinity indexes of wheat straw samples. B) WAXS diffractograms showing different patterns between steam-exploded wheat straw vs. ground wheat straw samples. Wheat straw prepared by steam explosion (\*), 2 mm-cutting milling (●), successive centrifugal grinding (▲), single-0.5 mm step of centrifugal grinding (■), impact grinding (◇) (IG0.2mm is indicated to be distinguished from IG0.3mm which has the same particle size), ball milling series i (●) and series ii (●) and jet milling (◆).

Wheat straw cellulose was not affected by the rapid grindings studied. Rondeau-Mouro et al. (2003) verified that even a sieve-based grinding (0.25 mm), applied to purified cellulose fractions from lemon, allowed a 55-to-34 % decrease in cellulose relative crystallinity; however, cellulose extracted from maize, which is similarly crystalline as wheat straw (24 %), was not changed by 0.25 mm-grinding. The higher susceptibility of lemon cellulose to be disrupted was related to their higher crystallinity which would make crystallites more rigid and thus breakable.

Jet milling, which is a widely used process in pharmaceutical domain, was already verified not to affect cellulose crystallinity of Avicel (intact MCC reduced from 44μm to 16μm, constant CI ~65% Suzuki & Nakagami, 1999). They showed, like our ball milling results, that vibrational rod milling produced similar particle size than jet milling but a further disruption of cellulose until 12 % crystallinity degree. Several other studies have

shown that ball milling potentially reduces cellulose crystallinity (Chang & Holtzapple, 2000; Hidenno et al., 2009; Inoue et al., 2008; Millett et al., 1979; A.S.A. Silva et al., 2010).

## **4 Discussion**

### **4.1 Overall effect of grinding on enzymatic hydrolysis**

The effects of grinding on wheat straw enzymatic accessibility can be explained by 1) the increase of the surface area and 2) the macromolecular destructure. The reduction of particle size favoured the contact between the enzymes with the substrate (increasing initial rates) and revealed new zones which contained initially inaccessible polymers in coarse particles (increasing final hydrolysis yields). Structural changes at the macromolecular level obtained using ball milling, i.e. reduction on cellulose crystallinity, allowed to overcome the threshold with an increase of the release of carbohydrates up to ~10 folds. Vidal et al. (2011) recently reviewed that particle size reductions, even associated to structural modification, enhanced cellulose hydrolysis up to 50 %. Likely, the maximum increase of the original accessible substrates was 8-fold using poplar wood cellulose (Chang & Holtzapple, 2000). In our experimental conditions using wheat straw as substrate, we demonstrated that further improvements were possible through the production of ultra-fine powders using ball milling.

### **4.2 Main effect of rapid grindings: effect of particle size until a threshold of carbohydrate release**

The “behaviour” of degradability positively related with particle size reduction down to a size limit was due to the absence of changes in macromolecules. Specifically, rapid-grindings did not change cellulose structure probably because wheat straw cellulose is naturally poorly crystalline thus less rigid and breakable. Our findings are in agreement with switch grass grinding: below 841  $\mu\text{m}$  that had little effect on digestibility of lime-treated biomass (Chang et al., 1997). As it can be expected, it seems that each biomass would exhibit a different size threshold depending on their lignocellulosic structure. Dumas et al. (2010) recently observed that reducing particle size of wheat straw by successive centrifugal grinding increased significantly the first order kinetics of anaerobic digestion with a size threshold of 287  $\mu\text{m}$  (Dumas et al., 2010). Since the first stage of anaerobic degradation is hydrolysis (Hendriks & Zeeman, 2009), the observed threshold in kinetics is thought similar to the threshold in cellulose hydrolysis that is reported in the present study.

Sieve-based grindings and jet milling are still process of interest in biomass treatment by their ability to increase wheat straw digestibility and mostly by their rapidity in size reducing. Jet milling was specifically very effective in producing ultra-fine biomass which can be profitable for other applications such as compactation (tablets) or powder combustion.

### **4.3 Ball milling: further effect on structure**

Ball milling was the only grinding method able to allow significant changes in macromolecular structure, therefore increasing wheat straw accessibility to enzymes. Nevertheless, other changes such as hemicellulose depolymerisation were observed throughout the whole ball milling period. The removal of lignin and/or hemicellulose have been considered to enhance both rate and yield of hydrolysis by either revealing cellulose to enzymes or by avoiding lignins to bind enzymes (diminishing their effectiveness) (Chandra et al., 2007; Mansfield et al., 1999; Sun & Cheng, 2002). As a consequence, in addition to the effect on crystallinity, cellulose solubilisation was further enhanced by ball milling (especially after 120 h ball milling). More work is necessary to determine how ball milling affects lignin structure. Furthermore, since the pattern of carbohydrate release from ball milling samples did not exhibit a maximum, further investigation to assess its maximum potentials must be of interest.

Our results on decrease of crystallinity and improvement of enzymatic accessibility owing to the action of ball milling are in agreement with those reported for other biomasses ground by laboratory (vibratory or planetary) ball millings (Chang & Holtzapple, 2000; Hiden et al., 2009; Inoue et al., 2008; Kawakubo et al., 2010; Millett et al., 1979; A.S.A. Silva et al., 2010). However, ball milling time (from 5 to 240 min) as well as product weight (from 1 to 50 g) were much lower compared to our ball milling experiments, except in Chang & Holtzapple (2000) that ground for up to 8 days (at 45 rpm) approximately 40-50 g. Since these reported ball milling experiments were carried out at lab-scale, they were more drastic (intensity and frequency of impacts – 250 to 1800 rpm) than our pilot-scale experiments (more moderate impacts, 60 rpm). Consequently, in order to produce ultra-fine wheat straw powder and generate structural changes in macromolecule structure, ball milling time needed to be increased. Therefore, our work confirmed the technical feasibility of ball milling at pilot scale. Nevertheless, energetic consumption must be determined in order to verify ball milling viability to be applied as a pretreatment of wheat straw.

#### **4.4 Grinding vs. steam explosion: similar enzymatic carbohydrate solubilisation**

The lignocellulosic structure of wheat straw was strongly altered by steam explosion. We verified that steam explosion affected wheat straw by reducing particle size, removing mainly hemicelluloses and increasing its relative crystallinity; also, some changes in lignin structure were indirectly observed. Since relative crystallinity was increased, one could expect that cellulose would be more difficult to be hydrolysed. In contrast, it seems that the hemicellulosic removal favoured the access of enzymes to cellulose chains increasing consequently the glucose release. The overall increase of glucose release shows that the effect of reducing crystallinity was minor compared to the positive effect of the hemicellulosic removal. The later has been already described to be the major effect of steam explosion on biomass allowing to higher hydrolysis yields (as reviewed by Chandra et al., 2007; Hendriks & Zeeman, 2009; Mosier et al., 2005; Sun & Cheng, 2002); cellulose increased porosity was additionally reported as a steam explosion effect (as reviewed by Mosier et al., 2005).

Contrary to steam explosion, grinding preserves wheat straw hemicellulose content; consequently ball milling allowed its enzymatic solubilisation. Therefore, due to the ability to enhance carbohydrate (cellulose + hemicellulose) enzymatic degradability, ball milling can be considered as more efficient than steam explosion. Moreover, the availability of pentoses will give a higher interest to ball milled wheat straw, since pentoses are considered for C5-fermentation new trends (Hahn-Hägerdal et al., 2007), methanisation (Hendriks & Zeeman, 2009; Palmowski & Muller, 2003), biohydrogen production (Kaparaju et al., 2009) and high-value molecules for chemicals (Gravitis et al., 2004). Moreover, ground wheat straw would not have inhibitors of micro-organisms used in the fermentation step as possibly present in SE-WS as residues of carbohydrate degradation products (furfural and HMF, even lowered by the action of acid sulphuric soaking) (Sun & Cheng, 2002); in contrast, lignin in ground wheat straw would be less altered than in SE-WS. As an outcome, further studies are necessary in order to evaluate these effects in further steps of biomass valorisation.

### **Conclusion**

Grinding modes appeared to play a determinant role in final characteristics of ground wheat straw. The effect of particle size reduction was decoupled from the effect of internal changes in the lignocellulosic structure. The degradability of wheat straw was enhanced by the decrease of particle size until a limit. This was only overcome when the internal structure of wheat straw particles was altered. Ball milling disrupted partially the

crystalline structure of cellulose. Ball milling appeared to be an effective pretreatment of wheat straw increasing its degradability with similar glucose yield and superior total carbohydrate yield to steam explosion pretreatment.

## **Acknowledgements**

L. Saulnier (INRA, Nantes - France) is greatly thanked for allowing GLC analysis of the starting materials. Y. Mellerin, A. Putois, G. Maraval and M. Chaurand are also acknowledged for technical assistance. Bruno Pontoire (UMR BIA Nantes) is thanked for performing X-ray measurements. This study was funded by the Languedoc-Roussillon Region (FR). MC was funded by the French National Research Agency (ANR, program E-TRICEL ANR-07-BIOE-006).

## **Appendix A. Supplementary methodology**

Experimental details are presented in the Supporting Information. Supplementary data associated with this article can be found in the online version version, at [doi:10.1016/j.biortech.2011.09.073](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073) (page 136).



## Effects of ultra-fine grinding on enzymatic degradation of wheat straw

Gabriela Ghizzi D. Silva, Marie Couturier, Jean-Guy Berrin, Alain Buléon, Xavier Rouau

### Supplementary Materials and Methods

This is the supplementary data of the article Silva, G.G.D., et al. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 103, 192-200. doi: [10.1016/j.biortech.2011.09.073](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.073). 2012.

### Supplementary methodology 1. Compositional analyses

The cellulose and hemicellulose contents of wheat straw and SE-WS were determined by gas-liquid chromatography (GLC) after prehydrolysis with sulphuric acid (26 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 30 min at room temperature), hydrolysis (dilution to 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100 °C) and derivatisation as alditol acetates (Blakeney et al., 1983) using inositol as the internal standard. The alditol acetates were separated on a DB 225 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA). Cellulose content was calculated as the sum of anhydro-glucose and hemicellulose content, as the sum of anhydro-arabinose + anhydro-xylose.

Cell wall residues were the extractive-free fractions obtained by an adaptation of the Morrison's rapid extraction method (Chang et al., 2008; Morrison, 1972): approximately 1 g was soaked with 100 mL of 65 °C-deionised water for 30 min, filtered hot through a 0.7 µm glass-fibre membrane and washed with 200 mL of water then successively with 100 mL of ethanol, acetone and diethyl ether. The cell wall residues were vacuum-oven dried at 40 °C for 48h, weighed and conditioned in a vacuum desiccator over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> overnight prior to Klason-lignin analysis. Klason lignin of cell wall residue was determined as described by Monties (1984). Ash contents were determined at 900 °C until constant weight. Experiments were carried out in triplicates, at least.

### Supplementary methodology 2. Grinding methods - Particle size reduction

#### SIEVE-BASED GRINDINGS

**Preliminary size reduction by cutting milling:** Before all other grinding experiments, wheat straw was comminuted using a cutting mill type SM2000 (Retsch, Germany) with a 2.0 mm sieve, giving a sample called CM2mm.

**One-step centrifugal grinding** was carried out with a centrifugal grinder type ZM200 (Retsch, Germany) equipped with a 0.5 mm sieve (trapezoid holes), a rotor with 12 teeth,



and output recovery by a cyclone module. The rotational speed was 12 000 rpm (62 m/s peripheral speed).

**Successive centrifugal grindings** were carried out as previously described by Silva et al. (Article 2 - Chapitre IV.2) with the same equipment as used for one-step centrifugal grinding (Retsch ZM200). Powders produced successively with the 1 mm, 0.5 mm, 0.25 mm and 0.12 mm sieves are here abbreviated as SC1 mm, SC0.5 mm, SC0.25 mm and SC0.12 mm.

In **impact grinding** experiments, CM2mm was ground on a impact mill type 100 UPZ (Hosokawa Alpine, Germany), operated at 18000 rpm and equipped with a selection sieve (trapezoid holes), a 8-teeth rotor and an output recovery by cyclone associated with an aspirator. Two operating conditions were tested in varying sieve size and grinding temperature. The samples called IG0.2mm and IG0.3mm were ground at room temperature with a 0.2 mm and 0.3 mm sieves, respectively. The impact grinding principle is similar to centrifugal grinding one; however, three differences on basic operating conditions can be pointed out: 118m/s peripheral speed, 8 rotor teeth and the association of the aspiration module, which is used to favour input feeding and to avoid clogging.

#### **BALL MILLING**

A ball mill type Marne 0 (Faure Equipments, France) was used to further grind CG0.5mm. An 8L jar, made of porcelain, was used and filled with porcelain balls (grinding media) at 25 % jar internal volume and with CG0.5mm at 50 % jar internal volume (1.2 kg straw). 25 and 19 mm -diameter balls (1:1 each diameter balls) were used from time 0 to 120 h milling time, thereafter grinding media was replaced by 7 and 9 mm-diameter balls (1:1 each diameter balls) until 240h milling time. This protocol was established to optimise milling time and reduce grinding media contamination (controlled by ash content: an increase of 0.3 g ash/100 g d.m. was considered as acceptable). The temperature of the whole ball-milling system stabilised at  $40\pm 3$  °C in a 20 °C-tempered room. Two different procedures were performed for ball milling experiments. On the first one (BMi), grindings were performed separately for 48, 120 or 240 h without sampling (opening the jar). On the procedure (BMii), samples (10 to 15g) were taken each 24h until the end at 240h.

#### **AIR-JET MILLING**

The IG0.2mm (~1.4 kg) was ground in an air-jet milling type 100 AFG (Hosokawa Alpine, Germany). Jet milling experiment was carried out at room temperature, for 85 min with a product feeding of 1.1 kg/h. Air jets were made using compressed air at 6 bar.

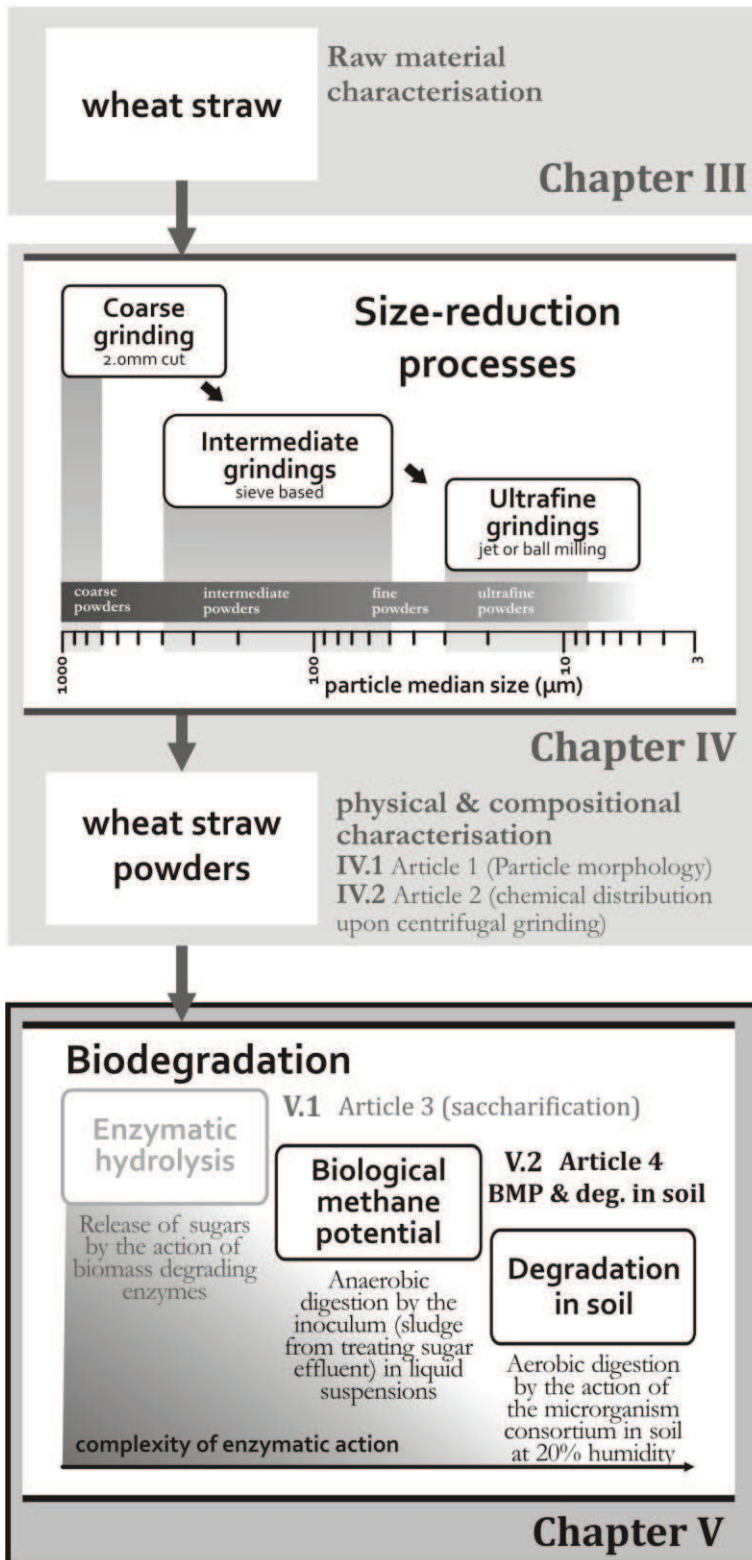


## CHAPITRE V.2

# ARTICLE 4. BIOCONVERSION OF ULTRA-FINELY GROUND WHEAT STRAW: ANAEROBIC DEGRADATION AND DECOMPOSITION IN SOIL

1	Introduction.....	141
2	Materials and methods.....	142
2.1	<i>Starting material</i> .....	142
2.2	<i>Composition of raw material</i> .....	142
2.3	<i>Grinding methods and particle size measurements</i> .....	143
2.4	<i>Behaviour in water and water-extractable carbohydrates</i> .....	144
2.5	<i>Enzymatic hydrolyses</i> .....	145
2.6	<i>Bioconversions</i> .....	146
2.6.1	Anaerobic degradation: methanogenesis.....	146
2.6.2	Aerobic degradation: biodegradation in soil.....	147
2.7	<i>Statistical Analyses</i> .....	147
3	Results.....	148
3.1	<i>Characteristics of ground wheat straw</i> .....	148
3.2	<i>Biomethane production</i> .....	151
3.2.1	Biological methane potential.....	151
3.2.2	Solid-state anaerobic digestion.....	152
3.3	<i>Decomposition in soil</i> .....	155
4	Discussion.....	157
4.1	<i>Main effect of particle size on both bioconversions: comparison between grinding intensities and processes</i> .....	157
4.2	<i>Comparison of anaerobic and aerobic degradations</i> .....	159
	Conclusions.....	161
	Acknowledgements.....	162

# Ultra-fine biomass processing



## **V.2 Article 4. Bioconversion of ultra-finely ground wheat straw: anaerobic degradation and decomposition in soil**

Gabriela Ghizzi D. da Silva, Claire Dumas, Sylvie Recous, Xavier Rouau. *In preparation.*

### **1 Introduction**

The bioconversion of organic matter is the enzymatic degradation by the action of microorganisms resulting in simpler organic molecules. The carbon is used as energy source by these microorganisms. In soil, the heterotrophic microorganisms operate in aerobic conditions while biogas production occurs as a result of anaerobic degradation. During both bioconversions, the carbon from the exogenous organic matter is partially assimilated to the increase of microorganism biomass, the other part of organic C is converted into CO<sub>2</sub> (mineralization) or mainly methane (methanogenesis, major part of biogas produced) during the decomposition in soil or the anaerobic degradation, respectively.

Four main biological processes by many classes of bacteria take place during the anaerobic degradation of particulate materials: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis, and methanogenesis. In particular, the hydrolysis stage is considered to be the rate-limiting step in the process (Eastman & Ferguson, 1981; Noike et al., 1985; Palmowski & Muller, 2003; Veeken et al., 2000). Other authors indicate that acidogenesis is an additional limiting step, since these two steps directly affect both the mass transfer and the availability to the further process (Gomec et al., 2002).

The microorganism pool present in soil is composed of several classes of bacteria and fungi. The dynamics of crop residue decomposition in soils are complex and controlled by many factors including: nutrient and water availability, temperature, physical and chemical nature of the residue, soil type and soil-residue contact. Both plant residue characteristics (particle size, biochemical nature and distribution, geometry, damage to surfaces) and soil physical properties (texture, aggregate and pore-size distribution, water content) would be important factors controlling soil-residue contact. Contact between the soil matrix and residue influences the processes of crop residue decomposition in ways that are still poorly understood (Angers & Recous, 1997).

As revealed in our previous work (Article 3 – Chapitre V.1), fine to ultra-fine grinding of wheat straw allow particle size reduction and even modify lignocellulose structure depending on grinding mode/intensity. As a consequence, the accessibility of hydrolytic enzymes was highly impacted. Since the biological conversions depend on enzymatic reactions, further understanding of ultra-finely ground wheat straw in these

processes may be of interest. Furthermore, although the concept of biorefinery is mostly applied to the production of ethanol and biodiesel, anaerobic digestion producing biogas must be carefully evaluated, as it would generate potentially more renewable energy as methane in a biogas-based biorefinery (Frigon & Guiot, 2010). In addition, the understanding of the decomposition in soil is of interest due to agricultural concerns since it affects e.g. soil quality, water retention, soil fertility etc. Grinding biomass as a pretreatment process does not represent significance for soil decomposition, however it can be considered for further studying the structure of substrates affecting this decomposition since particle size affects this bioconversion (Angers & Recous, 1997; Jensen, 1994; Sims & Frederick, 1970). On the other hand, as new biocomposite materials are developed, one can consider that the decomposition of biocomposites prepared by incorporating powdered biomasses in highly degradable matrixes must be ruled by the decomposition behaviour of the powdered biomass.

As far as our knowledge, information about the effect of particle size ranging from mm order down to ultra-fine particles (<20 µm) on the anaerobic degradation or soil decomposition was never reported. This work is the following study of the recently published article where we described the effect of these range of particle size on enzymatic hydrolysis of wheat straw (Article 3 – Chapitre V.1). In this work, the aims are to go further in understanding how these ultra-fine grinding processes affect bioconversion in soil or in anaerobic degradation. Furthermore, by using the same samples in both bioconversions, the comparison of the complexity of action (mobility, microorganism pools and anaerobic and aerobic action) can be determined within the range of these ultra-fine powders.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Starting material**

Wheat straw (*T.aestivum* cv. Apache) was kindly provided by Fernand Meaux (St. Jean du Salès, Aveyron, France), harvested in 2007. Its moisture content was naturally 8 % (w.b.) before grinding experiments.

### **2.2 Composition of raw material**

The analyses of cellulose, hemicellulose, Klason lignin and ash content of wheat straw were carried out as described by Silva et al. (Article 3 – Chapitre V.1, *in press*).

The total C and N contents of the initial wheat straw were measured by elemental analysis (NA 1500, Fisons Instruments). The monomer composition of the ether-labile

lignin fraction (*i.e.* uncondensed lignin fraction as  $\beta$ -O-4 linked monomers) was determined by thioacidolysis of the extractive-free fraction namely cell-wall residue. The cell wall (10 mg) was heated in 15 ml of dioxane: ethanethiol (9:1, v/v) containing 0.2 M boron trifluoride etherate for 4 h at 100 °C (Lapierre et al., 1986). Lignin monomer products *i.e.* the guaiacyl (G) and syringyl (S) moieties were analyzed by capillary column gas chromatography as trimethylsilyl derivatives. They were separated on a J&W DB-1 column (30 m long, 0.3 mm i.d.; 0.25  $\mu$ m film thickness) using a temperature gradient of 160–280 °C at 2 °C min<sup>-1</sup>. The carrier gas was helium at 60 kPa, detection was done by flame ionization and the internal standard was docosane.

The composition of wheat straw is presented in Tab. 11.

Tab. 11 Composition of wheat straw expressed as dry matters.

	Wheat straw
Total C (%)	45.7 $\pm$ 0.21
Total N (%)	0.6 $\pm$ 0.11
Ratio C:N	7 $\pm$ 1.3
Carbohydrates	
Cellulose (%)	32.0 $\pm$ 0.75
Hemicelluloses*1 (%)	20.5 $\pm$ 0.45
Ratio arabinose:xylose	0.15 $\pm$ 0.00
Lignin	
Klason lignin (%)	17.4 $\pm$ 0.30
Uncondensed lignin*2 ( $\mu$ mol/g Klason lignin)	910 $\pm$ 28
S units ( $\mu$ mol/g Klason lignin)	361 $\pm$ 14
G units ( $\mu$ mol/g Klason lignin)	505 $\pm$ 14
% H	4.6 $\pm$ 0.06
% G	55.6 $\pm$ 0.20
% S	39.9 $\pm$ 0.24
S/G	0.72 $\pm$ 0.01
Extractives (%)	9.5 $\pm$ 2.18
Ash (%)	6.1 $\pm$ 0.06

\*1Arabinoxylans were considered as total hemicellulose.

\*2Yield of lignin-derived thioacidolysis G and S monomers recovered from the cell-wall residue (after extractives removal);  $\beta$ -O-4 cross links.

### 2.3 Grinding methods and particle size measurements

The grinding experiments carried out in the present work were performed in a multistep diagram as described in article 3 (Chapitre V.1, *in press*). Fig. 50A shows the diagram of both ultrafine grinding processing. For all tested processes, wheat straw was preliminary reduced by cutting milling then, two types of grindings were carried out: ball and air-jet milling. In order to produce ultra-fine powders (<20  $\mu$ m), suitable grinding conditions were obtained by carrying out an intermediate step of sieve-based grinding



prior to ball milling or air-jet milling. Fig. 50B illustrates their mechanisms of particle size reduction.

Particle size distributions were determined from 0.02  $\mu\text{m}$  to 2000  $\mu\text{m}$  using a laser diffraction particle size analyser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., United Kingdom). Particle size distribution is characterised by the median diameter ( $d_{50}$ ) and span defined as  $(d_{90}-d_{10})/d_{50}$ , where the  $d_{10}$ ,  $d_{50}$  or  $d_{90}$  values represent the 10<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile of total volume assuming a spherical shape of particles. Although biomass particles are known to be elongated (not spherical), this technique allows an acceptable comparison between samples. It was chosen due to its rapidity (few minutes per measurement). Bulk density was determined as the tapped volume of 1 g of powder in a graduated cylinder.

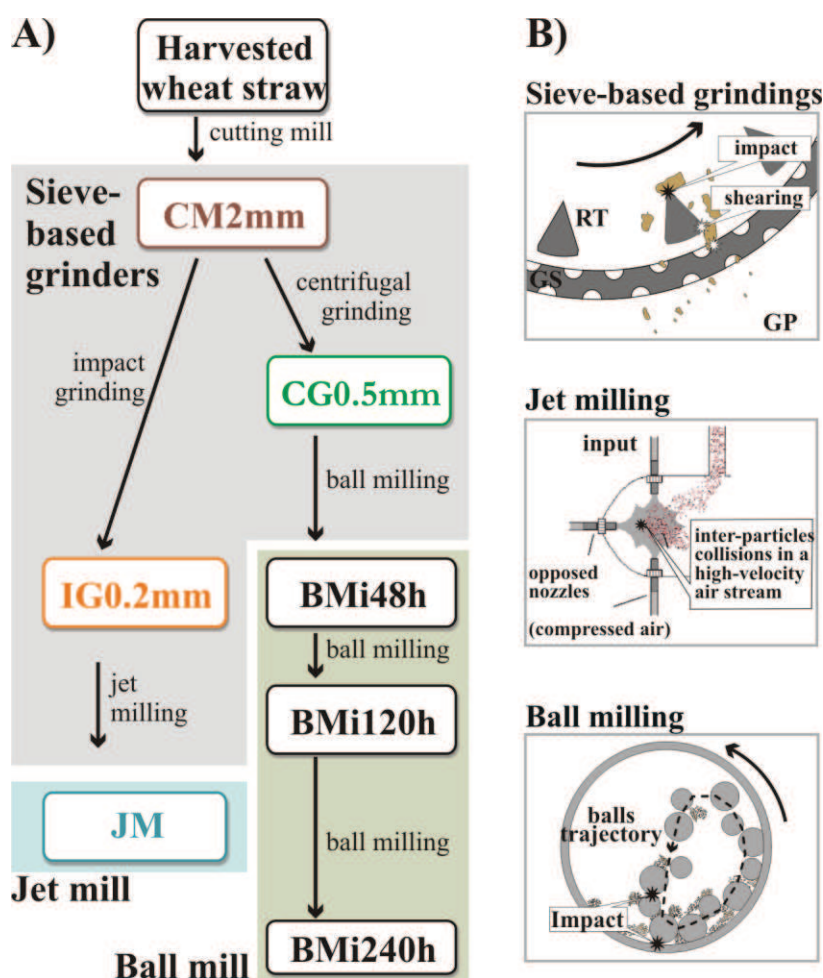


Fig. 50 Production of wheat straw powders: A) Processing diagram and samples names and B) breaking mechanisms of particles during these processes.

## 2.4 Behaviour in water and water-extractable carbohydrates

The sample solubilities in water and capacity of water retention were determined by mixing 0.5 g and 5 mL of deionised water for 2 h (rotative mixer Reax 4, Heidolph, GE)

at 20°C. After this period, the samples were centrifuged (12 000 g, 2x 10 min, 20°C) in a Beckman Avanti™ J-30I centrifuge (Beckman, USA), drained and weighed in order to determine the capacity of water retention. The drained liquid fractions were used for the determination of water-extractable carbohydrates. The residues were then dried (105 °C until constant mass) and weighed as non-solubilised dry mass. Considering that the initial dry mass of samples was known, the solubility of the samples was calculated given in terms of solubilised dry mass/ initial dry mass.

The water-extractable carbohydrates were determined after hydrolysis of aqueous fractions (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100 °C), derivatisation as alditol acetates (Blakeney et al., 1983) using allose as the internal standard and separated by gas-liquid chromatography (DB 225 capillary column, J&W Scientific, CA). Water-extractable glucan was calculated as the sum of anhydro-glucose and water-extractable hemicelluloses, as the sum of anhydro-arabinose + anhydro-xylose.

The water swelling of samples were determined by weighting 0.5 g in graduated cylinder (10 mL) and deionised water were added until complete the maximum graduation. The water swelling was expressed as the decanted volume per g sample.

## 2.5 Enzymatic hydrolyses

The enzymatic digestibilities of CM2mm, BMi240h and JM were determined according the method described by Navarro et al. (2010) with slight modifications: the amount of test materials was increase by a factor of 300, the sugar release was analysed in supernatant which was drained after centrifugation (12 000 g, 2 x 5 min, Beckman Avanti™ J-30I centrifuge , Beckman, USA). The enzymatic hydrolyses were carried out by the xylanase-rich enzyme preparation from *Trichoderma reesei* CL847 strain containing 0.12 U of filter paper activity, 0.33 U CMCase, 0.2 U β-glucosidase, 1.6 U xylanase, 0.02 U mannanase and 0.02 U arabinofuranosidase per mg of total protein at 37 °C, pH 5.0 (Couturier et al., 2011). The released neutral sugar composition was determined according to (Blakeney et al., 1983) (GLC after derivatisation as alditol acetates). Additionally, to assess the solubilisation of polysaccharides (linked carbohydrates) as well, these fractions were also chemically hydrolysed (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 2 h at 100 °C) before derivatisation. The molar composition difference between the enzymatic hydrolysate and enzymatic+acid hydrolysate was considered as polysaccharide release (arabinoxylan: the sum of anhydro-xylose and anhydro-arabinose; glucan: sum of anhydro-glucose). All enzymatic releases were calculated as raw data minus control (without enzyme, at least 2 per sample).

## **2.6 Bioconversions**

### **2.6.1 Anaerobic degradation: methanogenesis**

#### **2.6.1.1 Liquid anaerobic degradation conditions**

The anaerobic biodegradabilities of wheat-straw samples were measured in batch-mode incubations using the biochemical methane potential test adapted from Owens and Chynoweth. (1993) and Angelidaki et al (2009). Briefly, the inoculum was a granular sludge treating sugar effluent. The inoculum was diluted to 5 g/L of organic matter volatile solids (VS – equivalent to organic matter content). The ratio between substrate and inoculum was low, equal to 0.5 g COD/g VS of inoculum in order to limit microorganisms growth and to have a complete degradation. Each flask contained substrate, inoculum (sludge), macro element solution (for good C/N ratio), oligoelement solution, and phosphate buffer solution (to ensure a pH of around 7 during the whole degradation process). The flasks were placed at 35°C and hand-mixed once a day. Two control samples were realised: a blank (water) to quantify the production due to inoculum and one containing ethanol as carbon source (completely biodegradable compound) to check the methanogenesis activity of the inoculum. The biogas volume was quantified by liquid displacement (water, pH 2, NaCl 10%) and the biogas composition was determined by gas chromatography ( $\mu$ -GC, Varian Inc., USA). The experiments were carried out in duplicates and the biogas volumes were determined at 0, 3, 6, 10, 15, 21, 36, 44, 59, 75, 93, 108 and 125 day after the beginning of incubations. For these experiments, the sample prepared by 0.3mm-impact grinding is considered to exhibit same results as the intermediate step of jet milling processing (IG0.2mm). Since the particle sizes and enzymatic degradabilities of both samples were similar (Article 3 – Chapitre V.1), we consider that this is an acceptable assumption.

#### **2.6.1.2 Dry anaerobic degradation conditions**

The anaerobic degradations in solid state were determined in batch mode, in 120 mL serum bottom flasks. The same quantity of substrate and inoculum was placed in the bottle with a ratio sucontent in the flasks equal to 30% total solids. In this specific case of high S/X ratio the growth of microorganisms and particularly the colonisation of the substrate could not be neglected. The biogas volume and composition was followed as for the liquid conditions. At day 143, some flasks were sampled and volatile fatty acids (VFA) concentrations measured. The VFA concentration was measured using a gas chromatograph (Varian 3900) with a flame ionization detector and an automatic sampler (Varian CP8400).

Methane production for both states of anaerobic degradation was calculated as the difference in released CO<sub>2</sub> between the wheat straw enriched and control, and was expressed both as mL CH<sub>4</sub>/ g dry matter and as a conversion percentage of the initially added C (% C-CH<sub>4</sub>/added C).

### **2.6.2 Aerobic degradation: biodegradation in soil**

Soil was taken from the 5–30 cm layer of a loamy soil from Northern France (Mons-en-Chaussée, 49°80'N, 3°60'E). Fresh soil samples were first sieved to 4 mm to eliminate plant debris and then to <2 mm before being stored at 20 °C for a week prior to incubation. The organic C content, soil pH (H<sub>2</sub>O), clay, silt and sand contents were 8.70 mg C/g soil, 7.64, 17.8%, 77.3% and 3.8% dry basis, respectively. Soil samples and ground wheat straw were mixed at a rate equivalent to 2000 mg C/kg dry soil and incubated 25 ± 0.5 °C. Soil moisture was 20% wet basis and was maintained throughout the incubation period by weighing weekly and readjusting with deionised water when necessary. Control treatments without wheat straw were prepared and incubated in the same way.

Carbon mineralisation was measured in soil samples (equivalent to 25 g dry soil) incubated in 500 ml glass jars in the presence of a CO<sub>2</sub> trap (15 ml 1 M NaOH) in triplicates. Carbon mineralization was measured at 1, 4, 6, 8, 12, 15, 21, 29, 42, 63, 83 and 106 days after the beginning of the incubation. The concentrations of CO<sub>2</sub> trapped in the NaOH solutions were measured by continuous flow colorimetry (Chaussod et al., 1986) using an auto-analyzer (TRAACS 2000, Bran & Luebbe, GE). Carbon mineralisation was calculated as the difference in released CO<sub>2</sub> between the wheat-straw enriched and control soils, and was expressed both as mg C-CO<sub>2</sub>/ kg dry soil and as a conversion percentage of the initially added C (%C-CO<sub>2</sub>/added C). It was assumed that C mineralisation from soil OM was not modified by the addition of wheat straw residues (no priming effect) or that any effect would be similar for all wheat straw samples, which seemed to be a reasonable assumption.

## **2.7 Statistical Analyses**

All statistical analyses were carried out using OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation) and Matlab R2006a (The MathWorks, Inc.). Results are reported as their replicate means ± SD. In order to compare means, firstly the normality of each treatment was verified by the Shapiro-Wilk's test. The group of results were then analysed by the Levene's test to verify their homoscedasticity. The Tukey's post-hoc test was used to compare multiple treatment means after analysis of variance (ANOVA). All significant levels were set at 0.05.

The incubation patterns of bioconversion (methane production or mineralisation) as functions of time (t) were fitted with using OriginPro 7.5 with the first-order kinetics equation ( $Y=Y_{\max} [1-\exp (-kt)]$ ), where Y is methane production or carbon mineralisation,  $Y_{\max}$  is its total cumulated production and k, the first order kinetic constant.

### 3 Results

#### 3.1 Characteristics of ground wheat straw

Tab. 12 presents the characteristics of wheat-straw powders produced by dry grinding. As previously described by Silva et al. (Article 3 – Chapitre V.1, *in press*), a large range of particle sizes of wheat-straw powders were produced: it varied from 760  $\mu\text{m}$  (CM2mm) until ultra-fine powders (9 and 22  $\mu\text{m}$ , BMi240h and JM, respectively). This size reduction resulted in a compaction effect (reduction of bulk density from 0.3 to 0.5  $\text{g}/\text{cm}^3$ ) of these powders; nevertheless these values remain very low which indicates that wheat straw powders were not dense. Furthermore, ball milling enhanced the most this compaction effect compared to jet milling. This may be related to the ball milling breaking mechanisms where particles are impacted/crushed between the grinding media and themselves.

In contact with water, grinding resulted in reduced swelling (from 11.1 to 7.1 mL swollen/g) and water retention (from 8.0 to 2.5 g water/g) abilities. Probably, the networks of particles were less organised and thus weaker as the powder particles were smaller sized. In spite of this less retention and swelling in water, the mass solubility of wheat straw was gradually increased by the grinding steps. Especially ball milling for 240 h increased the mass solubility the most (increase from 6 to 15 %, CM2mm and BMi240h, respectively). Specifically, the carbohydrate solubilisation was generally less affected by grinding than the mass solubilisation (other components such as minerals). Ball milling from 120 h to 240 h allowed a 2-fold increase of water-extractable glucans. Both ultra-fine grindings led to a solubilisation of hemicelluloses (from less than 0.8 up to 1.5, for ball milling processing and up to 1.3 for jet milling processing).

For any ground wheat-straw sample, the substitution degree of water extractable arabinoxylans varied from 0.97 to 0.68 (ratio arabinose:xylose). Interestingly, the water-extractable arabinoxylans were much more substituted by the arabinose units than the original (total) arabinoxylans in wheat straw (ratio arabinose: xylose 0.15, Tab. 11). Jet milling allowed the solubilisation of the less substituted water-extractable arabinoxylans. These results show that grinding allowed the solubilisation of arabinoxylans which were the less interacting with each other or with the cellulose/lignin in the cell wall.

In summary, the wheat straw powders (the ensemble of particles) were reduced in size resulting in a better compacted structure. Even though the bulk of particles in contact with water seemed to be less structured than coarse particles, smaller particles exhibited more mass solubilisation than coarser powders. Ultra-fine grindings allowed a partial solubilisation of polysaccharides and especially ball milling doubled the glucan solubilisation and jet milling allowed the release in water of slightly less substituted arabinoxylans.



Tab. 12 Characteristics of ground wheat straw samples before degradation.

Process and condition <sup>*1</sup>	sample code	Size			Behaviour in water			Water-extractable		carbohydrates ratio arabinose:xylose
		median particle size (µm)	size span <sup>*2</sup>	bulk density (g/cm <sup>3</sup> )	swelling (mL swollen/g)	retention capacity (g water/g)	solubility (% g/g)	glucan (% g/g)	Hemicell. <sup>*3</sup> (% g/g)	
Cutting milling	2mm	759.5 ± 19.5	1.6 ± 0.1	0.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	11.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.3 ± 1.1 <sup>ab</sup>	n.d.	n.d.	n.d.
Centrifugal grinding	0.5mm	269.4 ± 5.8	2.5 ± 0.0	0.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	10.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	6.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.03 <sup>ab</sup>
Impact grinding	0.2mm	107.4 ± 0.9	3.0 ± 0.1	0.36 ± 0.01 <sup>b</sup>	9.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	5.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	7.6 ± 0.4 <sup>bc</sup>	1.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.08 <sup>a</sup>
Ball milling - i (series i)	48h	108.5 ± 2.1	4.4 ± 0.3	0.48 ± 0.00 <sup>c</sup>	7.1 ± 0.1 <sup>d</sup>	4.4 ± 0.5 <sup>c</sup>	9.1 ± 0.8 <sup>cd</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>c</sup>	0.87 ± 0.02 <sup>ab</sup>
	120h	57.3 ± 1.3	5.2 ± 0.0	0.47 ± 0.01 <sup>c</sup>	7.3 ± 0.0 <sup>cd</sup>	3.6 ± 0.3 <sup>d</sup>	9.8 ± 0.0 <sup>d</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>d</sup>	0.78 ± 0.01 <sup>b</sup>
	240h	9.3 ± 0.1	2.5 ± 0.0	0.50 ± 0.04 <sup>c</sup>	8.2 ± 0.4 <sup>d</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>e</sup>	15.0 ± 0.3 <sup>e</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.5 ± 0.0 <sup>f</sup>	0.78 ± 0.01 <sup>bc</sup>
Jet milling	JM	22.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1	0.40 ± 0.01 <sup>b</sup>	7.8 ± 0.3 <sup>cd</sup>	3.4 ± 0.2 <sup>d</sup>	9.5 ± 0.2 <sup>cd</sup>	1.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>e</sup>	0.68 ± 0.04 <sup>c</sup>

<sup>\*1</sup> For sieve-based grindings: size of sieve hole. For ball milling: milling time. <sup>\*2</sup> Difference between 90<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> percentile divided by median particle size of the particle size distribution. <sup>\*3</sup> Hemicelluloses considered as arabinoxy/lans. n.d.: Not determined. Same superscripts within the same column are not significantly different (p>0.05) by Tukey's multiple comparison test after parametric ANOVA.



## 3.2 Biomethane production

### 3.2.1 Biological methane potential

Fig. 51 presents the biological methane potential profiles for ground wheat-straw samples produced by the two ultrafine grinding processes: ball milling and air-jet milling including their intermediate steps. Generally, grinding further than 2mm-cutting milling led to slight increases in total cumulated methane production end. Nevertheless, the methane production rates of more finely ground wheat straw were much intensified, especially to the initial rates (maxima verified between each measurement).

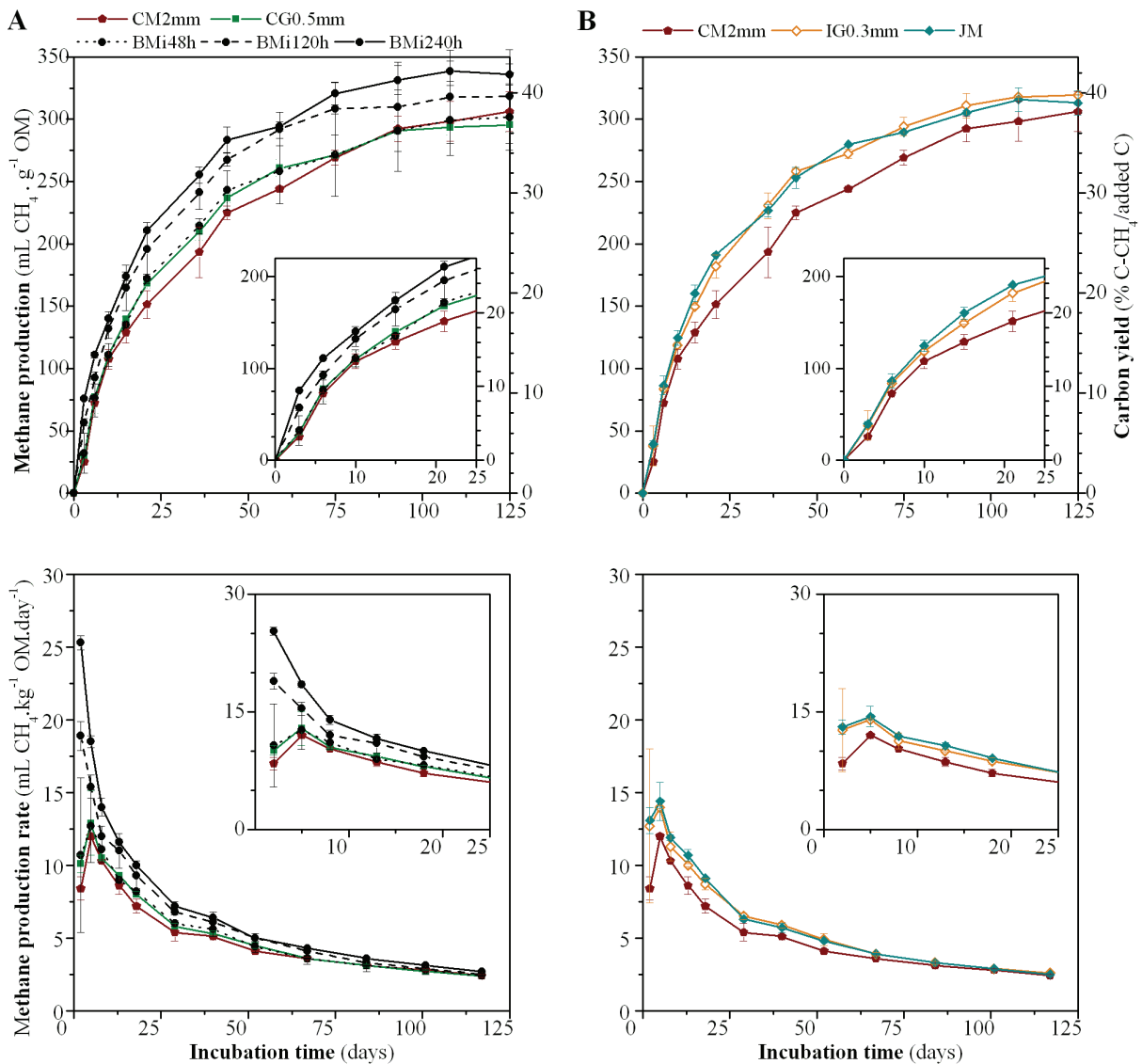


Fig. 51 Biological methane potential of ground wheat straw: methane production (top, two ordinate axes) and rates (at bottom). Wheat straw samples produced by different grinding processes (including intermediate steps): A) ball milling and B) air-jet milling. Inset graphs detail the initial period of incubation with the same units as their principal graphs.

Ball milling processing (Fig. 51A) allowed a gradual increase in both rate and extent of methane production as grinding time was increased. Therefore, the most distinct increase in the cumulated methane production during all the incubation period including at the end was observed for BMi240h (from  $306 \pm 16$  up to  $336 \pm 9$  mL CH<sub>4</sub> . g OM<sup>-1</sup>, CM2mm and BMi240h, respectively). Moreover, the maximum degradation rate (observed between measurements) for BMi240h was enhanced from  $13.4 \pm$  to  $27.8 \pm$  mL CH<sub>4</sub> . g OM<sup>-1</sup> . d<sup>-1</sup>.

Fig. 51B shows that jet milling led to a similar final cumulated methane production as CM2mm (JM =  $313 \pm 10$  mL CH<sub>4</sub> . g OM<sup>-1</sup>). Both the intermediate step before jet milling (IG0.3mm) and JM produced a very similar methane production pattern, even though they were very differently sized (IG0.3mm=107 µm vs. JM=22 µm). Therefore, the liquid anaerobic digestion was not favoured by either the jet milling process, even the smaller particle size resulted from it.

These results seem to be closely related to the enzymatic hydrolysis behaviour of these samples. We previously reported (Article 3 – Chapitre V.1)) that rapid grinding processes (sieve-based grindings and jet milling) allowed an increase of the release of carbohydrates with the reduction of particle size until a limit. The latter was exhibited for powders from coarse (760 µm) until 100 µm median particle sizes. Since the limiting step of the anaerobic degradation of solid substrates is the enzymatic hydrolysis (Palmowski & Muller, 2003), the methane production was favoured by the size reduction such as the enzymatic hydrolysis; therefore the same limit was observed. Furthermore, ball milling which was held to produce the most accessible particles to enzymes due to a supplementary reduction of cellulose crystallinity (without any size threshold) exhibited both the highest cumulated methane production and initial rate.

### 3.2.2 Solid-state anaerobic digestion

In view of the fact that ball milling samples produced the better results on (liquid) biological methane potential and rate, the solid state digestibility of these samples were tested (CG0.5mm, BMi48h, BMi120h and BMi240h). In addition, the product from the other ultra-fine grinding process was tested for comparison (JM). Their methane production patterns are presented in Fig. 52. Two groups of solid-state anaerobic digestion results can be distinguished Fig. 52: the first one composed of CM2mm, CG0.5mm, BMi120h and BMi240h where the degradation was close to the coarsely ground wheat-straw (CM2mm); the second one, by BMi48h and JM where the degradation was contrastively reduced.

As it can be expected, in solid-state degradation compared to the liquid one, the complex action of microorganisms is strongly affected by the variations of concentrations of substrate and/or product at each step of the conversion. Furthermore, the high variability between replicates of the same sample (as observed by the standard errors) confirms that more complex phenomena (biotic and/or abiotic) occur than in liquid digestion.

At the beginning of incubation (until 5 days), all samples exhibited similar patterns, however after that, JM and BMi48h produced very few or even none methane until 40 to 50 days. In contrast, CM2mm, CG0.5mm, BM120h and BMi240h kept being similarly converted into methane. It seems that especially JM (ultra-fine sample) was able to be initially degraded but after that, the methane production was stopped. One hypothesis could be that the methanogene archae activity was blocked due to the increased accessibility to enzymes (reduced particle size) of JM which resulted in higher yields of the enzymatic hydrolysis of polysaccharides (first step of anaerobic degradation). Therefore, the overall pH in the system would be decreased due to the higher concentrations of resulting volatile fatty acids (VFA). Since the archae are very sensible to pH variations, methanogenesis could be slowed down or even blocked for samples JM and also BMi120h. Izumi et al.(2010) have verified that, in batch experiments of food wastes, reducing particle size improved the methane production from particles reduced down to  $\sim 70 \mu\text{m}$ , after that the particle reduction resulted in VFA accumulation being detrimental to biogas production.

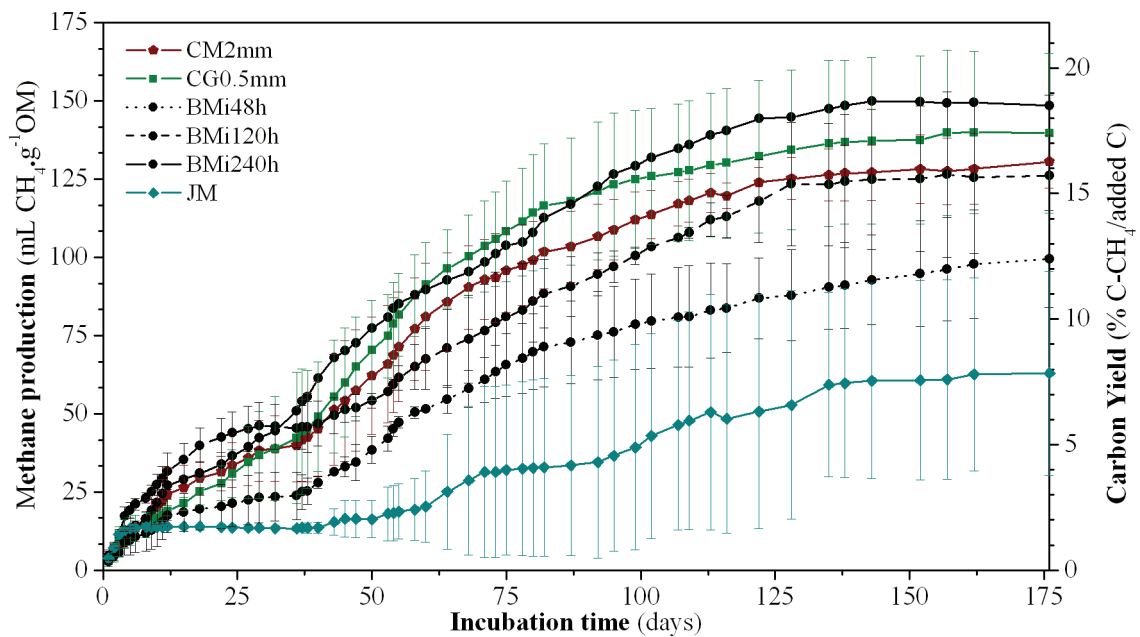


Fig. 52 Biological methane potential in solid-state anaerobic digestion of ground wheat straw: methane production (two ordinate axes). Wheat straw samples produced during different grinding processes.

On the other hand, two other samples with enhanced-accessibility (BMi120h and BMi240h) were degraded during all the incubation in BMP solid state. They exhibited very similar anaerobic degradabilities to CM2mm, even though they were very different in size (CM2mm= 760  $\mu\text{m}$  vs. BMi240h = 9  $\mu\text{m}$ ). These contrasted results between BMi240h (degraded as CM) and JM (very poorly degraded) suggests that the grinding mode plays indirectly an important role in the structure of wheat straw by i) increasing hydrolysis yields but also by ii) changing their structure (Article 3 – Chapitre V.1) and therefore, the action of microorganisms. To further understand these degradability differences, we enzymatically hydrolysed CM2mm, JM and BMi240h using a degrading biomass enzyme cocktail. Tab. 13 shows the carbohydrate compositions of released fractions after hydrolysis. Generally, carbohydrate releases in both monomeric and polymeric forms were increased as the wheat straw was ultra-finely ground.

As previously described (Article 3 – Chapitre V.1), generally the enzymatic releases of polysaccharides were increased for ultra-fine samples, especially for ball-milled wheat straw. Interestingly, the fraction of monomeric form of arabinose in BMi240h (48%) was very distinct from CM2mm and JM. It may be related also to the higher carbohydrate solubilisation provoked by ball milling (observed in Tab. 2, before degradation). These results can be one the factors which triggered the better anaerobic degradation of BMi240h against the JM one. It shows that more arabinose still linked to xylose was released. This particular structure of solubilised arabinose and xylose probably lightened the effect of acidification observed for JM digestion, therefore, the methanogenesis could be carried on; thus BMi240h was then degraded at least as CM2mm was.

Tab. 13. Carbohydrate composition of released liquid fraction after enzymatic hydrolysis by *T.reseoi* secretome.

<b>Total (polymers + monomers)* (mg/g)</b>	<b>Glucose and glucan</b>	<b>Arabinose and linked arabinose</b>	<b>Xylose and xylan</b>	<b>Ratio A:X</b>
CM2mm (SC1mm)	104.0 $\pm$ 4.6	8.2 $\pm$ 1.0	30.9 $\pm$ 0.7	0.27 $\pm$ 0.03
JM	124.9 $\pm$ 6.7	7.9 $\pm$ 0.7	44.0 $\pm$ 3.0	0.18 $\pm$ 0.01
BMi240h	190.2 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 0.2	83.4 $\pm$ 0.1	0.16 $\pm$ 0.00
<b>Monomers (mg/g)</b>	<b>Glucose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Xylose</b>	<b>Ratio A:X</b>
CM2mm (SC1mm)	85.1 $\pm$ 4.6	6.9 $\pm$ 1.0	23.7 $\pm$ 0.7	0.29 $\pm$ 0.04
JM	110.2 $\pm$ 6.7	5.9 $\pm$ 0.7	36.6 $\pm$ 3.0	0.16 $\pm$ 0.01
BMi240h	165.0 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.2	64.2 $\pm$ 0.1	0.10 $\pm$ 0.00
<b>Molar fraction of monomeric form (%)</b>	<b>Glucose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Xylose</b>	
CM2mm (SC1mm)	80.2 $\pm$ 7.1	82.0 $\pm$ 12.7	74.4 $\pm$ 4.2	
JM	87.1 $\pm$ 7.3	72.3 $\pm$ 10.2	81.3 $\pm$ 8.1	
BMi240h	85.5 $\pm$ 3.5	47.5 $\pm$ 3.3	74.6 $\pm$ 3.4	

\* Total represents the sum of sugar released as monomers and polymers determined by an additional acid-sulphuric hydrolysis.

The more the accessibility to enzymes was improved, the faster was the degradation (higher rates) in liquid digestion. In solid state, if the accessibility is improved only by the effect of size reducing (JM case), the digestibility is biased (too much VFA). Only in case of enhanced accessibility by both size reducing and polysaccharide structural changing (more water-extractable hemicelluloses, reduced cellulose crystallinity, more polymeric form of arabinose after enzymatic hydrolysis), the solid state digestibility is not anymore biased and is similar to coarsely ground sample but not superior.

### **3.3 Decomposition in soil**

The patterns of the ground wheat straw degradation in soil are presented in Fig. 53. Hand-cut wheat straw (~2 cm) was also tested for comparison. Overall, all grinding processes allowed further mineralisation of wheat straw than hand cutting (initial rate and final extent of mineralisation superior to those of hand-cut wheat straw). Within ground samples, they exhibited similar mineralisation patterns with some slight differences.

The initial and intermediate samples of ball milling processing (sequence: CM2mm, CG0.5mm; BMi48h and BMi120h in Fig. 53A) exhibited the similar behaviours especially until 10 days incubation time. The initial mineralisation rate of BMi240h was the highest of all samples ( $51.1 \pm 4.4$  mg C-CO<sub>2</sub> /kg soil /day). After the initial period (>10 days incubation time), the mineralisation of BMi240h was slowed down until 70 days, when the cumulated mineralisation of all ball milling samples were similar until the end of incubation.

Likely, the first steps of jet milling processing (CM2mm and IG0.2mm) allowed similar yields and rates of decomposition until 10 days incubation time. On the other hand, JM in this period exhibited the lowest rate and thus the lowest cumulated mineralisation. After that, IG0.2mm and JM, were mineralised slightly further than the CM2mm which allowed, at the end of incubation, the highest cumulated mineralisation ( $1130 \pm 6$  mg C-CO<sub>2</sub> /kg soil) . Especially around 40 days incubation time, JM exhibited an increase of mineralisation rate which allowed this catching up of its cumulated decomposition in CO<sub>2</sub>.

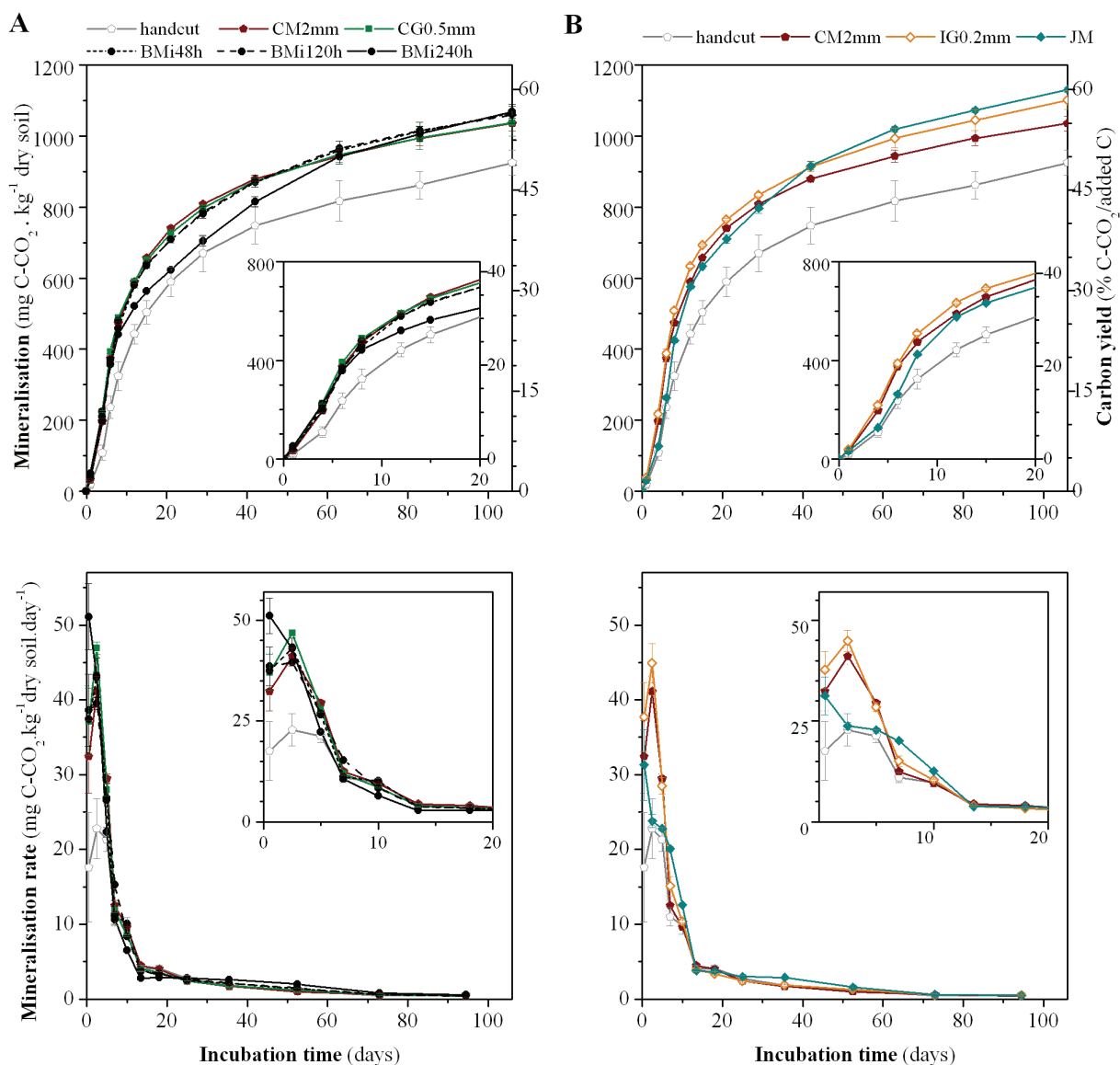


Fig. 53 Wheat straw degradation in soil: carbon mineralisation (top, two ordinate axes) and rates (at bottom). Wheat straw samples produced by different grinding processes (including intermediate steps): A) ball milling and B) air-jet milling. Inset graphs detail the initial period of incubation with the same units as their principal graphs.

Both ultra-fine grindings affected the decomposition in soil but with different ways: ball milling sample (BMi240h) increased the initial rate of mineralisation but at the end its cumulated decomposition was similar to the coarsely-ground wheat straw (CM2mm); while jet milling in turn exhibited the slowest decomposition initially but at the end the highest cumulated mineralisation.



## **4 Discussion**

### **4.1 Main effect of particle size on both bioconversions: comparison between grinding intensities and processes**

In order to summarise the results of anaerobic degradation in liquid state and decomposition in soil, their degradation patterns were fitted with the first order kinetics equation to obtain the maximum cumulated of conversion ( $Y_{\max}$ ) and first order kinetic constants ( $k$ ). Fig. 54 shows the relationship of these degradation extent ( $Y_{\max}$ ) and kinetics constant ( $k$ ) as a function of particle median size.

As observed for the degradation patterns, the particle size reduction allowed few changes in methane production except for the BMi240h which produced highest cumulated methane amount.

The mechanical disintegration accelerates the biological degradation of wheat straw into methane ( $k$  from 0.033 to 0.051 day<sup>-1</sup> for 760 to 9  $\mu\text{m}$ , respectively). On the other hand, in the case of soil decomposition, the kinetic constant seems to decrease with particle size reduction ( $k$  from 0.074 down to 0.053 day<sup>-1</sup> for 760 to 9  $\mu\text{m}$ , respectively).

Pretreatment to reduce particle size has two effects in anaerobic degradation: first, if the substrate has a high fiber content and low degradability, comminution of the substrate increases gas production; second, it can lead to more rapid digestion (Mshandete et al., 2006; Palmowski & Muller, 2000). Our results are in agreement with this observation especially for ball milling samples. Furthermore, other studies also reported the positive effect of size reduction on biogas production for different types of substrates: sewage sludge from 2 to 100 mm (Kopp et al., 1997), 50- and 100  $\mu\text{m}$ -sized crystalline cellulose Avicel (Hu et al., 2005) and food wastes from  $\sim 85$  to 400  $\mu\text{m}$  (Izumi et al., 2010). Sharma et al. (1988) verified that methane production of agricultural and forest residues varying from 0.088 to 30 mm was enhanced only from 0.088- to 0.40 mm- particles. Similarly, we observed that methane total production from wheat straw was little affected from 760 to 20  $\mu\text{m}$ , only BMi240h was superior to that. On the other hand, Pommier et al. (2010) observed no significant differences neither on the biogas production quantity nor on the biogas production rate as an effect of shredding (<1 mm) cardboard or corrugated carton.



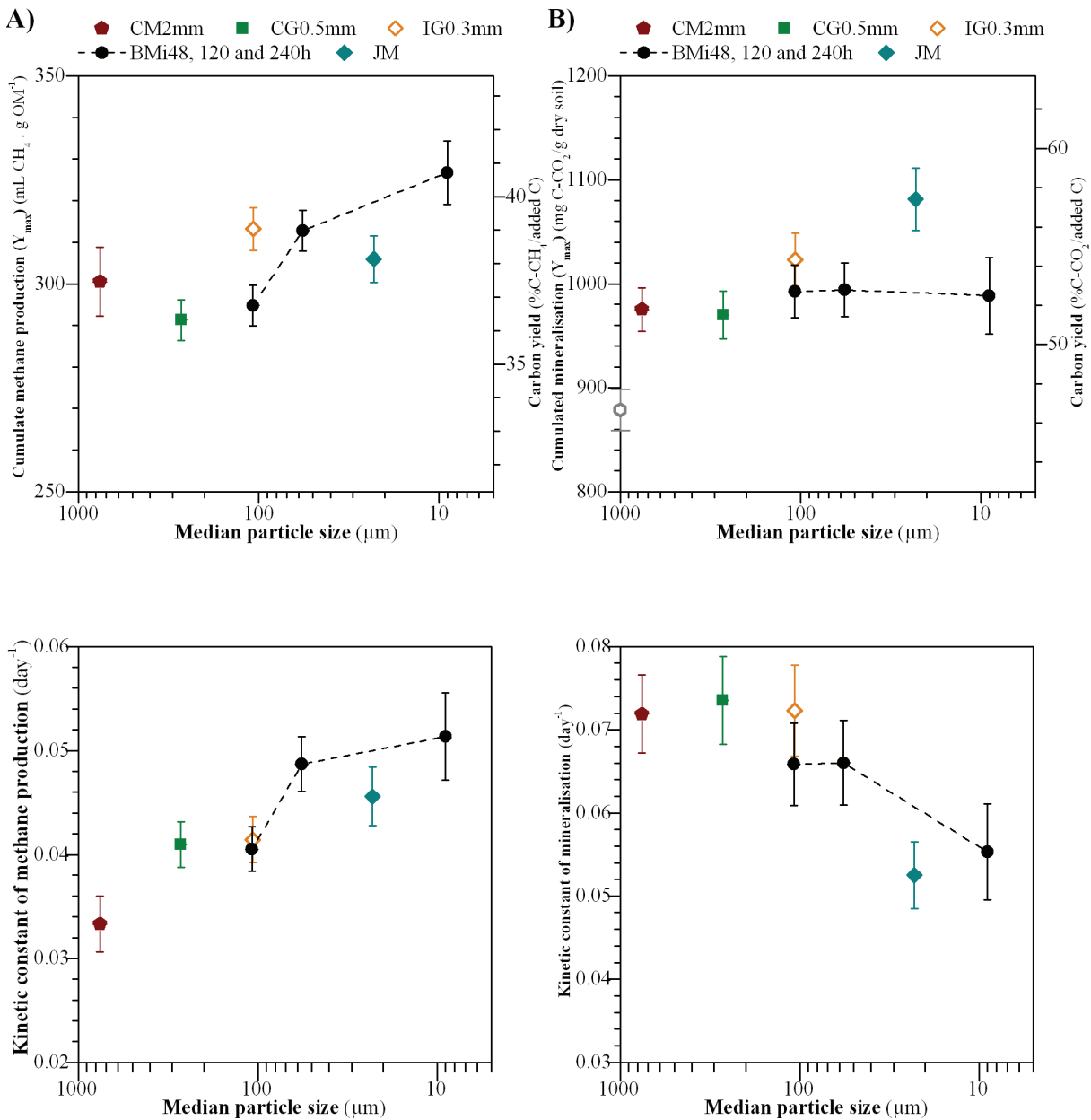


Fig. 54 Results of fitting first kinetic equation as a function of median particle size : maximums of both bioconversion ( $Y_{max}$ , top) and their kinetic constants (below). The median particle size of hand-cut wheat straw is arbitrary for comparison.

Furthermore, as in the case of solid state fermentation, some specific studies observed that the particle size reduction could be detrimental for anaerobic digestion process. Indeed, excessive particle size reduction results in volatile fatty acids accumulation and therefore in methane production decrease. The major acids produced were acetic and propionic acids (Hu et al., 2005; Izumi et al., 2010).

An increase in decomposition rate in soil was observed when crop residues are ground or chopped finely as compared to intact residues (Sims & Frederick, 1970). However, some reports have shown the opposite effect (Bremer et al., 1991; Jensen,

1994). More research is needed to determine the influence of particle size on the decomposition of residues of various composition in an attempt to generalize the influence of this factor. Anger and Recous (Angers & Recous, 1997) hypothesized two dominant opposite effects resulting from increasing substrate contact with soil, i) acceleration of decomposition due to increasing nutrient and water exchange with soil and ii) increase of C stabilization by soil physical protection. They observed that wheat and rye exhibited different behaviour owing to their different C :N ratio. Wheat responded to size reduction by both effects while rye decomposition was accelerated only during the phase of degradation. For wheat straw, the lowest rates of mineralization and cumulative mineralization were obtained with the intermediate sizes tested i.e. 0.5 and 1 cm length size, which could be the least favourable combination of the two effects for C mineralization in that study. With regard to the decomposition in soil of our samples, particle size was not related to the cumulated mineralisation (extent) of wheat straw. On the other hand, particle size reduction to ultra-fine sizes was detrimental to this bioconversion rates. It seems that ultrafine grinding is affected by mostly the second Anger and Recous's hypothesis. The particles being very small compared to the soil aggregates, the latter would protect the wheat particles preventing the access and colonisation by the microorganisms of the organic matter.

Generally, particle size reduction was studied with minimum particle size from 500 to 50  $\mu\text{m}$  for anaerobic degradation studies and even more than 500  $\mu\text{m}$  upto the actual size of whole plants. The present study focus on the ultra-fine grinding of wheat straw. Therefore, our results are hardly related to existing literature. Further studies must be of interest in order to determine the effects of the porosity revealed or reduced by these grinding processes and how the microbial biomass interacts with that. Also, the acidification during anaerobic degradation must be followed by VGA contents and online pH recording. Finally, the protection by the soil to the ultrafine substrates could be verified by microscopic analysis in order to determine how the substrate is distributed in this system.

## **4.2 Comparison of anaerobic and aerobic degradations**

Fig. 55 presents the superimposition of both bioconversion patterns. In the case of aerobic degradation in soil, one additional experiment was performed on hand-cut wheat straw sample. As shown in Fig. 55, it is notably observed that this sample: i) is degraded more slowly, ii) has a lower maximum carbon yield, than the other samples in soil. The carbon yield of hand-cut sample is higher than most parts of the sample degraded by anaerobic digestion. The carbon yield of hand-cut sample is in the same order of magnitude than the one of BMi240h. However, the carbon degradation rate is lower for

hand-cut sample. This last observation could be explained by the fact that a higher quantity of compounds could be solubilised and degraded in the case of ultrafine milling, increasing the biodegradation rate at the beginning.

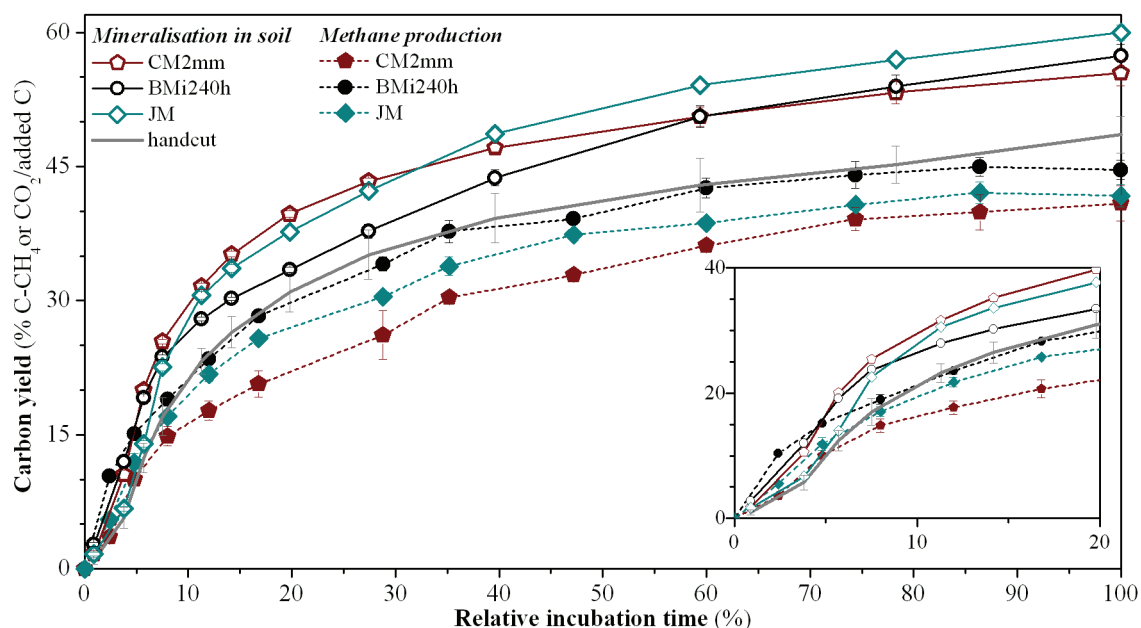


Fig. 55 Carbon mineralisation and methane production from wheat straw degradation. Extreme samples of ground wheat straw by: 2mm-cutting milling (CM2mm), ball milling for 240 h (BMi240h) and jet milling (JM).

In soil the processes seemed to be more complex than in methanogenesis processes. Consequently, the characteristics of substrates must play roles of different relative importance between these bioconversions. This can be verified by the different ranking of ground samples within each type of degradation. Indeed, considering the degradation in soil, JM exhibited a higher carbon yield than BMi240h and CM2mm. This order was not respected for initial degradation rate since BMi240h was more rapidly degraded than CM2mm and JM at the beginning of incubations (until 5% relative incubation time). In the case of anaerobic degradation, the carbon yield was higher for and descending: BMi240h, JM and CM2mm. The same order was observed for degradation rates.

Considering the initial phases of the biodegradations (between 0-20% of incubation time) BMi240h was degraded more rapidly than the other fractions whatever was the bioconversion process. The intense increase of accessibility to hydrolytic enzymes exhibited for BMi240h in addition to its higher content of soluble polysaccharides can explain the higher degradation extent at the beginning of methanogenesis. This latter experiment was realized in liquid conditions favouring the access of microorganisms to small quantities of soluble molecules. In soil biodegradation the water content is limited;

the diffusion of solubles is therefore difficult and they may be also immobilised by the soil agglomerates.

Fig. 55 represents a comparison of degradation extent of 100 g of wheat straw carbon either in methane or CO<sub>2</sub>. At the end of the biodegradations, between 50-60% of the carbon was mineralized whereas only 30-40% was anaerobically transformed in methane. This kind of comparison between anaerobic and aerobic degradation was poorly documented. One article compared those two biological transformations, for shrub legume species (Tscherning et al., 2005). They proposed that both aerobic decomposition and anaerobic in-vitro digestion were very comparable. However, within our range of samples (same substrate ultra-finely ground resulting in different structures), both bioconversions exhibited different behaviours ranking samples differently. This shows that with particles varying from 760 µm to 9 µm with some further structural differences, these two bioconversions are differently impacted. Furthermore, the increased biodegradation of wheat straw in soil could be explained by the main difference of the biodegradation processes i.e. aerobic versus anaerobic degradation. Some aerobic microorganisms in soil could eventually degrade some structure recalcitrant to anaerobic degradation and therefore attack between 10 to 20% additional carbon.

More studies are necessary to determine how the residues after bioconversion are composed in order to evaluate the difference between both bioconversions.

## **Conclusions**

The size of particles appeared to affect mostly the bioconversion rates and slightly their extents. Ball milling and jet milling exhibited the most contrasted results. Therefore, the grinding modes appeared to play a role in final characteristics of ground wheat straw which impacted differently the bioconversions.

In anaerobic degradation, it seems that with a high mobility system (liquid), the conversion rates are directly related to the accessibility of enzymes to substrates. In solid digestion, the status of lignocellulose structure plays an important role, especially during the acidification step. In soil, the more static system may add some barriers to the biological degradation.

Both bioconversion in methane and in CO<sub>2</sub> were compared for ultra-finely ground wheat straw. Generally, methane carbon conversion was inferior to that in soil. It is probably related to the presence of oxygen which allows the aerobic microorganism to degrade further lignin content.

## Acknowledgements

O. Delfosse, G. Alavoine, A. Putois, Yannick Mellerin, Marc Chaurand, Georges Maraval are thanked for their technical assistance. Dr. Jean-Guy Berrin is acknowledged for providing *T.reseei* secretome. The authors thank Dr. Catherine Lapierre for the thioacidolysis determinations.

## Conclusions du chapitre V

De manière générale, le broyage a affecté les biodégradations enzymatiques quant à leur vitesse de réaction et leur étendue. Les modes de broyage, en particulier ultrafins, ont eu des impacts très différents sur les modes d'action enzymatique et biologique. Cela confirme que les broyages ont une action qui se manifeste au niveau de la structure la plus fine des particules (échelle microscopique/ultrastructurale). En conséquence, l'accessibilité aux enzymes hydrolytiques a permis de révéler les différences de réactivité entraînées par ces changements. De plus, l'augmentation d'accessibilité enzymatique a affecté distinctement les bioconversions anaérobie et aérobie. Il en ressort que d'autres paramètres que l'accessibilité enzymatique jouent un rôle important dans la détermination de la capacité de la paille à subir les bioconversions.

# CHAPITRE VI

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Eléments de contexte et objectifs .....	165
Démarche employée.....	165
<b>Caractéristiques de la paille de blé .....</b>	<b>166</b>
<b>Synthèse des résultats et interaction des différents facteurs : propriétés des poudres vs. bioconversions .....</b>	<b>166</b>
Effet du broyage sur les caractéristiques morphologiques des particules .....	170
Effet du broyage sur la distribution des composés ligno-cellulosiques.....	174
Effet du broyage sur l'état des polymères et comportements des poudres en contact avec l'eau.....	175
Effets du broyage sur les biodégradations .....	177
➤ <i>Interactions au sein des biodégradations : hydrolyse enzymatique vs. bioconversions.....</i>	<i>178</i>
➤ <i>Effet des caractéristiques des broyats sur les bioconversions .....</i>	<i>181</i>





## VI Discussion générale

### Eléments de contexte et objectifs

Dans le contexte de la bioraffinerie du végétal, des prétraitements sont nécessaires pour augmenter la réactivité de la biomasse ligno-cellulosique vis-à-vis des procédés de conversion enzymatique/biologique. La fragmentation mécanique, en particulier par voie sèche, est une étape quasi-incontournable de cette raffinerie. Conventionnellement, la biomasse est grossièrement réduite (quelques mm) pour permettre sa manipulation et sa mise en œuvre, mais, principalement, pour augmenter son accessibilité aux enzymes. Cette dernière est due, premièrement, à l'augmentation de la surface spécifique (par la réduction de la taille des particules), par la dissociation des différents tissus et/ou des différentes couches de parois cellulaires et, finalement, par la déstructuration interne du réseau ligno-cellulosique (par ex. par la réduction de la cristallinité de la cellulose). Selon le mode de sollicitation mécanique et les conditions de broyage, la finesse finale ainsi que la structure interne des particules sont affectées différemment. Par conséquent, la réactivité de la biomasse végétale est potentiellement augmentée par les broyages fins et notamment ultrafins ( $< 20 \mu\text{m}$ ). L'objectif de cette thèse a été d'appliquer/utiliser/comprendre l'action de différents procédés poussés de broyage (du grossier à l'ultrafin) et d'évaluer leur effet sur la réactivité vis-à-vis des procédés de bioconversions, incluant différents niveaux de complexité d'attaque enzymatique et biologique (hydrolyse enzymatique en suspension liquide, digestion anaérobie en milieu liquide et solide, et décomposition aérobie dans le sol).

### Démarche employée

Trois modes de fragmentation ont été utilisés pour étudier l'effet de différents types de sollicitation mécanique : i) broyage à grille où les particules sont broyées par impact et cisaillement entre les broches et la grille jusqu'à ce qu'elles passent la maille de la grille de sélection ; ii) broyage à jet d'air, une méthode rapide capable de produire de tailles ultrafines ( $< 20 \mu\text{m}$ ), où les particules sont fortement accélérées ( $\sim 500 \text{ m/s}$ ) par l'action de jets d'air comprimé (6 bar) puis collisionnées, au point de rencontre des jets; iii) broyage à boulets réalisé dans une jarre en rotation remplie de paille et de corps broyants. Cette méthode basée sur l'impact et le frottement répétés des corps broyants se distingue de deux autres principalement par sa durée (240 h pour atteindre  $\sim 10 \mu\text{m}$ ).

Dans un premier temps, nous avons établi un diagramme multi-étapes de traitement de la paille à l'échelle pilote ( $> 1\text{kg}$ ). Elle a été broyée en parallèle en utilisant les 3 familles

de mode de fragmentation. Une analyse fine de la morphologie des particules a été développée par analyse d'images de microscopie optique. Cette méthode a permis de contourner les difficultés liées à l'hétérogénéité des particules (en termes de taille, forme, transparence et aspect de surface) lors de la prise d'image (différents plans focaux possibles) ainsi que lors du traitement des images (présence de particules transparentes et bien contrastées simultanément) tout en gardant une bonne résolution des particules les plus petites. Les données obtenues ne suivant pas la loi normale de distribution (polydispersité des paramètres de taille et de forme), nous avons utilisé la technique d'analyse de la co-inertie multiple (multi tableaux, MCoA) afin de prendre en compte toute l'information liée à cette variabilité.

L'impact des différents modes et intensités de broyages a été étudié avec différents systèmes d'attaque enzymatique/biologique de la paille: le plus simple par l'hydrolyse enzymatique sous l'action du sécrétome de *T. reesei*, et par la suite, par les digestions anaérobies (méthanisation) à deux niveaux de mobilité (digestion liquide et solide à 50 % d'eau) et enfin, la décomposition anaérobie dans le sol (20 % d'eau, minéralisation du carbone).

## **Caractéristiques de la paille de blé**

Préalablement aux broyages, nous avons caractérisé la matière première modèle de biomasse, la paille de blé, pour sa composition en parties anatomiques et histologiques (microscopie optique et auto-fluorescence). Ces résultats alliés à l'analyse chimique, nous ont permis de constater une grande hétérogénéité de la paille à plusieurs niveaux d'échelle. Au niveau macrostructural, la paille, composée majoritairement par des tiges et feuilles, a été reçue partiellement dégradée et fragmentée. Les parties anatomiques présentent des compositions biochimiques légèrement différentes notamment dans le cas de la cellulose. La broyabilité de ces parties est aussi différente et cela est plus dû à leur structure microscopique et macroscopique qu'à leur composition biochimique. Ces variations entraînent donc un comportement complexe de la paille lors des broyages.

## **Synthèse des résultats et interaction des différents facteurs : propriétés des poudres vs. bioconversions**

Nous avons présenté séparément les effets du broyage sur les caractéristiques des poudres de paille produites (Chapitre IV) et leurs impacts sur les bioconversions (Chapitre V). Dans chacun des articles, certains éléments de la caractérisation des poudres qui pouvaient être impliqués dans les mécanismes d'action relatifs aux biodégradations ont été présentés. Nous proposons ici une analyse de l'ensemble des résultats de façon à i)

compiler les effets des broyages sur toutes les caractéristiques évaluées, ii) comprendre comment ces caractéristiques évaluées sur des particules individuelles ou dans leurs collectifs (poudres) affectent les biodégradations et iii) comment ces informations sont liées entre elles (redondance ou signification). Pour ce faire, nous avons fait appel à l'analyse en composantes principales (PCA-principal component analysis) afin de simplifier la présentation des ces données ainsi que pour évaluer l'interaction des différents facteurs entre eux.

Les entrées de la PCA ont été :

- a) les données morphologiques issues de l'analyse d'images (Tab. 14): « pseudo » médianes des distributions en surface et en nombre et densité apparente des poudres (bulk density);
- b) l'état de structuration des hémicelluloses et de la cellulose : teneurs en polysaccharides solubles dans l'eau (arabinoxylanes : WE-AX, glucanes : WE-glucan, ratio arabinose/xylose : WE-A/X) et degré de cristallinité de la cellulose (%Crys, Tab. 15);
- c) le comportement des poudres en contact avec l'eau : gonflement dans l'eau (swelling), capacité de rétention d'eau (water retention) et solubilité massique dans l'eau (solubility) (Tab. 15);
- d) finalement les résultats des biodégradations : hydrolyse en sucres réducteurs (Hydr-Red.sugars), en glucose (Hydr-Glucose), production en méthane (Prod.CH<sub>4</sub>) et sa constante cinétique de premier ordre (Kinetics-k CH<sub>4</sub>), minéralisation cumulée totale (Prod.C-CO<sub>2</sub>) et sa constante cinétique de premier ordre (Kinetics-k C-CO<sub>2</sub>) (Tab. 16).

Les résultats de cette PCA sont présentés dans la Fig. 56. Les composantes principales PC1 et PC2 représentent 73% de l'inertie totale ce qui indique que la majorité des l'information contenue dans les données d'entrée est représentée par ces deux composantes.

Nous allons présenter, dans un premier temps, les effets des broyages sur les particules et sur l'état des polymères. Cette discussion est donc basée sur la comparaison des broyats d'une étape à l'autre de broyage. Pour ce faire, les poids factoriels (*loadings*, Fig. 56 à droite) sont analysés dans chaque composante de façon à comprendre comment les variables évoluent quand on broie. Plus le *loading* d'une variable est important, plus la composante est pondérée par cette variable. Une variation positive dans la PC est suivie par l'augmentation de la variable avec des *loadings* positifs et une réduction des variables avec des *loadings* négatifs.

Dans un deuxième temps, nous discutons comment ces changements entraînés par les étapes de broyage affectent les propriétés des poudres au contact de l'eau. Comme les

propriétés qui gèrent ces comportements sont les propriétés des particules, une analyse de l'interaction entre ces variables (caractéristiques des broyats) est nécessaire. Nous étudions donc la carte des corrélations (Fig. 58) entre les variables pour exprimer la corrélation entre elles. De même, dans un troisième temps, les interactions entre toutes ces propriétés (particules, état des polymères et poudres dans l'eau) sont reliées aux résultats de dégradation enzymatique par les corrélations entre ces variables.

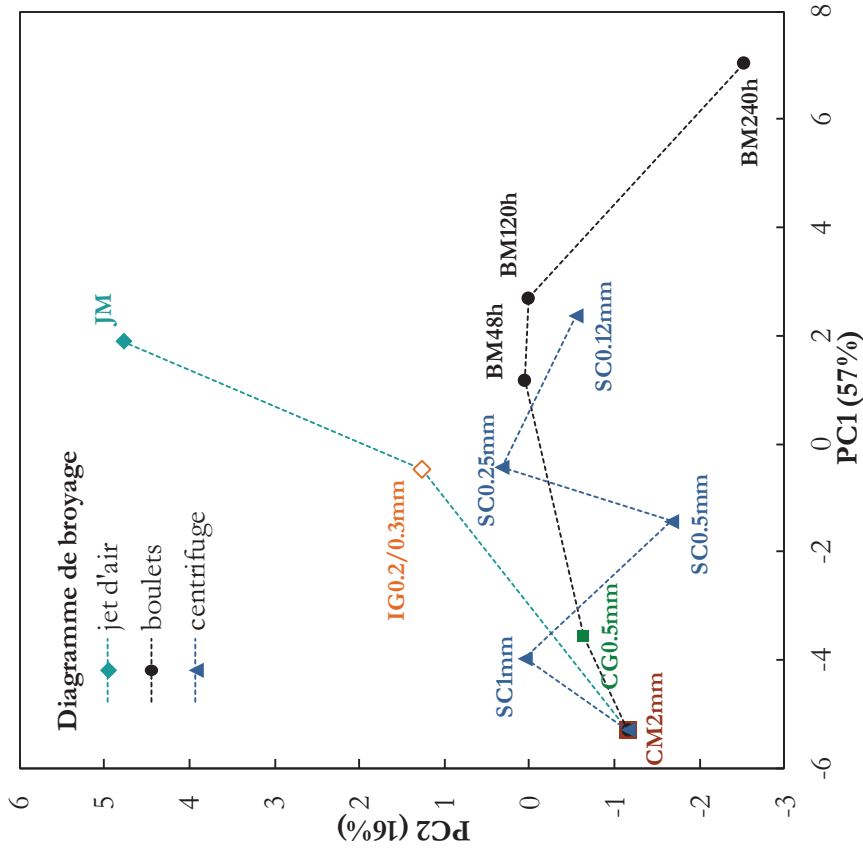
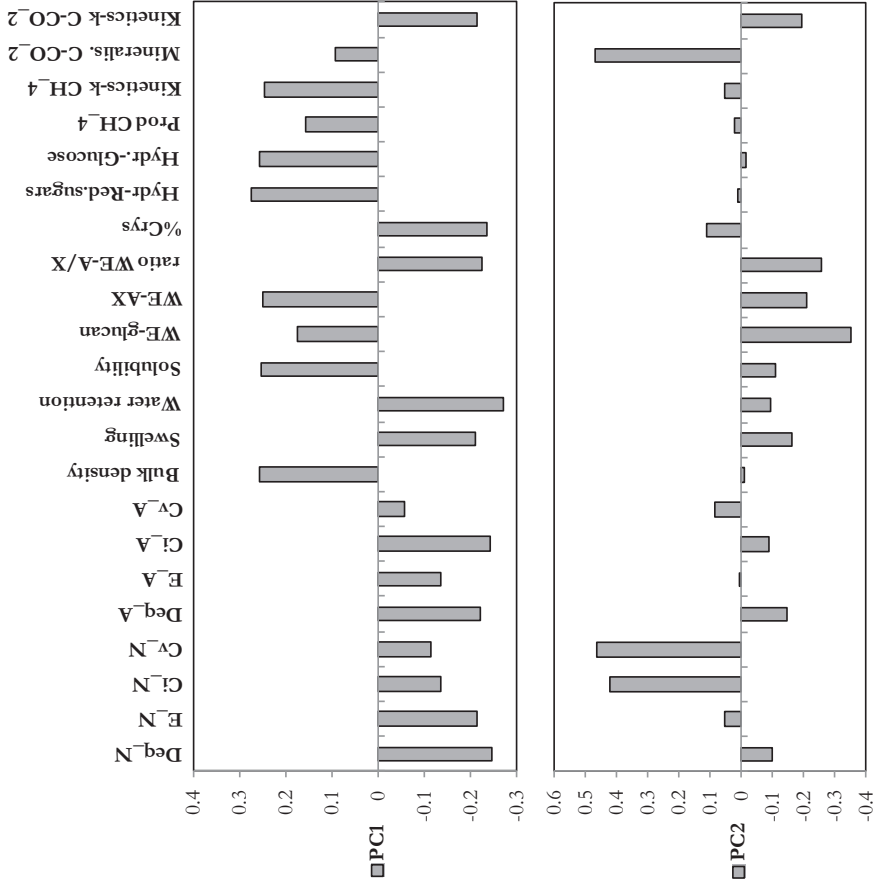


Fig. 56 Graphique de similarités issues de l'analyse en composantes principales (à gauche). PC1 et PC2 : composantes principales 1 et 2. Droite: poids factoriels (loadings) de chaque mesure dans les composantes 1 (en haut) et 2 (en bas).



## Effet du broyage sur les caractéristiques morphologiques des particules

**Article 1 :** Silva, G.G.D., Rouau, X., Sadoudi, A., Barron, C. Morphological modulation of heterogeneous biomass powders by dry grinding. *en préparation*.

De manière générale, les broyats de paille sont placés sur la carte des individus (Fig. 56) selon l'intensité de broyage : PC1 augmente quand on augmente successivement les étapes de broyage. La composante PC2 permet une distinction entre les modes de broyages : selon l'étape et le mode de broyage, PC2 augmente ou diminue par rapport à l'étape précédente. Cette disposition des échantillons nous permet de confirmer la distinction des caractéristiques et comportements aux broyages ultrafins (notamment le broyage à boulets en position très éloignée du jet d'air).

A mesure que PC1 augmente lors des broyages, les valeurs des descripteurs morphologiques des particules diminuent (Deq, E, Ci, Cv en nombre ou en surface). Effectivement, comme discuté dans le Chapitre IV-article 1, le broyage rend les particules plus petites, plus convexes, plus circulaires et moins allongées, qu'elles soient les plus petites ou les plus grandes au sein des poudres. Ce changement de forme et de taille des particules entraîne une meilleure compaction de la poudre ce qui entraîne une augmentation de la densité apparente (*loading* positif en PC1).

Pour analyser les effets des broyages sur la morphologie des particules, nous avons fait appel à l'analyse de la co-inertie multiple (multi tableaux, MCoA) afin de prendre en compte toute l'information liée à la variabilité de la forme et taille des particules broyées. Cela nous a permis d'analyser la redondance et/ou la complémentarité des informations apportées par les différents paramètres obtenus. De manière générale, quelque soit le mode de broyage ou son intensité, les caractéristiques de particules les plus petites au sein d'une même poudre apportent des informations distinctes (différemment structurées) de celles des plus grosses particules (co-inertie entre distributions en nombre-histogramme de fréquences et distributions pondérées par la taille-distributions en surface).

Les données morphologiques ont été traitées de façon globale en prenant en compte les variations liées aux différentes populations de particules au sein de chaque poudre de paille de blé. A titre d'illustration et pour une comparaison simplifiée, nous avons utilisé les valeurs médianes des distributions des paramètres de forme et de taille pour suivre l'évolution d'une particule « type » soumise aux procédés de broyage. Cette particule « type » a été considérée comme un rectangle donc convexe ( $C_v=1$ ) et représente les valeurs dites « pseudo » médianes des broyats car les distributions ne suivent pas la loi normale. L'évolution de la particule type est présentée sur la Fig. 57.

Premièrement, les *loadings* de PC1 montrent que l'effet principal pour différencier les broyats est leur taille ( $Deq_N$  et  $Deq_A$ ), la Fig. 57 montre qu'en effet la taille a été réduite intensivement. Les paramètres de forme  $E_N$  et  $Ci_A$  sont les plus pondérés dans PC1 (entre les données morphologiques) donc on peut dire que le broyage d'une étape à l'autre diminue l'élongation des petites particules et rend les particules les plus grandes plus circulaires. Ces observations peuvent être constatées aussi sur la Fig. 57 à droite où les particules sont présentées sans échelle.



Tab. 14 Propriétés morphologiques des broyats de paille de blé. La morphologie est représentée par les valeurs médianes des distributions.

	Granulométrie laser		Morphologie des petites particules				Morphologie des plus grandes particules				Masse volumique apparente (g/cm <sup>3</sup> )								
	Deq <sub>v</sub> (µm)	span	Deq <sub>N</sub> (µm)	E <sub>N</sub>	Ci <sub>N</sub>	Cv <sub>N</sub>	Deq <sub>A</sub> (µm)	E <sub>A</sub>	Ci <sub>A</sub>	Cv <sub>A</sub>		span							
Coureaux 2mm	759.5 ± 19.5	1.6 ± 0.1	12.5	1.7	2.1	0.7	1.12	0.6	1.12	0.2	1101.6	1.0	2.6	1.0	1.9	0.5	1.2	0.3	0.31 ± 0.02
Centrifuge 1mm	420.9 ± 27.4	2.2 ± 0.1	12.6	2.2	2.1	0.7	1.12	0.6	1.12	0.2	339.6	1.8	2.9	1.0	1.6	0.7	1.2	0.4	0.31 ± 0.02
successif 0.5mm	206.1 ± 9.4	2.7 ± 0.1	7.9	3.0	1.9	0.5	1.10	0.4	1.11	0.2	241.4	1.6	2.6	0.8	1.6	0.4	1.2	0.1	0.32 ± 0.01
0.25mm	88.3 ± 0.8	3.3 ± 0.2	3.8	2.3	2.0	0.5	1.10	0.4	1.12	0.2	135.9	1.3	4.0	0.9	1.7	0.9	1.2	0.7	0.36 ± 0.01
0.12mm	48.3 ± 0.6	3.4 ± 0.0	2.9	2.5	1.9	0.5	1.10	0.4	1.11	0.1	87.2	1.3	2.1	0.7	1.4	0.4	1.1	0.2	0.44 ± 0.02
Centrifuge 0.5mm	269.4 ± 5.8	2.5 ± 0.0	8.1	3.6	2.0	0.6	1.12	0.5	1.12	0.2	570.4	0.7	3.3	1.5	1.8	0.6	1.3	0.3	0.30 ± 0.01
Palettes 0.2/0.3mm	107.5 ± 0.5	3.2 ± 0.1	4.7	3.3	1.9	0.6	1.12	0.4	1.12	0.2	162.9	1.7	2.4	1.3	1.5	0.6	1.2	0.3	0.36 ± 0.01
Boulets 48h	108.5 ± 2.1	4.4 ± 0.3	4.2	2.3	1.9	0.5	1.11	0.5	1.12	0.2	175.2	1.5	2.2	2.1	1.6	0.8	1.2	0.2	0.48 ± 0.00
120h	57.3 ± 1.3	5.2 ± 0.0	2.8	2.0	1.9	0.5	1.10	0.5	1.12	0.2	30.7	2.2	2.5	1.2	1.5	1.0	1.2	0.2	0.47 ± 0.01
240h	9.3 ± 0.1	2.5 ± 0.0	2.5	1.6	1.9	0.5	1.09	1.1	1.11	0.1	8.0	4.6	2.1	0.9	1.2	0.6	1.2	0.3	0.50 ± 0.04
Jet d'air JM	22.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.9	3.0	2.0	0.7	1.14	0.5	1.13	0.2	20.9	2.3	2.3	1.0	1.4	0.6	1.2	0.3	0.40 ± 0.01

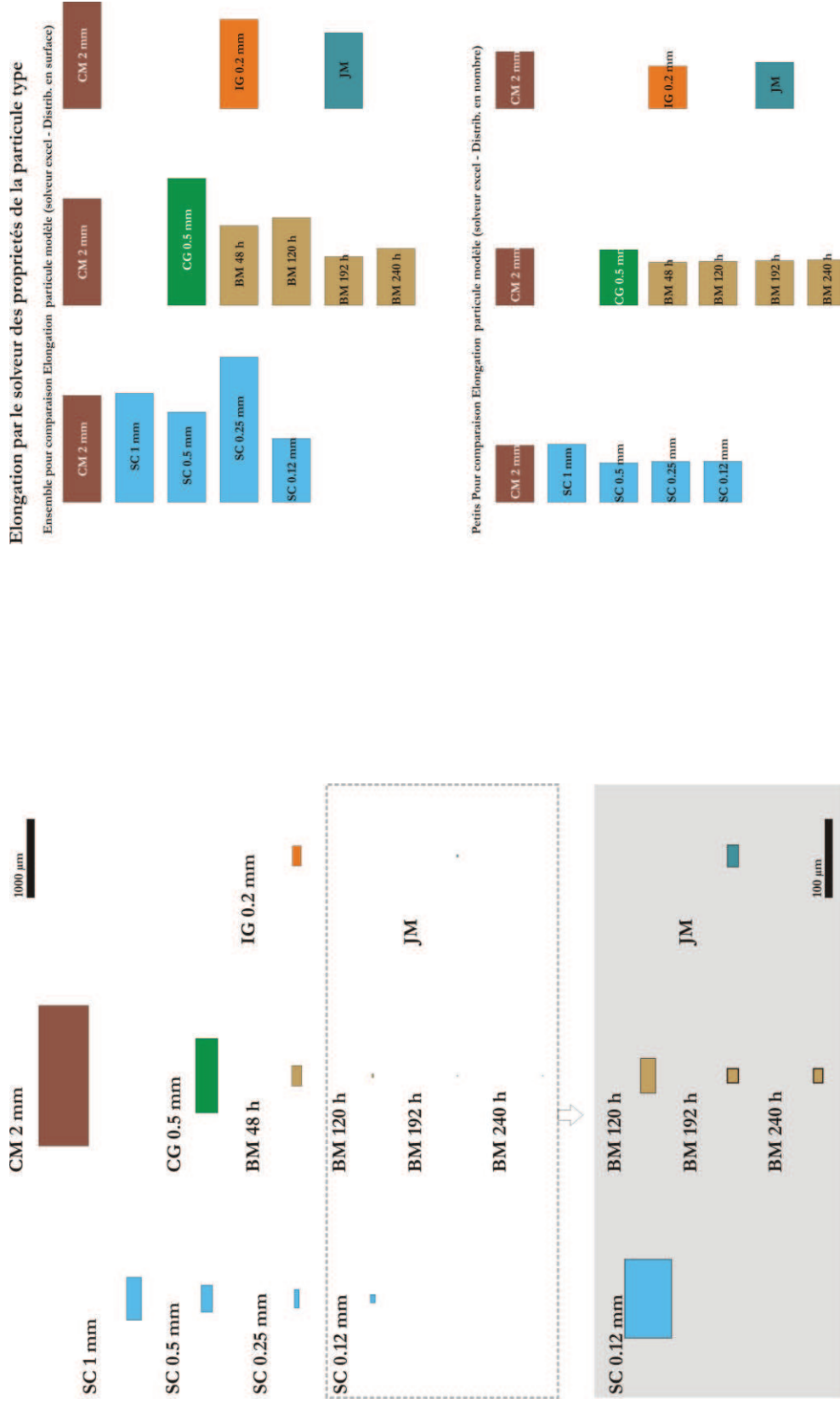


Fig. 57 Evolution morphologique lors des broyages de la particule « type » basée sur l'information des distributions en surface (**grosses particules**) à gauche. A droite : **évolution sans échelle** (adimensionnelle) basée sur l'information des distributions en surface (**grosses particules**) et en nombre (**petites particules**). Les particules ont le même côté pour **comparer leur forme**. Les dimensions de ces particules ont été obtenues en minimisant la somme des écarts relatifs  $[(y-Y)/Y]$  des paramètres A, P, Deq, Fmax, E et Ci (simulation numérique avec le module Solveur de Microsoft Excel). L'écart relatif est  $[(y-Y)/Y]$  où y est la valeur médiane donnée et Y est la caractéristique « type » correspondante. Postulat: particule rectangulaire donc  $Cv=1$ .

Comme observé dans l'article 1 et aussi confirmé par cette PCA, les modes de broyage ont eu un effet légèrement distinct sur les propriétés morphologiques des particules. En effet, le broyage à jet d'air est le plus excentré par rapport à PC2, les autres broyages sont placés de manière similaire par rapport à cette composante. Comme PC2 est très affecté par la convexité et la circularité des petites particules, cela confirme que le broyage à jet d'air (avec son étape intermédiaire IG0.2mm) rend les particules les plus petites plus concaves et moins circulaires. Ce comportement est probablement lié à la sélection dans le séparateur aérodynamique où les particules les plus petites sortent de la chambre de broyage grâce à leur vitesse et leurs propriétés aérodynamiques, même en étant encore composées de plusieurs tissus histologiques, comme des cellules d'épiderme et des bouts de parenchymes. On observe aussi qu'au sein du diagramme des broyages centrifuge successifs certaines étapes augmentent le PC2 et d'autres, le diminuent. Comme il s'agit de changements de convexité des particules, le schéma de la Fig. 57 n'est pas adapté, c'est pourquoi ces changements ne sont pas facilement identifiables avec cette représentation. Grâce à l'analyse MCoA (article 1) nous avons constaté que l'étape intermédiaire avec une grille de 0.5 mm avait un effet inverse sur la morphologie par rapport à l'effet global du broyage : les particules les plus petites sont rendues moins convexes et les grandes particules, moins circulaires. Cela semble être lié à la structure des tissus d'origine des particules de la paille qui, à cause de l'aspiration générée par la vitesse de rotation, voient leur grand axe orienté dans la direction du flux et donc passent longitudinalement dans la grille. Les grilles les plus petites semblent augmenter la réduction des particules transversalement ce qui diminue leur élongation (suivant ainsi le comportement général face au broyage). Le broyage à boulets est celui qui a rendu les particules les plus petites à la fin, convexes et circulaires. Néanmoins, certaines périodes de broyage (de 48 à 120 h et de 192 à 240 h) ont augmenté légèrement l'élongation des petites particules probablement par un effet supplémentaire de défibrillation (dilacération des fibres).

## **Effet du broyage sur la distribution des composés ligno-cellulosiques**

**Article 2 :** Silva, G.G.D., Rouau, X., Guilbert, S., 2011. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw. *Powder Technology*, 208, 266-270. Comme cette étude n'a été faite que sur un groupe de broyats, leur information n'a pas été insérée dans la PCA globale.

La paille n'a pas été broyée de façon homogène par les broyages successifs, quant à la distribution des composés biochimiques au sein des poudres résultantes (du grossier au fin). Les fractions de tamisage en dessous de 50 µm avaient des compositions différentes : lors des premiers broyages, les composés le plus dissociés ont été les cendres et les protéines. La cellulose a été la plus difficile à broyer (présente dans les fractions

retenues par les tamis). Il en résulte qu'une étape de tamisage à un niveau relativement grossier peut être une étape préliminaire de séparation de ces composés : le refus est enrichi en composés pariétaux, ce qui est favorable pour les bioconversions, et la fraction la plus fine est enrichie en minéraux. Cette fraction peut avoir un intérêt comme par exemple source pour l'extraction de la silice végétale.

## Effet du broyage sur l'état des polymères et comportements des poudres en contact avec l'eau

Tab. 15 Propriétés des broyats de paille de blé sur l'état des polysaccharides et leur comportement en contact avec l'eau.

		Solubility (g solubles/g)	WE-gluc (% g/g)	WE-AX (% g/g)	WE-A/X	%Crys (%)	Swelling (mL gonflé/g)	Water reten- tion (g eau/g)
Couteaux	2mm	6.3 ± 1.1	1.2 ± 0.0	0.72 ± 0.01	1.0 ± 0.1	22	11.1 ± 0.6	8.0 ± 0.2
Centrifuge	1mm	7.9 ± 0.5	1.2 ± 0.0	0.72 ± 0.01	1.0 ± 0.1	25	9.1 ± 0.4	6.4 ± 0.5
successif	0.5mm	9.0 ± 0.4	1.5 ± 0.1	0.95 ± 0.01	0.9 ± 0.0	25	9.0 ± 1.0	5.9 ± 0.4
	0.25mm	10.0 ± 0.5	1.0 ± 0.0	0.82 ± 0.05	0.8 ± 0.0	20	8.8 ± 0.5	5.1 ± 0.4
	0.12mm	10.8 ± 0.5	1.3 ± 0.1	1.06 ± 0.03	0.8 ± 0.0	20	8.4 ± 0.5	4.2 ± 0.5
Centrifuge	0.5mm	5.7 ± 0.3	1.2 ± 0.0	0.72 ± 0.01	1.0 ± 0.1	24	10.1 ± 0.6	6.5 ± 0.4
Palettes	0.3mm	7.6 ± 0.4	1.0 ± 0.0	0.82 ± 0.05	0.8 ± 0.0	24	9.1 ± 0.1	5.8 ± 0.3
Boulets	48h	9.1 ± 0.8	1.4 ± 0.1	0.93 ± 0.00	0.9 ± 0.0	20	7.1 ± 0.1	4.4 ± 0.5
	120h	9.8 ± 0.6	1.4 ± 0.1	1.06 ± 0.04	0.8 ± 0.0	17	7.3 ± 0.0	3.6 ± 0.3
	240h	15.0 ± 0.3	2.5 ± 0.1	1.54 ± 0.02	0.8 ± 0.0	13	8.2 ± 0.4	2.5 ± 0.1
Jet d'air		9.5 ± 0.2	0.9 ± 0.0	0.86 ± 0.02	0.7 ± 0.0	21	7.8 ± 0.3	3.4 ± 0.2

Les variations de solubilité massique dans l'eau peuvent indiquer un effet des broyages sur la structuration des constituants de la paille. La solubilisation partielle des hémicelluloses et de la cellulose indiquent des changements de structure de ces polysaccharides. Ceci peut être évalué par leur extractibilité à l'eau. Le broyage ultrafin augmente la solubilisation des arabinoxyanes avec un rapport arabinose/xylose qui diminue (*loadings* positifs en PC1 pour WE-AX et négatifs pour WE-A/X). Davantage de glucanes sont aussi libérés après les broyages ultrafins (*loadings* positifs en PC1), en particulier, le broyage à boulets a doublé la solubilisation sous forme glucose par rapport au broyage grossier, le broyage à jet d'air a solubilisé des arabinoxyanes moins substitués par l'arabinose (plus linéaires). Ces résultats montrent que le broyage à boulets a un effet prononcé sur la structure des hémicelluloses et de la cellulose en les dépolymérisant. Le degré de cristallinité relatif exprime la cristallinité de la cellulose puisqu'elle est la seule structure cristalline dans la paille. Selon les variations de PC1, la cristallinité de la cellulose diminue quand on broie, cependant, nous avons observé que seul le broyage à boulets engendrait une réduction de cette cristallinité.

Ces résultats pour le broyage à boulets sur l'augmentation de l'extractibilité des arabinoxylyanes sont en accord avec les travaux de Van Craeyveld et al. (2008), qui ont vérifié aussi que les broyages rapides (palettes et jet d'air) n'avaient que peu d'impact sur l'extractibilité des arabinoxylyanes des coques de *Psyllium*. La réduction de cristallinité par le broyage à boulets avait été préalablement rapportée pour différents types de biomasse en utilisant des broyeurs à billes à l'échelle laboratoire (Chang & Holtzapple, 2000; Hiden et al., 2009; Inoue et al., 2008; Millett et al., 1979; A.S.A. Silva et al., 2010; Suzuki & Nakagami, 1999). L'absence de changement de cristallinité de la cellulose avait déjà été observée pour le broyage à grille de 0.25 mm de la cellulose purifiée de maïs (Rondeau-Mouro et al., 2003). De même, la cellulose microcristalline Avicel broyée par jet d'air ne présentait pas de changement de cristallinité (Suzuki & Nakagami, 1999)

Des études sur les structures de la lignine ont été effectuées par thioacidolyse en collaboration avec la Prof. Catherine Lapierre de l'IJPB à Grignon, FR. Ces résultats ont montré que la quantité et la distribution des unités S, G et H ne changeaient pas sous l'effet des broyages de cette étude. Nous avons donc utilisé ces données pour établir la moyenne de la composition de la lignine de la paille de départ. Bien que d'autres travaux aient montré que la lignine pouvait être dépolymérisée par l'utilisation de broyeurs à billes de laboratoire (Lawther et al., 1996), il semble que l'utilisation d'un broyeur à boulets en conditions plus douces d'impact (fréquence de rotation 60 rpm et grand volume de la chambre de broyage) à l'échelle pilote ne sont pas suffisantes pour engendrer de telles modifications.

### **Carte des corrélations entre les variables**

Le comportement dans l'eau des broyats est un résultat du aux changements des particules (morphologiques ou structuraux). Il est donc nécessaire d'analyser comment ces propriétés se corrélaient entre elles afin de déterminer l'effet du broyage en amont. La Fig. 58 présente la carte des corrélations en PC1 et PC2. Dans cette carte, les variables les plus éloignées du centre du graphique (longs segments) s'interprètent mieux (sont significatives, contrairement à celles situées davantage vers le centre) et où deux variables : proches sont positivement corrélées, orthogonales sont non corrélées et symétriquement opposées par rapport au centre sont négativement corrélées.

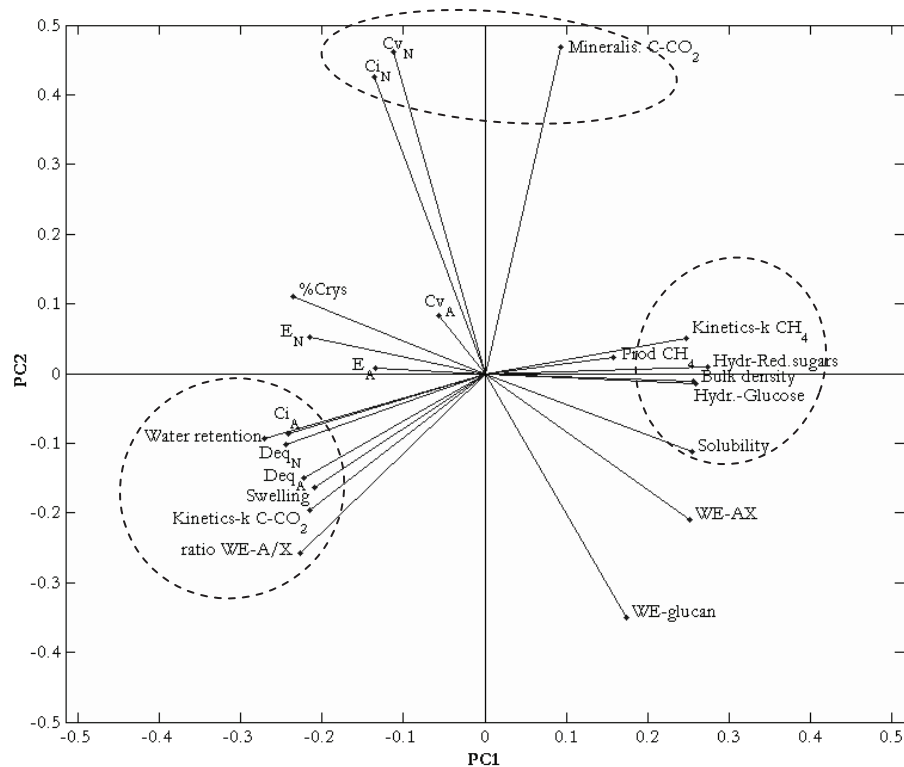


Fig. 58 Corrélations entre les variables analysées (*bottelings*) les composantes 1 et 2 (PC1 et PC2).

La capacité de rétention d'eau et le gonflement dans l'eau sont directement corrélés avec la taille des particules (proches de  $Deq_A$  et  $Deq_N$ ). De plus, la circularité des particules les plus grosses affecte directement ces deux propriétés des poudres en contact avec l'eau (proche de  $Ci_A$ ). C'est à dire que la réduction de la taille et l'augmentation du caractère circulaire des grandes particules entraîne une diminution de la capacité de rétention d'eau et de gonflement. Cela est probablement lié à la formation d'un réseau moins interactif entre les particules, les particules sont tassées de façon plus compacte et forment un réseau moins structuré pour retenir l'eau (après centrifugation). Dans le sens inverse, plus une particule est grande et concave, plus la poudre aura une meilleure capacité d'interaction avec l'eau.

## Effets du broyage sur les biodégradations

Cette partie est présentée en deux temps : d'abord les interactions au sein des biodégradations sont analysées et ensuite la globalité des résultats est analysée vis-à-vis des biodégradations.

Tab. 16 Résultats des biodégradations des broyats de paille de blé.

		Hydrolyse enzymatique		Méthanisation (BMP)		Minéralisation dans le sol	
		Red.sugars (mmol/g)	Glucose (mmol/g)	Methane (mL /g)	Kinetic k (day <sup>-1</sup> )	Mineralis. C-CO <sub>2</sub> (mg / kg sol)	Kinetic k (day <sup>-1</sup> )
Couteaux	2mm	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	300.5 ± 8.3	0.033 ± 0.003	975.2 ± 21.1	0.072 ± 0.005
Centrifuge succesif	1mm	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	277.0 ± 6.0	0.035 ± 0.002	n.d.	n.d
	0.5mm	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	283.4 ± 5.6	0.037 ± 0.002	n.d	n.d
	0.25mm	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.0	280.1 ± 5.3	0.047 ± 0.003	n.d	n.d
	0.12mm	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.0	280.2 ± 4.4	0.047 ± 0.002	n.d	n.d
Centrifuge	0.5mm	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.0	291.2 ± 4.9	0.041 ± 0.002	969.9 ± 22.9	0.074 ± 0.005
Palettes	0.3mm	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.0	313.2 ± 5.1	0.041 ± 0.002	1 023.2 ± 25.6	0.072 ± 0.005
Boulets	48h	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	294.8 ± 4.9	0.041 ± 0.002	992.6 ± 25.3	0.066 ± 0.005
	120h	1.2 ± 0.0	0.6 ± 0.0	312.8 ± 4.9	0.049 ± 0.003	994.1 ± 25.9	0.066 ± 0.005
	240h	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1	326.8 ± 7.6	0.051 ± 0.004	988.4 ± 36.9	0.055 ± 0.006
Jet d'air		1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.0	306.0 ± 5.6	0.046 ± 0.003	1 081.4 ± 29.9	0.053 ± 0.004

### ➤ Interactions au sein des biodégradations : hydrolyse enzymatique vs bioconversions

**Article 3 :** Silva, G.G.D., Couturier, M., Berrin, J.-G., Buléon, A., Rouau, X., 2012 Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 103, 192-200.

**Article 4 :** Silva, G.G.D., Dumas, C., Recous, S., Rouau, X.,. Bioconversion of ultra-finely ground wheat straw: anaerobic degradation and decomposition in soil. *en préparation*.

Premièrement, le comportement de la paille broyée face à la dégradation enzymatique est rappelé : la saccharification a été améliorée par la réduction consécutive de la taille par les broyages à grille ou jet d'air jusqu'à un maximum : jusqu'à ~100 µm (diamètre médian en volume) la solubilisation des polysaccharides augmente mais, au delà de cette taille, elle se stabilise à 36 % des polysaccharides totaux et 40 % de la cellulose (rendements d'hydrolyse). Cependant, les échantillons issus du broyage à boulets ont dépassé cette limite et ont pu être hydrolysés jusqu'à 46 % des polysaccharides totaux et 72 % de la cellulose. Ceci est lié à une augmentation de l'accessibilité de la paille de blé aux enzymes hydrolytiques. Cette accessibilité peut être affectée par divers facteurs comme l'augmentation de la surface spécifique (macrostructure), la dissociation des tissus/parois cellulaires plus au moins susceptibles à la dégradation enzymatique (microstructure), et enfin par une modification de la structure des polymères ligno-cellulosiques (niveau macromoléculaire).

Au sein des données de biodégradations (Fig. 58), on observe que les rendements d'hydrolyse enzymatique, la production en méthane, la constante cinétique de méthanisation sont très proches donc corrélés. La constante cinétique de décomposition dans le sol est inversement corrélée à la dégradation enzymatique et à la méthanisation (opposés). La minéralisation totale cumulée ne semble pas être corrélée à ce groupe (presque orthogonal).



Quelque soit l'effet qui entraîne un meilleur accès des enzymes aux substrats, les rendements de solubilisation enzymatique peuvent être considérés comme des révélateurs de cette accessibilité qui prennent en compte tous les changements possibles. Nous présentons dans la Fig. 59 la corrélation entre les comportements lors des bioconversions en méthane ou en CO<sub>2</sub> et l'augmentation d'accessibilité des polysaccharides totaux (hydrolyse en sucres réducteurs) ou de la cellulose (hydrolyse en glucose). Trois grands effets sont observés dans la Fig. 59: i) la comparaison entre les modes d'action des deux types de bioconversions, ii) les effets sur le plateau final (total cumulé) *vs.* la cinétique de conversion, et finalement iii) l'accessibilité des polysaccharides totaux (cellulose+hémicelluloses) *vs.* celle de la cellulose.

Les effets du broyage vis-à-vis des deux types de conversion (effet i) et les effets sur le plateau et la cinétique (effet ii) sont distincts. La méthanisation est nettement accélérée par les broyages (augmentation de la constante de cinétique) résultant en productions de méthane légèrement augmentées en particulier pour le broyage à boulets. La décomposition de la paille dans le sol est favorisée par le broyage en général (par comparaison au témoin non-broyé) mais peu affectée par les broyages fins et ultrafins, seul le produit de broyage à jet d'air semble être plus extensivement minéralisé. D'autre part, au contraire de la méthanisation, les décompositions sont plus longues avec les broyages fins et ultrafins (les constantes cinétiques diminuent).

D'après les Fig. 58 et Fig. 59, on observe que l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes hydrolytiques est bien corrélée avec la production de méthane et surtout avec la cinétique de méthanisation (Fig. 59A). En revanche, l'accessibilité de la cellulose ne semble pas être directement corrélée à la production finale de méthane ou à sa cinétique (entre BMi48h et BMi120h la production de méthane augmente même si l'hydrolyse de la cellulose reste stable). Ceci indique l'importance de la dégradation des hémicelluloses lors de la méthanisation. Etant donné que la décomposition cumulée dans le sol n'est que très peu affectée par le broyage (Fig. 58 et Fig. 59), cette gamme de variation de l'accessibilité aux enzymes des hémicelluloses ou de la cellulose ne semble pas être déterminante pour la décomposition de la paille. En revanche, l'accessibilité aux enzymes hydrolytiques est négativement corrélée à la vitesse de décomposition (Fig. 58 et Fig. 59). Néanmoins, d'autres paramètres liés aux substrats, différents de l'accessibilité aux enzymes, peuvent être responsables de ce ralentissement de la décomposition dans le sol, comme les interactions agglomérat de sol *vs* taille et forme des particules de substrat, accessibilité à l'oxygène (porosité) et migration et/ou protection des composés solubles dans ce système complexe de décomposition.

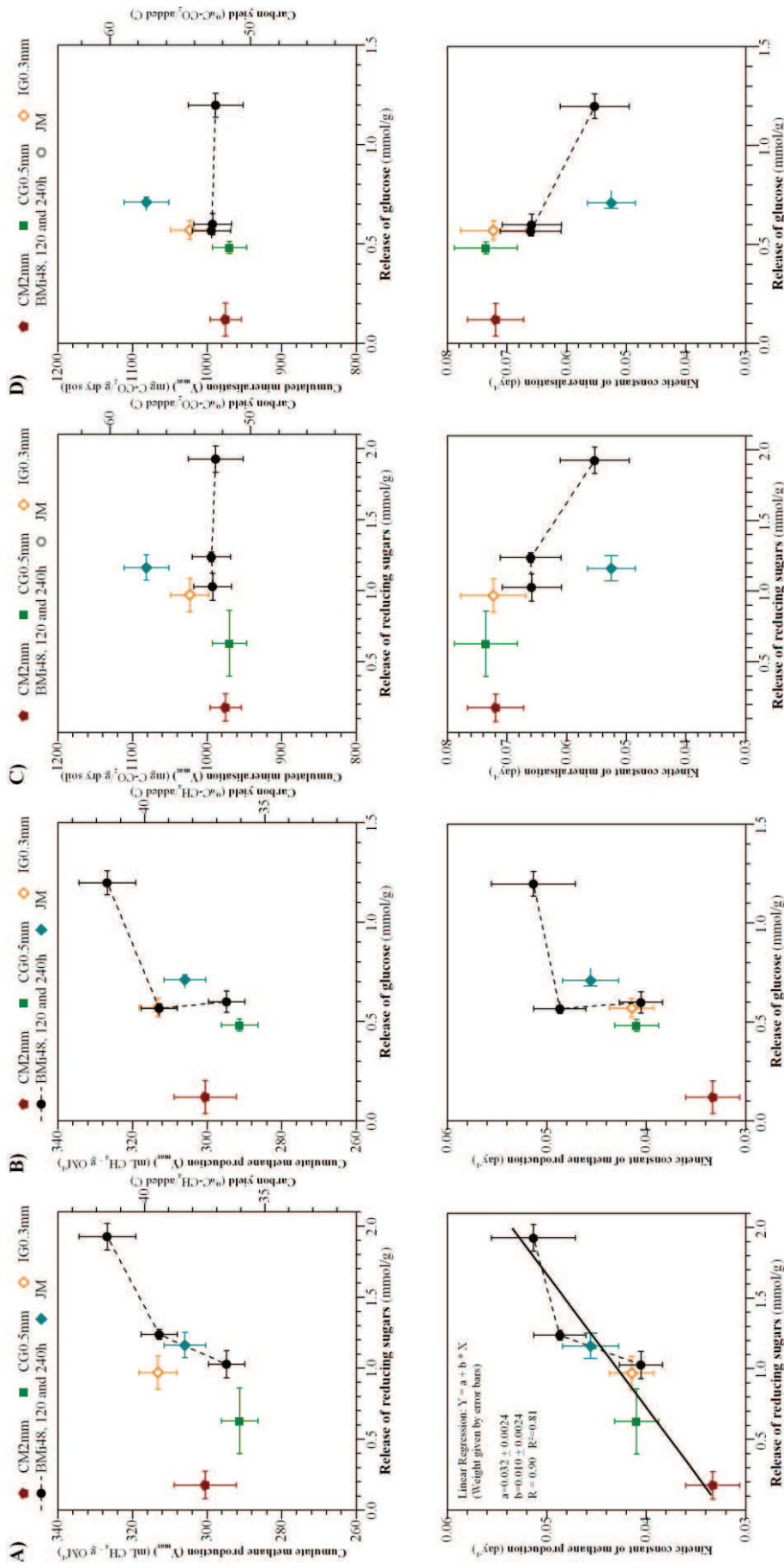


Fig. 59 Bioconversions en fonction de l'accessibilité des polysaccharides aux enzymes représenté par la solubilisation enzymatique en sucres réducteurs (A et C) et en glucose (B et C). Les courbes d'incubation de la bioconversion en méthane (A et B) et de la décomposition dans le sol en CO<sub>2</sub> (C et D) ont été ajustées à l'équation de cinétique de premier ordre : en haut, les valeurs de production cumulée (plateaux) et en bas, les constantes de cinétique de premier ordre.

### ➤ Effet des caractéristiques des broyats sur les bioconversions

Dans cette partie, on met tout d'abord en évidence la succession des effets discutés jusqu'ici : en amont, le broyage entraîne des changements de forme et de structure des particules, deuxièmement ces changements affectent les propriétés collectives au sein des poudres, par conséquent, la dégradation enzymatique est affectée ce qui à son tour affecte davantage les bioconversions en aval. Nous allons présenter, par la suite, les propriétés des particules qui affectent en premier lieu la dégradation enzymatique et ensuite les propriétés des particules qui affectent ses bioconversions. Néanmoins, il faut savoir que ces dernières sont la somme des effets des propriétés des particules associée aux changements d'accessibilité enzymatique.

En analysant les corrélations dans la Fig. 58, on constate que la dégradation enzymatique (saccharification) est améliorée principalement par la réduction de la taille ( $Deq_N$  et  $Deq_A$ ) ce qui est du à l'augmentation de surface spécifique. De plus, la réduction de la cristallinité de la cellulose et l'augmentation de la solubilité massique dans l'eau ont eu pour rôle d'augmenter davantage l'accessibilité de la paille aux enzymes hydrolytiques, notamment dans le cas du broyage à boulets. La réduction du degré de substitution des arabinoxylanes solubles semble être aussi un facteur qui favorise cet accès. En effet, la solubilisation partielle des polysaccharides peut amorcer le dévoilement de nouvelles zones accessibles des microfibrilles de cellulose qui, à leur tour, ont une structure moins cristalline donc plus susceptible à l'hydrolyse. De plus, comme les arabinoxylanes solubilisés sont moins substitués, cela indique qu'ils interagissaient probablement plus à l'origine avec les chaînes de cellulose et, l'effet du broyage les aura donc diminués dans la structure insoluble restante. La fraction soluble contenant, après broyage ultrafin, plus de substrats facilement hydrolysables, cela rend l'hydrolyse plus rapide (article 3).

La méthanisation est affectée par les mêmes effets que les dégradations enzymatiques. Cependant l'intensité de ces effets sur la production de méthane est moins importante (*bottelings* plus importants pour la saccharification que pour la production de méthane). La cinétique de méthanisation à son tour est corrélée très nettement aux mêmes facteurs. Néanmoins, comme discuté précédemment, on peut considérer que l'effet majeur qui affecte la méthanisation est l'accessibilité aux enzymes hydrolytiques (notamment des polysaccharides totaux comme discuté dans la section précédente) puisque cette bioconversion est limitée par l'étape d'hydrolyse (Palmowski & Muller, 2003). Cette dernière avait été déjà améliorée par ces changements de forme/taille et de structure des polymères.

Nous avons montré que la décomposition dans le sol ne pouvait pas être corrélée à l'augmentation d'accessibilité aux enzymes. Pour comprendre plus profondément les

caractéristiques des poudres de paille affectant cette bioconversion, on observe la Fig. 58. La minéralisation cumulée totale de la paille semble être relativement corrélée à la convexité et la circularité des petites particules. En d'autres termes, quand les particules les plus petites sont moins convexes et moins circulaires (valeurs de  $C_v$  et  $C_i$  plus élevées), la décomposition est plus extensive. Aucune des variables testées n'a été anticorrélée. Étonnamment, la solubilité massique dans l'eau ou celle des polysaccharides ne semble pas affecter la minéralisation totale cumulée de la paille (variables relativement orthogonales). Bien évidemment, ces résultats ne sont valables que dans la gamme des broyats produits. La cinétique de décomposition a été fortement corrélée à la taille  $Deq_N$  et  $Deq_A$ . Cela indique que la réduction de taille entraîne un ralentissement de cette décomposition. En effet, il se peut que le rapport taille du substrat/taille de l'agglomérat de sol ait de l'importance dans le phénomène de protection des substrats au sein de l'agglomérat. De plus, le degré de substitution des arabinoxylyanes solubles dans l'eau est aussi corrélé à la cinétique : la réduction de ce degré de substitution entraîne alors un ralentissement de la décomposition.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



## **VII Conclusions et perspectives**

### **Faisabilité Technique**

Des méthodes de broyage poussé de la paille de blé ont été développées en utilisant trois modes de sollicitation. La paille de blé a été fragmentée de façon à générer des poudres d'une large gamme de tailles de particules, du grossier (mm) à l'ultrafin (<20 $\mu$ m). Cette thèse s'insère dans une thématique générale visant établir les bases d'une raffinerie du végétal incluant notamment des procédés par voie sèche en amont d'autres étapes de bioraffinerie et des applications finales (bioénergies, biomatériaux ou biomolécules). Les procédés développés dans ce travail serviront désormais de bases pour le broyage ultrafin de la biomasse ligno-cellulosique au sein de cette thématique générale. De plus, un outil pour la caractérisation morphologique des particules de biomasse (mais applicable de façon beaucoup plus générique) a été développé, qui prend en compte la variabilité des caractéristiques des particules.

### **Hétérogénéité de la biomasse associée à la complexité des mécanismes de broyages**

Etant donné la complexité des contraintes mécaniques générées lors des opérations de broyage et que la paille de blé est une matière hétérogène à plusieurs niveaux d'échelle, la paille broyée a présenté une variabilité considérable en termes de morphologie et de composition biochimique des particules au sein des poudres affectant ainsi ses propriétés collectives.

### **Modes de broyage : rôle important sur les particules/poudres**

Nous avons constaté que les particules suivaient des itinéraires/destinées différents selon le mode de broyage, en termes de morphologie et structure du réseau ligno-cellulosique (extractibilité des polysaccharides et cristallinité de la cellulose). En particulier, le broyage à boulets a provoqué ces changements de façon la plus marquée.

### **Conséquences sur les attaques enzymatiques**

Les procédés de broyages (différents modes et intensités) ont affecté directement les dégradations enzymatiques. L'hydrolyse enzymatique (saccharification par l'action des enzymes cellulolytiques) a révélé une augmentation de l'accessibilité des broyats aux enzymes. La taille des particules a affecté inversement les rendements d'hydrolyse jusqu'à



une limite d'une centaine de microns. Seuls des changements ultrastructuraux du réseau ligno-cellulosique ont permis de dépasser cette limite. Enfin, le maximum d'accessibilité atteinte a montré que le broyage à boulets était un procédé très compétitif par rapport à un procédé concurrent de prétraitement de la biomasse, notamment pour la production de bioéthanol (explosion à la vapeur). Cette amélioration de réactivité enzymatique s'est traduite par des bioconversions en méthane plus rapides et légèrement plus extensives. La bioconversion dans le sol, en revanche, semble avoir été ralentie de manière générale par la diminution de taille, par un effet de protection du substrat par les agglomérats de sol.

Chacune des parties de cette thèse nécessiterait néanmoins des développements en termes d'acquisition de connaissances et de compréhension des mécanismes en jeu et aussi en termes d'amélioration de procédés. Voici quelques pistes de recherche :

### **Comportement de la biomasse lors des broyages**

Le comportement de la biomasse lors des broyages est peu connu. La destinée des tissus lors de la fragmentation de la biomasse peut être suivie par des techniques spectrales (telles que la spectroscopie Raman ou de fluorescence *in situ*) ainsi que par l'utilisation de colorations spécifiques, en microscopie optique ou confocale.

L'étude des compositions et du comportement vis-à-vis des broyages, ou d'autres traitements des différents tissus pourrait être menée sur des tissus isolés. Pour ce faire, l'isolation de ces tissus peut être envisagée par dissection manuelle ou par dissection laser. Enfin, une identification de marqueurs chimiques de chaque tissu/ensemble de cellules semble d'intérêt comme dans l'exemple développé pour le son de blé (Hemery et al., 2009).

Finalement, le comportement mécanique de ces tissus végétaux est corrélé à leur comportement lors des broyages. L'étude des propriétés mécaniques à différents niveaux de structure peut être envisagée : au niveau microscopique par l'utilisation des tests micromécaniques (indentation ou ablation laser qui par l'interaction de la lumière/matière est corrélé avec la cohésion de la matière (Martelli et al., 2011)) ; à une échelle macroscopique, l'hétérogénéité des structures internes et la conformation des tiges (creuses dans le cas du blé) rendent les tests classiques quasi-statiques de traction/compression/flexion difficiles et peu corrélés au comportement de la matière dans des broyeurs à haute vitesse d'impact. Des tests à haute vitesse de sollicitation (ex. Barre de Hopkinson) sur des éprouvettes plus « globales » (paille compressée) pourront donner de l'information sur le comportement mécanique du matériau dans différentes conditions d'environnement et de modes d'attaque.

## **Procédés - Broyages et autres traitements simultanés ou préliminaires**

Tout d'abord, une étude plus poussée sur le broyage à jet d'air est nécessaire pour comprendre plus finement ses effets sur les particules/bioconversions, en faisant varier les intensités de broyage.

Le développement d'un micro-broyeur instrumenté pour la mesure énergétique servira à la détermination de la broyabilité des produits et le screening de prétraitements possibles. Les propriétés mécaniques et la broyabilité/dissociation des tissus pourraient être orientées par l'application de prétraitements afin de fragiliser ou renforcer des structures ou interfaces ciblées selon la fonctionnalisation souhaitée. Des traitements simultanés ou avant le broyage peuvent être envisagés par voie sèche par l'utilisation de très peu de liquide qui serait complètement absorbé par la biomasse sans faire varier fortement sa siccité. Différents types de traitements sont ainsi envisageables :

LES CHIMIQUES : hydrolytiques par l'utilisation de gaz d'acides ou de bases (par ex. l'ammoniac).

LES PHYSIQUES : température (élevée en absence d'oxygène – torréfaction ou sub-torréfaction, ou cryogénique notamment dans les cas des produits très humides), plasma (gaz ionisé par l'action d'un courant électrique entraînant la formation des radicaux hautement réactifs qui engendrent des dépolymérisations et changements d'état de surface), gaz inertes pour éviter l'oxydation des composés.

LES ENZYMATIQUES OU BIOLOGIQUES : ajout d'enzymes hydrolytiques pouvant avoir une double action, la première dans le broyeur et la deuxième lors de la mise en œuvre ultérieure en présence de plus d'eau (bioconversions). Les biologiques par des dégradations par des champignons ligninolytiques se développant dans la biomasse lors du stockage (fragiliser la structure ligno-cellulosique par la dégradation de la lignine).

## **Procédés : Séparations multi-échelles**

Ce travail de thèse a montré que les procédés de broyage entraînent une variabilité des particules à divers niveaux. Ces différentes populations de particules pourront être séparées afin de produire des fractions d'intérêt en fonction de leur composition, structure ou comportement. Pour cela des séparations basées sur la taille, les propriétés aérodynamiques ou électrostatiques peuvent créer des fractions avec des propriétés contrastées à plusieurs échelles.

## **Technique d'étude morphologique**

L'étude morphologique développée dans cette étude peut être validée par l'utilisation de particules modèles et par la préparation de mélanges afin de créer des polydispersités connues.

## **Bioconversions**

Nous avons évalué un « potentiel éthanol » par l'hydrolyse enzymatique de la paille. L'étude qui suit doit être l'utilisation de ces poudres pour la fermentation éthanolique conventionnelle et aussi les fermentations par les nouvelles souches capables de convertir les pentoses en éthanol. Dans ce cas, il est intéressant de quantifier l'effet de l'augmentation de sucres disponibles tout en prenant en compte l'effet inhibiteur/adsorbeur des lignines à l'état natif, et en comparaison avec des procédés concurrents comme l'explosion à la vapeur.

## **Etude énergétique**

Pour évaluer la viabilité des ces procédés de broyage dans le contexte de la valorisation de la biomasse ligno-cellulosique, il est important de mesurer leur consommations énergétiques, optimiser les équipements et enfin pondérer le rapport entre l'augmentation de réactivité de ces poudres et le gain énergétique/fonctionnel.

## **Application à des produits de plus haute valeur ajoutée**

La réactivité des poudres a été changée par les procédés développés dans cette thèse. Il serait intéressant d'évaluer comment cela se traduit en termes d'extractibilité de produits à haute valeur ajoutée tels que les antioxydants (issues de la lignine ou des acides hydroxycinnamiques), pigments ou synthons (Garrote et al., 2004; Hosseinian & Mazza, 2009; Pan et al., 2006).

## REFERENCES



## References

- Adapa, P., Tabil, L., Schoenau, G., 2010. Physical and frictional properties of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw grinds. *Powder Technology*. 201, 230-241.
- Adapa, P., Tabil, L., Schoenau, G., 2011. Grinding performance and physical properties of non-treated and steam exploded barley, canola, oat and wheat straw. *Biomass and Bioenergy*. 35, 549-561.
- Allen, T., 1997. Data presentation and interpretation, 5th ed Particle Size Measurement Chapman and Hall, London, pp. 45-54.
- Andren, R.K., R.J., E., J.E., M., 1976. Cellulosic substrates for enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 6, 177-203.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., Lier, J.B.v., 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science & Technology*. 59, 927-34.
- Angelidaki, I., Ellegaard, L., Ahring, B., Ahring, B., Ahring, B., Angelidaki, I., Dolfing, J., Euegaard, L., Gavala, H., Haagenzen, F., Mogensen, A., Lyberatos, G., Pind, P., Schmidt, J., Skiadas, I., Stamatelatos, K., 2003. Applications of the Anaerobic Digestion Process Biomethanation II. Springer Berlin / Heidelberg, pp. 1-33.
- Angers, D.A., Recous, S., 1997. Decomposition of wheat straw and rye residues as affected by particle size. *Plant and Soil*. 189, 197-203.
- Anoussamy, M., Richard, G., Recous, S., Guérif, J., 2000. Change in mechanical properties of wheat straw due to decomposition and moisture. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*. 16, 657-664.
- Arantes, V., Saddler, J., 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 3, 4.
- Arantes, V., Saddler, J., 2011. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 4, 3.
- Arthur, J.F., Kepner, R.A., Dobie, J.B., Miller, G.E., Parsons, P.S., 1982. Tub grinder performance with crop and forest residues. *Transactions of the ASABE*. 25, 1488-1494.
- Averous, L., Le Digabel, F., 2006. Properties of biocomposites based on lignocellulosic fillers. *Carbohydrate Polymers*. 66, 480-493.
- Ballesteros, I., Oliva, J., Navarro, A., González, A., Carrasco, J., Ballesteros, M., 2000. Effect of chip size on steam explosion pretreatment of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86, 97-110.

- Barry, P., Grenet, E., 1988. Dégradation microbienne dans le rumen de la tige de blé à différents stades de développement, observée au microscope électronique à balayage *Reproduction Nutrition Développement*. 28 89-90.
- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M.V., Boerjan, W., 1998. Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 17, 125-197.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., Saddler, J., 2006. Inhibition of cellulase, xylanase and b-glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*. 125, 198-209.
- Bernotat, S., Schönert, K., 1988. Size Reduction Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 5.1-5.30.
- Bertrand, D., 2008. SAISIR-Package of function for chemometrics in the MATLAB® environment Unité de Sensométrie et de Chimiométrie. ENITIAA-INRA, rue de la Géraudière-BP 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France, [http://www.chimimetrie.fr/crbst\\_14.html](http://www.chimimetrie.fr/crbst_14.html).
- Bertrand, I., Chabbert, B., Kurek, B., Recous, S., 2006. Can the biochemical features and histology of wheat residues explain their decomposition in soil? *Plant and Soil*. 281, 291-307.
- Bertrand, I., Prevot, M., Chabbert, B., 2009. Soil decomposition of wheat internodes of different maturity stages: Relative impact of the soluble and structural fractions. *Bioresource Technology*. 100, 155-163.
- Bimbenet, J.J., Duquenoy, A., Trystram, G., 2002. Génie des procédés alimentaires : des bases aux applications. Dunod.
- Bitra, V.S.P., Womac, A.R., Chevanan, N., Miu, P.I., Igathinathane, C., Sokhansanj, S., Smith, D.R., 2009. Direct mechanical energy measures of hammer mill comminution of switchgrass, wheat straw, and corn stover and analysis of their particle size distributions. *Powder Technology*. 193, 32-45.
- Bitra, V.S.P., Womac, A.R., Igathinathane, C., Miu, P.I., Yang, Y.T., Smith, D.R., Chevanan, N., Sokhansanj, S., 2009. Direct measures of mechanical energy for knife mill size reduction of switchgrass, wheat straw, and corn stover. *Bioresource Technology*. 100, 6578-6585.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A., 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*. 113, 291-299.
- Bledzki, A.K., Gassan, J., 1999. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in Polymer Science*. 24, 221-274.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M., 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 54, 519-546.
- Breet, C.T., Waldron, K., 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls, 2nd ed. Chapman & Hall.
- Bremer, E., Houtum, W., Kessel, C., 1991. Carbon dioxide evolution from wheat and lentil residues as affected by grinding, added nitrogen, and the absence of soil. *Biology and Fertility of Soils*. 11, 221-227.



- Bridgeman, T.G., Darvell, L.I., Jones, J.M., Williams, P.T., Fahmi, R., Bridgwater, A.V., Barraclough, T., Shield, I., Yates, N., Thain, S.C., Donnison, I.S., 2007. Influence of particle size on the analytical and chemical properties of two energy crops. *Fuel*. 86, 60-72.
- Bryant, M.P., 1979. Microbial Methane Production-Theoretical Aspects. *Journal of Animal Science*. 48, 193-201.
- Buranov, A.U., Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*. 28, 237-259.
- Cadoche, L., López, G.D., 1989. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. *Biological Wastes*. 30, 153-157.
- Carpita, N.C., 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47, 445-476.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 3, 1-30.
- Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenès, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I., 2010. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 183, 1-15.
- Caulfield, D.F., Moore, W.E., 1974. effect of varying crystallinity of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Wood Science*. 6, 375-379.
- Chandra, R.P., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N., 2007. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels*. Springer-Verlag Berlin, Berlin, pp. 67-93.
- Chang, V., Burr, B., Holtzapple, M., 1997. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 63-65, 3-19.
- Chang, V.S., Holtzapple, M.T., 2000. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84/86, 5 - 37.
- Chang, X.F., Chandra, R., Berleth, T., Beatson, R.P., 2008. Rapid, Microscale, Acetyl Bromide-Based Method for High-Throughput Determination of Lignin Content in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 6825-6834.
- Chaussod, R., Nicolardot, B., Catroux, G., 1986. Mesure en routine de la biomasse microbienne des sols par la méthode de fumigation au chloroforme. *Science du sol*. 2, 201-211.
- Chessel, D., Hanafi, M., 1996. Analyses de la co-inertie de K nuages de points. *Revue de statistique appliquée*. 44, 35-60.
- Chevanan, N., Womac, A.R., Bitra, V.S.P., Igathinathane, C., Yang, Y.T., Miu, P.I., Sokhansanj, S., 2010. Bulk density and compaction behavior of knife mill chopped switchgrass, wheat straw, and corn stover. *Bioresource Technology*. 101, 207-214.

- Chundawat, S.P.S., Venkatesh, B., Dale, B.E., 2007. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Biotechnology and Bioengineering*. 96, 219-231.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 3-23.
- Coughlan, M.P., 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 3, 39-109.
- Couturier, M., Haon, M., Coutinho, P.M., Henrissat, B., Lesage-Meessen, L., Berrin, J.-G., 2011. *Podospora anserina* hemicellulases potentiate *Trichoderma reesei* secretome for the saccharification of lignocellulosic biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM.01761-10.
- Culhane, A., Perrière, G., Higgins, D., 2003. Cross-platform comparison and visualisation of gene expression data using co-inertia analysis. *BMC Bioinformatics*. 4, 1-15.
- Currie, H.A., Perry, C.C., 2007. Silica in plants: Biological, biochemical and chemical studies. *Annals of Botany*. 100, 1383-1389.
- Dasari, R., Berson, R.E., 2007. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 137-140, 289-299.
- Dignac, M.F., Bahri, H., Rumpel, C., Rasse, D.P., Bardoux, G., Balesdent, J., Girardin, C., Chenu, C., Mariotti, A., 2005. Carbon-13 natural abundance as a tool to study the dynamics of lignin monomers in soil: an appraisal at the Closeaux experimental field (France). *Geoderma*. 128, 3-17.
- Dolédec, S., Chessel, D., 1994. Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology*. 31, 277-294.
- Donaldson, L.A., 2001. Lignification and lignin topochemistry -- an ultrastructural view. *Phytochemistry*. 57, 859-873.
- Dresbøll, D.B., Thorup-Kristensen, K., 2005. Structural differences in wheat (*Triticum aestivum*), hemp (*Cannabis sativa*) and Miscanthus (*Miscanthus ogiformis*) affect the quality and stability of plant based compost. *Scientia Horticulturae*. 107, 81-89.
- Duff, S.J.B., Murray, W.D., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 55, 1-33.
- Dumas, C., Silva, G.G.D., Rouau, X., Carrère, H., Steyer, J.-P., 2010. Wheat straw milling effect on biogas production 12th world congress on anaerobic digestion, Guadalajara, Mexico.
- Eastman, J.A., Ferguson, J.F., 1981. Solubilization of Particulate Organic Carbon during the Acid Phase of Anaerobic Digestion. *Journal (Water Pollution Control Federation)*. 53, 352-366.
- Esau, K., 1977. Anatomy of seed plants, 2nd ed. Wiley.

- Esteban, L.S., Carrasco, J.E., 2006. Evaluation of different strategies for pulverization of forest biomasses. *Powder Technology*. 166, 139-151.
- Esteghlalian Ali, R., Srivastava, V., Gilkes, N., Gregg David, J., Saddler John, N., 2000. An Overview of Factors Influencing the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Feedstocks Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion. American Chemical Society, pp. 100-111.
- Evert, R.F., 2006. Esau's Plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development, 3rd ed. Wiley-Interscience.
- Fang, Q., Boloni, I., Haque, E., Spillman, C.K., 1997. Comparison of energy efficiency between a roller mill and a hammer mill. *Applied Engineering in Agriculture*. 13, 631-635.
- Fengel, D., Wegener, G., 1984. Distribution of the component within the wood cell wall. in: D. Fengel, G. Wegener (Eds.), Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Verlag Kessel, pp. 227-239.
- Fengel, D., Wegener, G., 1984. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Verlag Kessel.
- Frigon, J.-C., Guiot, S.R., 2010. Biomethane production from starch and lignocellulosic crops: a comparative review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 4, 447-458.
- Garrote, G., Cruz, J.M., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2004. Antioxidant activity of byproducts from the hydrolytic processing of selected lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*. 15, 191-200.
- Gharpuray, M.M., Lee, Y.-H., Fan, L.T., 1983. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 25, 157-172.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*. 139, 187-194.
- Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Warren, R.A., 1991. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiological Reviews*. 55, 303-315.
- Gindl, W., Gupta, H.S., Gr, uuml, nwald, C., 2002. Lignification of spruce tracheid secondary cell walls related to longitudinal hardness and modulus of elasticity using nano-indentation. *Canadian Journal of Botany*. 80, 1029-1033.
- Gomec, C.Y., Kim, M., Ahn, Y., Speece, R.E., 2002. The role of pH in mesophilic anaerobic sludge solubilization. *Journal of Environmental Science and Health. Part A: Toxic/hazardous substances & environmental engineering*. 37 1871-1878.
- Grabber, J.H., 2005. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. 45, 820-831.
- Grabber, J.H., Ralph, J., Hatfield, R.D., 1998. Ferulate Cross-Links Limit the Enzymatic Degradation of Synthetically Lignified Primary Walls of Maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 2609-2614.

- Grabber, J.H., Ralph, J., Hatfield, R.D., Quideau, S.p., 1997. p-Hydroxyphenyl, Guaiacyl, and Syringyl Lignins Have Similar Inhibitory Effects on Wall Degradability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 2530-2532.
- Grabber, J.H., Ralph, J., Lapierre, C., Barrière, Y., 2004. Genetic and molecular basis of grass cell-wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. *Comptes Rendus Biologies*. 327, 455-465.
- Gravitis, J., Zandersons, J., Vedernikov, N., Kruma, I., Ozols-Kalnins, V., 2004. Clustering of bio-products technologies for zero emissions and eco-efficiency. *Industrial Crops and Products*. 20, 169-180.
- Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. *Water Science & Technology*. 15 127-167
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., Gorwa-Grauslund, M., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74, 937-953.
- Hall, M., Bansal, P., Lee, J.H., Realff, M.J., Bommarius, A.S., 2010. Cellulose crystallinity – a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. *FEBS Journal*. 277, 1571-1582.
- Harper, S.H.T., Lynch, J.M., 1981. The chemical components and decomposition of wheat straw leaves, internodes and nodes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 32, 1057-1062.
- Harris, P., Trethewey, J., 2010. The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochemistry Reviews*. 9, 19-33.
- Hatfield, R.D., Ralph, J., Grabber, J.H., 1999. Cell Wall Structural Foundations: Molecular Basis for Improving Forage Digestibilities. *Crop Science*. 39, 27-37.
- Heiss-Blanquet, S., Zheng, D., Ferreira, N.L., Lapierre, C., Baumberger, S., 2011. Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis of wheat straw on cell wall composition, hydrophobicity and cellulase adsorption. *Bioresource Technology*. 102, 5938-5946.
- Hemery, Y., Chaurand, M., Holopainen, U., Lampi, A.-M., Lehtinen, P., Piironen, V., Sadoudi, A., Rouau, X., 2011. Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding. *Journal of Cereal Science*. 53, 1-8.
- Hemery, Y., Lullien-Pellerin, V., Rouau, X., Abecassis, J., Samson, M.F., Aman, P., von Reding, W., Spoerndli, C., Barron, C., 2009. Biochemical markers: Efficient tools for the assessment of wheat grain tissue proportions in milling fractions. *Journal of Cereal Science*. 49, 55-64.
- Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C., Abecassis, J., 2007. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*. 46, 327-347.
- Hemery, Y.M., Mabilbe, F., Martelli, M.R., Rouau, X., 2010. Influence of water content and negative temperatures on the mechanical properties of wheat bran and its constitutive layers. *Journal of Food Engineering*. 98, 360-369.

- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 100, 10-18.
- Hepworth, D.G., Vincent, J.F.V., 1999. The Growth Response of the Stems of Genetically Modified Tobacco Plants (*Nicotiana tabacum* 'Samsun') to Flexural Stimulation. *Annals of Botany*. 83, 39-43.
- Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Fujimoto, S., Minowa, T., Inoue, S., Endo, T., Sawayama, S., 2009. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology*. 100, 2706-2711.
- Himmel, M., Tucker, M., Baker, J., Rivard, C., Oh, K., Grohmann, K., 1986. Comminution of biomass: hammer and knife mills. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 1986, 39-58.
- Hosseinian, F.S., Mazza, G., 2009. Triticale bran and straw: Potential new sources of phenolic acids, proanthocyanidins, and lignans. *Journal of Functional Foods*. 1, 57-64.
- Hu, J., Arantes, V., Saddler, J., 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels*. 4, 36.
- Hu, Z.-H., Yu, H.-Q., Zhu, R.-F., 2005. Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 55, 233-238.
- Hu, Z.-H., Yu, H.-Q., Zhu, R.-F., 2005. Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 55, 233-238.
- Igathinathane, C., Womac, A.R., Sokhansanj, S., Narayan, S., 2008. Knife grid size reduction to pre-process packed beds of high- and low-moisture switchgrass. *Bioresource Technology*. 99, 2254-2264.
- Igathinathane, C., Womac, A.R., Sokhansanj, S., Narayan, S., 2009. Size reduction of high- and low-moisture corn stalks by linear knife grid system. *Biomass and Bioenergy*. 33, 547-557.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A., 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiology*. 104, 315-320.
- Inoue, H., Yano, S., Endo, T., Sakaki, T., Sawayama, S., 2008. Combining hot-compressed water and ball milling pretreatments to improve the efficiency of the enzymatic hydrolysis of eucalyptus. *Biotechnology for Biofuels*. 1, 2.
- Izumi, K., Okishio, Y.-k., Nagao, N., Niwa, C., Yamamoto, S., Toda, T., 2010. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64, 601-608.
- Jensen, E.S., 1994. Mineralization-immobilization of nitrogen in soil amended with low C:N ratio plant residues with different particle sizes. *Soil Biology and Biochemistry*. 26, 519-521.
- Joseleau, J.P., 1980. Les hémicelluloses. in: B. Monties (Ed.) Les polymères végétaux. Bordas, Paris, pp. 87-121.



- Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J., 1993. Forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy, Inc.
- Kaliyan, N., Schmidt, D.R., Morey, R.V., 2010. Commercial Scale Grinding of Corn Stover And Perennial Grasses ASABE Annual International Meeting. St. Joseph, Pittsburgh, Pennsylvania.
- Kamm, B., Gruber, P.R., Kamm, M., 2006. Biorefineries - industrial processes and products: status quo and future directions. Wiley-VCH.
- Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, 137-145.
- Kaparaju, P., Serrano, M., Thomsen, A.B., Kongjan, P., Angelidaki, I., 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 100, 2562-2568.
- Kawakubo, T., Karita, S., Araki, Y., Watanabe, S., Oyadomari, M., Takada, R., Tanaka, F., Abe, K., Watanabe, T., Honda, Y., Watanabe, T., 2010. Analysis of Exposed Cellulose Surfaces in Pretreated Wood Biomass Using Carbohydrate-Binding Module (CBM)-Cyan Fluorescent Protein (CFP). *Biotechnology and Bioengineering*. 105, 499-508.
- Keshwani, D.R., Cheng, J.J., 2009. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review. *Bioresource Technology*. 100, 1515-1523.
- Kopp, J., Müller, J., Dichtl, N., Schwedes, J., 1997. Anaerobic digestion and dewatering characteristics of mechanically disintegrated excess sludge. *Water Science and Technology*. 36, 129-136.
- Kristensen, J., Thygesen, L., Felby, C., Jorgensen, H., Elder, T., 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels*. 1, 5.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P., 2009. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 48, 3713-3729.
- Kumar, R., Wyman, C.E., 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 100, 4203-4213.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry*. 32, 1485-1498.
- Lapierre, C., 1993. Application of new methods for the investigation of lignin structure. in: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield, J. Ralph (Eds.), Forage cell wall structure and digestibility. American Society of Agronomy, Inc., pp. 133-166.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., 1986. Thioacidolysis of Poplar Lignins: Identification of Monomeric Syringyl Products and Characterization of Guaiacyl-Syringyl Lignin Fractions. *Holzforschung*. 40, 113-118.
- Lapierre, C., Pollet, B., Ralet, M.-C., Saulnier, L., 2001. The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association. *Phytochemistry*. 57, 765-772.

- Lawther, J.M., Sun, R.C., Banks, W.B., 1996. Extraction and comparative characterization of ball-milled lignin (LM), enzyme lignin (LE) and alkali lignin (LA) from wheat straw. *Cellulose Chemistry and Technology*. 30, 395-410.
- Le Digabel, F., Averous, L., 2006. Effects of lignin content on the properties of lignocellulose-based biocomposites. *Carbohydrate Polymers*. 66, 537-545.
- Lequart, C., Ruel, K., Lapierre, C., Pollet, B., Kurek, B., 2000. Abiotic and enzymatic degradation of wheat straw cell wall: a biochemical and ultrastructural investigation. *Journal of Biotechnology*. 80, 249-259.
- Lützow, M.v., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions – a review. *European Journal of Soil Science*. 57, 426-445.
- Malcolm Brown Jr, R., Saxena, I.M., Kudlicka, K., 1996. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science*. 1, 149-156.
- Mandels, M., Reese, E.T., 1964. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric, (Volume 5). *Development in industrial mycology*. 22, 5-20.
- Mani, S., Tabil, L.G., Sokhansanj, S., 2004. Grinding performance and physical properties of wheat and barley straws, corn stover and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*. 27, 339-352.
- Mansfield, S. D., Wong, K. K. Y., De, J., E, Saddler, J. N., 1996. Modification of Douglas-fir mechanical and kraft pulps by enzyme treatment. *TAPPI*. 79.
- Mansfield, S.D., Mooney, C., Saddler, J.N., 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology Progress*. 15, 804-816.
- Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., Monot, F., 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*. 20, 372-380.
- Martelli, M., Brygo, F., Delaporte, P., Rouau, X., Barron, C., 2011. Estimation of Wheat Grain Tissue Cohesion via Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Food Biophysics*. 6, 433-439.
- Mazerolles, G., Boccard, J., Hanafi, M., Rudaz, S., 2011. Analysis of experimental design with multivariate response: A contribution using multiblock techniques. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 106, 65-72.
- McCann, M.C., Carpita, N.C., 2008. Designing the deconstruction of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 314-320.
- McDougall, G.J., Morrison, I.M., Stewart, D., Weyers, J.D.B., Hillman, J.R., 1993. Plant fibres: Botany, chemistry and processing for industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 62, 1-20.
- McMahon, S.K., Williams, M.A., Bottomley, P.J., Myrold, D.D., 2005. Dynamics of Microbial Communities during Decomposition of Carbon-13 Labeled Ryegrass Fractions in Soil. *Soil Science Society of America Journal*. 69, 1238-1247.



- Millett, M.A., Baker, A.J., Satter, L.D., 1976. Physical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 6, 125-153.
- Millett, M.A., Effland, M.J., Caulfield, D.F., 1979. Influence of Fine Grinding on the Hydrolysis of Cellulosic Materials? Acid Vs. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis. American Chemical Society, pp. 71-89.
- Miu, P.I., Womac, A.R., Igathinathane, C., Sokhansanj, S., 2006. Analysis of biomass comminution and separation processes in rotary equipment-a review. *ASAE Annual Meeting*. St. Joseph, Michigan.
- Monties, B., 1980. Les polymères végétaux. Bordas Dunod, Paris.
- Monties, B., 1984. Dosage de la lignine insoluble en milieu acide : influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille. *Agronomie*. 4, 387-392
- Monties, B., 1991. Plant cell walls as fibrous lignocellulosic composites: relations with lignin structure and function. *Animal Feed Science and Technology*. 32, 159-175.
- Mooney, C.A., Mansfield, S.D., Touhy, M.G., Saddler, J.N., 1998. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*. 64, 113-119.
- Moore, W.E., Effland, M.J., Millett, M.A., 1972. Hydrolysis of wood and cellulose with cellulytic enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 20, 1173-1175.
- Morrison, I.M., 1972. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 23, 455-463.
- Mosey, F.E., 1983. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: Regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. *Water Science and Technology*. 15, 209-232.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96, 673-686.
- Mshandete, A., Björnsson, L., Kivaisi, A.K., Rubindamayugi, M.S.T., Mattiasson, B., 2006. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renewable Energy*. 31, 2385-2392.
- Müller, J.A., 2003. Comminution of Organic Material. *Chemical Engineering & Technology*. 26, 207-217.
- Musel, G., Schindler, T., Bergfeld, R., Ruel, K., Jacquet, G., Lapierre, C., Speth, V., Schopfer, P., 1997. Structure and distribution of lignin in primary and secondary cell walls of maize coleoptiles analyzed by chemical and immunological probes. *Planta*. 201, 146-159.

- Naik, S.N., Goud, V.V., Rout, P.K., Dalai, A.K., 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 578-597.
- Navarro, D., Couturier, M., Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Rouau, X., Asther, M., Bignon, C., 2010. Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Microbial Cell Factories*. 9, 58.
- Noike, T., Endo, G., Chang, J.-E., Yaguchi, J.-I., Matsumoto, J.-I., 1985. Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 1482-1489.
- O'Dogherty, M.J., Huber, J.A., Dyson, J., Marshall, C.J., 1995. A Study of the Physical and Mechanical Properties of Wheat Straw. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 62, 133-142.
- Owens, J.M., Chynoweth, D.P., 1993. Biochemical methane potential of municipal solid waste (MSW) components. *Water Science & Technology*. 27, 1-14.
- Palmowski, L.M., Muller, J.A., 2000. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. 41, 155-162.
- Palmowski, L.M., Muller, J.A., 2003. Anaerobic degradation of organic materials - significance of the substrate surface area. *Water Science and Technology*. 47, 231-238.
- Pan, X., Kadla, J.F., Ehara, K., Gilkes, N., Saddler, J.N., 2006. Organosolv Ethanol Lignin from Hybrid Poplar as a Radical Scavenger: Relationship between Lignin Structure, Extraction Conditions, and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 5806-5813.
- Park, S., Baker, J., Himmel, M., Parilla, P., Johnson, D., 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*. 3, 10.
- Partyka, T., Yan, D., 2007. Fine grinding in a horizontal ball mill. *Minerals Engineering*. 20, 320-326.
- Payne, W.J., 1970. Energy Yields and Growth of Heterotrophs. *Annual Review of Microbiology*. 24, 17-52.
- Pommier, S.b., Llamas, A.M.a., Lefebvre, X., 2010. Analysis of the outcome of shredding pretreatment on the anaerobic biodegradability of paper and cardboard materials. *Bioresource Technology*. 101, 463-468.
- Pons, M.-N., Vivier, H., Delcour, V., Authelin, J.-R., Paillères-Hubert, L., 2002. Morphological analysis of pharmaceutical powders. *Powder Technology*. 128, 276-286.
- Pons, M.N., Vivier, H., Belaroui, K., Bernard-Michel, B., Cordier, F., Oulhana, D., Dodds, J.A., 1999. Particle morphology: from visualisation to measurement. *Powder Technology*. 103, 44-57.
- Pye, K., Blott, S.J., 2004. Particle size analysis of sediments, soils and related particulate materials for forensic purposes using laser granulometry. *Forensic Science International*. 144, 19-27.

- Ramos, L., Breuil, C., Saddler, J., 1992. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 34-35, 37-48.
- Ramos, L.P., 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials *Quimica Nova*. 26, 863-871.
- Reese, E.T., Siu, R.G.H., Levinson, H.S., 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*. 59, 485-497.
- Rivers, D.B., Emert, G.H., 1988. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal-solid-waste components. *Biotechnology and Bioengineering*. 31, 278-281.
- Robert, P., Escoufier, Y., 1976. A Unifying Tool for Linear Multivariate Statistical Methods: The RV- Coefficient. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*. 25 257-265.
- Rondeau-Mouro, C., Bouchet, B., Pontoire, B., Robert, P., Mazoyer, J., Buléon, A., 2003. Structural features and potential texturising properties of lemon and maize cellulose microfibrils. *Carbohydrate Polymers*. 53, 241-252.
- Rouau, X., 1996. Les hémicellulases en panification. *Industries des Céréales*. 96, 13-19.
- Rumpf, H., 1973. Physical aspects of comminution and new formulation of a law of comminution. *Powder Technology*. 7, 145-159.
- Saad, M., Sadoudi, A., Rondet, E., Cuq, B., 2011. Morphological characterization of wheat powders, how to characterize the shape of particles? *Journal of Food Engineering*. 102, 293-301.
- Saha, B., 2003. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 30, 279-291.
- Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99, 5270-5295.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.Y., Guittet, E., Rolando, C., 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*. 24, 1359-1362.
- Scholten, R.L., McEllhiney, R.R., 1985. Effects of prebreaking in hammermill particle size reduction. *American Society of Agricultural Engineers*. 85.
- Schöning, I., Kögel-Knabner, I., 2006. Chemical composition of young and old carbon pools throughout Cambisol and Luvisol profiles under forests. *Soil Biology and Biochemistry*. 38, 2411-2424.
- Sharma, S.K., Mishra, I.M., Sharma, M.P., Saini, J.S., 1988. Effect of particle size on biogas generation from biomass residues. *Biomass*. 17, 251-263.
- Sidiras, D.K., Koukios, E.G., 1989. Acid saccharification of ball-milled straw. *Biomass*. 19, 289-306.

- Silva, A.S.A., Inoue, H., Endo, T., Yano, S., Bon, E.P.S., 2010. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 101, 7402-7409.
- Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Dumas, C., Guilbert, S., Rouau, X., 2010. Ultrafine grinding as a step of wheat straw biorefinery. The fourth annual workshop of COST FP0602- Biotechnical processing of lignocellulosic raw materials., Izmir.
- Silva, G.G.D., Rouau, X., Guilbert, S., 2011. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw. *Powder Technology*. 208, 266-270.
- Sims, J.L., Frederick, L.R., 1970. Nitrogen Immobilization and Decomposition of Corn Residue in Soil and Sand As Affected By Residue Particle Size. *Soil Science*. 109, 355-361.
- Sinechal, X., Installe, M., Nyns, E., 1979. Differentiation between acetate and higher volatile acids in the modeling of the anaerobic biomethanation process. *Biotechnology Letters*. 1, 309-314.
- Siqueira, G., Milagres, A., Carvalho, W., Koch, G., Ferraz, A., 2011. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnology for Biofuels*. 4, 7.
- Soucek, J., Hanzlikova, I., Hutla, P., 2003. A fine disintegration of plants suitable for composite biofuels production. *Research in Agricultural Engineering - UZPI*. 49, 7-11.
- Spatz, H.C., Beismann, H., Brückert, F., Emanns, A., Speck, T., 1997. Biomechanics of the giant reed *Arundo donax*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 352, 1-10.
- Sun, R., Lawther, J.M., Banks, W.B., 1997. A tentative chemical structure of wheat straw lignin. *Industrial Crops and Products*. 6, 1-8.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*. 60, 15-26.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *Bioresource Technology*. 83, 1 - 11.
- Suzuki, T., Nakagami, H., 1999. Effect of crystallinity of microcrystalline cellulose on the compactability and dissolution of tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 47, 225-230.
- Tabil, L.G., Adapa, P.K., Kashaninejad, M., 2011. Biomass Feedstock Pre-Processing Part 1: Pre-Treatment,. in: M.A.S. Bernardes (Ed.) *Biofuel's Engineering Process Technology*. InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, pp. 411-438.
- Tabka, M.G., Herpoël-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., Sigoillot, J.C., 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 39, 897-902.

- Taherzadeh, M., Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9, 1621-1651.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2002. Plant physiology, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Tavakoli, H., Mohtasebi, S.S., Jafari, A., 2009. Physical and mechanical properties of wheat straw as influenced by moisture content. *International agrophysics*. 23, 175-181.
- Tavares, L.M., King, R.P., 1998. Single-particle fracture under impact loading. *International Journal of Mineral Processing*. 54, 1-28.
- Temmerman, M., 2011. Energie nécessaire au broyage de la biomasse et des produits densifiés. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 15, 349-360.
- Tinke, A.P., Vanhoutte, K., De Maesschalck, R., Verheyen, S., De Winter, H., 2005. A new approach in the prediction of the dissolution behavior of suspended particles by means of their particle size distribution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 39, 900-907.
- Tinke, A.P., Vanhoutte, K., Vanhoutte, F., De Smet, A., De Winter, H., 2005. Laser diffraction and image analysis as a supportive analytical tool in the pharmaceutical development of immediate release direct compression formulations. *International Journal of Pharmaceutics*. 297, 80-88.
- Tscherning, K., Barrios, E., Lascano, C., Peters, M., Schultze-Kraft, R., 2005. Effects of sample post harvest treatment on aerobic decomposition and anaerobic *in-vitro* digestion of tropical legumes with contrasting quality. *Plant and Soil*. 269, 159-170.
- Van Craeyveld, V., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2008. Ball Milling Improves Extractability and Affects Molecular Properties of Psyllium (*Plantago ovata* Forsk) Seed Husk Arabinoxylan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 11306-11311.
- Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H., Hamelers, B., 2000. Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. *Journal of Environmental Engineering and Science*. 126, 1076-1081.
- Vidal, B.C., Dien, B., Ting, K., Singh, V., 2011. Influence of Feedstock Particle Size on Lignocellulose Conversion—A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164, 1405-1421.
- Vigneault, C., Rothwell, T.M., Bourgeois, G., 1992. Hammermill grinding rate and energy requirements for thin and conventional hammers. *Canadian Agricultural Engineering*. 34. Vol. 34, no. 2, pp. 203-207. 1992 203-207.
- Vincent, J.F., 1999. From cellulose to cell. *Journal of Experimental Biology*. 202, 3263-3268.
- Virtanen, A.I., Koistinen, O.A., Kiuru, V., 1938. The fermentation of native cellulose in wood. *Suomen Kemistilehti*. 11.
- Virtanen, A.I., Nikkila, O.E., 1946. Cellulose fermentation in wood. *Suomen Kemistilehti*. 19, 3-4.



- Wakelin, J.H., Virgin, H.S., Crystal, E., 1959. Development and Comparison of Two X-Ray Methods for Determining the Crystallinity of Cotton Cellulose. *Journal of Applied Physics*. 30, 1654-1662.
- Willm, C., 2009. La mouture du blé. Éditions CEMP.
- Wimmer, R., Lucas, B.N., 1997. Comparing mechanical properties of secondary wall and cell corner middle lamella in spruce wood. *LAWA Journal*. 18.
- Womac, A.R., Igathinathane, C., Bitra, P., Miu, P.I., Yang, T., Sokhansanj, S., Narayan, S., 2007. Biomass Pre-Processing Size Reduction with Instrumented Mills ASAE Annual Meeting American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, Michigan, pp. Paper No. 076046.
- Wong, K.K., Tan, L.U., Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*. 52, 305-317.
- Yu, Y., Fei, B., Zhang, B., Yu, X., 2007. Cell-Wall Mechanical Properties of Bamboo Investigated by In-Situ Imaging Nanoindentation. *Wood and Fiber Science*. 39, 527-535.
- Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A., Schroth, G., 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*. 79, 117-161.
- Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 88, 797-824.
- Zhao, X., Cheng, K., Liu, D., 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82, 815-827.
- Zhu, J.Y., Wang, G.S., Pan, X.J., Gleisner, R., 2009. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*. 64, 474-485.





## Annexe 1 L'analyse de co-inertie multiple - MCoA

L'analyse de co-inertie multiple est une méthode d'ordination des tableaux de données, basée sur le calcul d'une matrice de covariance. Cette analyse recherche des axes de co-inertie (qui représentent les tendances communes) qui maximisent la covariance des coordonnées des projections. L'ensemble des principes/concepts décrits ci-dessus sont basés sur les travaux de (Culhane et al., 2003; Dolédec & Chessel, 1994; Mazerolles et al., 2011). Cette analyse considère un ensemble de nuages de données (tableaux) ayant le même nombre de lignes (individus, échantillons) mais un nombre différent de variables. Cette analyse est basée sur la maximisation de la covariance. Cela apporte un grand intérêt lors du traitement des données où l'intensité de la variable est importante, en contraste avec l'analyse canonique des corrélations où toutes les données prennent une pondération similaire. De plus, pour l'analyse canonique le nombre d'individus doit être élevé. Un exemple d'utilisation de la MCoA est le traitement multi spectral (l'information des pics est plus importante que celles apportée par le bruit).

L'analyse de co-inertie multiple produit des composantes communes entre les composantes issues des analyses en composantes principales de chaque tableau. Les composantes communes sont déterminées de façon à maximiser leur covariance et de représenter ainsi la tendance commune la plus importante entre les ensemble des données (co-structuration des données-tableaux). Les autres composantes sont sélectionnées pour être covariant au maximum mais aussi, orthogonales, et ainsi de suite pour la détermination des autres axes restantes.

Les principes mathématiques de cette analyse multitableaux sont décrits par Chessel and Hanafi (1996) qui ont étendu l'analyse à plusieurs tableaux. L'analyse de deux tableaux avait été décrite par Dolédec & Chessel (1994). La Fig. 60 illustre les étapes et principes de la MCoA.

Par cette analyse il est possible déterminer: i) les tendances communes entre les tableaux (co-structuration), ii) comprendre quel est l'apport de chaque tableaux en termes d'information lors de la construction des composantes communes de la MCoA pour enfin iii) comparer les individus de façon globale en considérant les caractéristiques/comportements de chaque individu dans tous les tableaux.

### **i) Analyse de la structuration/co-inertie entre les différents nuages de points (entre les tableaux)**

La similarité entre les tableaux peut être évaluée de deux façons : 1) par l'analyse de la corrélation ( $Cor^2$ ) des scores (les nouvelles coordonnées des variables dans les nouvelles composantes/axes) des variables dans chacune des composantes; ou par 2) l'analyse de la

similarité globale qui considère toutes les dimensions (axes) par une extension multivariée du coefficient de corrélation de Pearson appelé coefficient RV (Robert & Escoufier, 1976). Le RV est calculé par la co-inertie totale (somme des Eigenvalues de l'analyse de la co-inertie) divisée par la racine carré du produit des carrés des inerties (l'inertie est l'apport de la variance). Le RV varie entre 0 et 1 où les valeurs les plus proches d'un indiquent un degré élevé de co-structure.

## **ii) Analyse de l'apport d'information aux composantes de la MCoA entre les différents nuages de points (tableaux) - Compréhension des axes de l'analyse MCoA**

Globalement, on évalue la distribution de l'inertie globale (de tous les tableaux) entre les différentes composantes par le pourcentage d'inertie apporté par chaque composante commune de la MCoA (par ex. la composante 1 représente 45% de l'inertie). Cela indique combien de composantes doivent être analysés pour la représentation de l'ensemble des données analysés. On considère acceptable quand la somme des inerties des composantes choisies sont au tour de 75%.

La quantité d'information de chaque tableau à la composante commune peut être évaluée par une analyse de la covariance ( $Cov^2$ ). La  $Cov^2$  analyse la covariance entre la variable latente du tableau et celle du compromis pour une composante commune donnée. Les tableaux ayant les valeurs les plus hautes de  $Cov^2$  sont les plus représentés par la composante commune en question.

## **iii) Analyse comparative entre les individus (différents échantillons)**

Finalement, la comparaison des échantillons peut être réalisée par leurs dispositions dans le graphique du compromis (*similarity map*). Dans ce graphique les individus sont placés selon leur score (coordonnés dans les composantes communes) ainsi la similarité des échantillons est vérifiée par leur rapprochement.

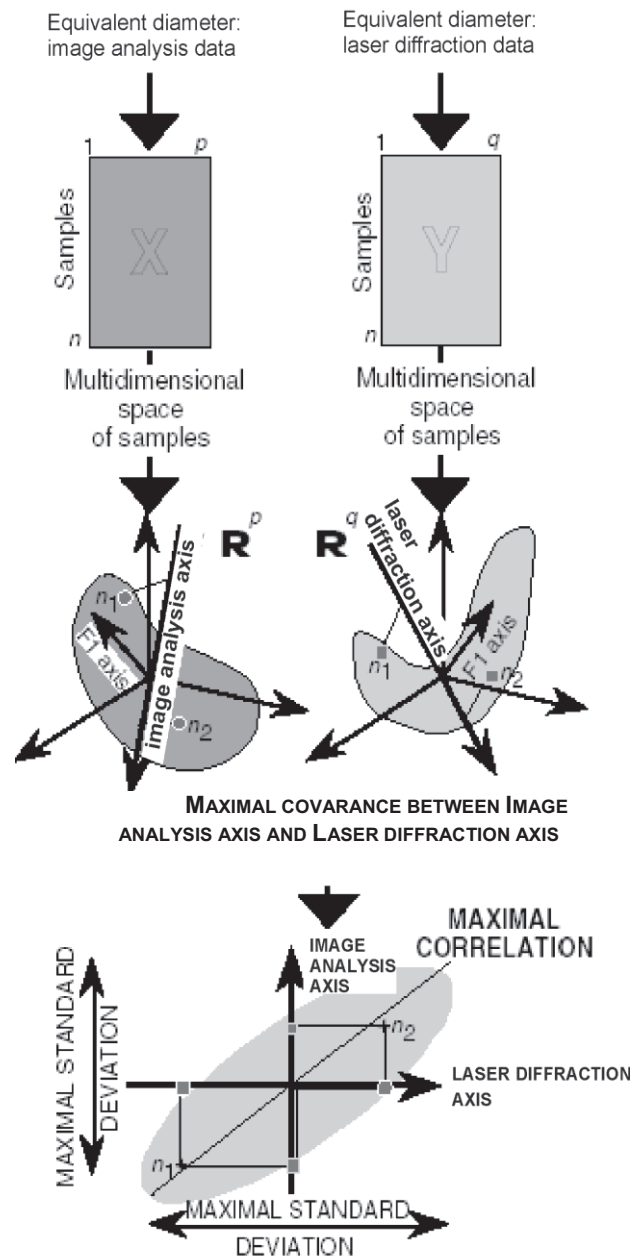


Fig. 60 Schéma des principes de l'analyse de co-inertie multiple (Dolédéc & Chessel, 1994). Les tableaux illustrés sont les mêmes utilisés pour la première MCoA de l'article 1-Chapitre IV.

# Communications issues de cette these

## Articles scientifiques

Silva, G.G.D., Couturier, M., Berrin, J.-G., Buléon, A., Rouau, X. Effects of grinding processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology*. 103, 192-200. 2012.

Silva, G.G.D., Rouau, X., Guilbert, S. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw. *Powder Technology*. 208, 266-270. 2011.

Silva, G.G.D., Barron, C., Sadoudi, A., Rouau, X. Morphological modulation of heterogeneous biomass powders by dry grinding. *en préparation*.

Silva, G.G.D., Dumas, C., Recous, S., Rouau, X. Bioconversion of ultra-finely ground wheat straw: anaerobic degradation and decomposition in soil. *en préparation*.

Navarro, D., Couturier, M., Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Rouau, X., Asther, M., Bignon, C. Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Microbial Cell Factories*. 9, 58. 2010.

Montano, B., Silva, G.G.D., Gontard, N., Angellier-Coussy, H. Wheat gluten/wheat straw composite materials: effect of milling process and filler content on mechanical properties. *en préparation*.

## Communications orales

Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Dumas, C., Rouau, X., 2011. Prétraitement pour la biodégradation de la biomasse ligno-cellulosique par fractionnement voie sèche. *Journée de l'Ecole Doctorale Sciences des Procédés et Science des Aliments*, Montpellier. 10 Juin 2011.

Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Dumas, C., Guilbert, S., Rouau, X. Ultrafine grinding as a step of wheat straw biorefinery. *The fourth annual workshop of COST FP0602- Biotechnical processing of lignocellulosic raw materials*, Izmir. 22-24 Septembre 2010.

Silva, G.G.D., Sadoudi, A., Rouau, X.. Successive centrifugal grinding and sieving of wheat straw. *Colloque science et technologie des poudres & matériaux frittés*, Montpellier. 27-29 Mars 2009.

Silva, G.G.D., Rouau, X. Dry fractionation of agricultural biomass : particle size reduction and macromolecular compositions of wheat straw. *Colloque RDR1/Chimie pour le développement durable & AMV*, Isle sur la Sorgue. 26-29 Janvier 2009.

Dumas, C., Silva, G.G.D., Rouau, X., Carrère, H., Steyer, J.-P. Wheat straw milling effect on biogas production. *12th world congress on anaerobic digestion*, Guadalajara, Mexico. 2010.

## Posters

Silva, G.G.D., Rouau, X. Fractionnement par voie sèche des composés lignocellulosiques issus de la biomasse agricole. *Journée de l'Ecole Doctorale Sciences des Procédés et Science des Aliments*, Montpellier. 18 Juin 2010.

Silva, G.G.D., Couturier, M., Berrin, J.-G., Duri, A., Sadoudi, A., Guilbert, S., Rouau, X. Grinding wheat straw and effect of particle size on enzymatic saccharification yields. *Lignobiotech One*, Reims. 28 Mars-1 Avril 2010.

Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Guilbert, S., Rouau, X. Dry fractionation of agricultural biomass. *Cross Border Doctoriales*, Pollensa, Majorque. 18-14 Octobre 2009

Silva, G.G.D., Rouau, X. Dry fractionation of lignocellulosic material from agricultural biomass: particle size reduction and macromolecular compositions of wheat straw. *Les biopolymères végétaux : quels potentiels pour la chimie ?*, La Baule. 05 Décembre 2008.

Dumas, C., Silva, G.G.D., Rouau, X., Carrère, H., Steyer, J.-P. Wheat straw milling effect on biogas production. *Lignobiotech One*, Reims. 28 Mars-1 Avril 2010.

Navarro, D., Couturier, M., Silva, G.G.D., Berrin, J.-G., Rouau, X., Bignon, C., 2010. Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Lignobiotech One*, Reims. 28 Mars-1 Avril 2010.



# Abstract

---

## **Dry fractionation of lignocellulosic biomass: advanced grinding wheat straw and effects on its bioconversions**

In a context of plant biorefinery for the production of molecules and energy, pretreatments are necessary to increase the reactivity of the lignocellulosic biomass. This thesis is part of a general project aiming to establish the bases for a dry plant refinery. This study aimed to develop and understand advanced mechanical fractionation of wheat straw down to sub-millimeter sizes and to assess its effects on bioconversion processes for bioenergy. Wheat straw exhibited a high heterogeneity at several scale levels (from cm to  $\mu\text{m}$ ). A multistep diagram of dry grinding at pilot-scale ( $> 1$  kg) produced a wide range of particle sizes by three distinct mode of action: i) sieve-based grinding producing particle sizes from coarse (800  $\mu\text{m}$ ) to fine (50  $\mu\text{m}$ ), ii) air-jet milling (ultra-fine,  $\sim 20$   $\mu\text{m}$ ) and iii) ball milling (ultra-fine,  $\sim 10$   $\mu\text{m}$ ). A morphological analysis of particles was developed by image analysis from light microscopy. Subjecting wheat straw to the complex breaking mechanisms during grinding produced particles highly variable in shapes and compositions. A multiple co-inertia analysis allowed the evaluation of the overall particle morphologies. Generally, grinding reduced the size and shape descriptors of particles, with some exceptions due to equipment configurations. The enzymatic degradability (saccharification) of produced powders was improved by reducing their particle size. Until  $\sim 100$   $\mu\text{m}$  the polysaccharides solubilisation was increased and then stabilised at 36% total polysaccharides and 40% cellulose. Only samples from ball milling overcome this limit and attained hydrolysis yields of 46% total polysaccharides and 72% cellulose. This is due to an increase in enzymatic efficiency by the reduction of cellulose crystallinity (from 22 to 13%). These results of ball milling are comparable to those of steam explosion process, with a better preservation of hemicelluloses. This improved enzymatic efficiency resulted in faster and slightly more extensive (ball milling case) anaerobic degradations (biogas). Aerobic decomposition in the soil was improved by coarse grinding, but finer grinding did not result in a further increase. The characteristics of ground straw varied depending on grinding intensity and mode. Although all grindings could reduce the size, sieve-based grinding and air-jet milling did not allow changes in the fine structure of cell wall polymers. Only ball milling led to change the internal structure of particles especially reducing cellulose crystallinity and partially solubilising hemicelluloses. These results demonstrate that advanced mechanical fragmentation by dry processes is a possible alternative for pretreatments in a plant refinery.

**Keywords:** biorefinery, grinding, ball milling, jet milling, biomass powder, particle morphology, saccharification, biogas production, decomposition in soil

---



# Résumé

---

## **Fractionnement par voie sèche de la biomasse ligno-cellulosique : broyage poussé de la paille de blé et effets sur ses bioconversions**

Dans le contexte de la bioraffinerie végétale pour la production de molécules et d'énergie, des prétraitements sont nécessaires pour augmenter la réactivité de la biomasse ligno-cellulosique. Cette thèse s'insère dans une thématique dont l'objectif général est d'établir les bases d'une raffinerie du végétal par des procédés en voie sèche. Cette étude a pour objectif de développer et comprendre le fractionnement mécanique poussé de la paille de blé jusqu'à des tailles submillimétriques et d'évaluer les effets sur des procédés de bioconversions énergétiques. La paille de blé présente une grande hétérogénéité à plusieurs niveaux d'échelle (du cm au  $\mu\text{m}$ ). Un diagramme de broyage multi-étapes à l'échelle pilote ( $>1\text{kg}$ ) a permis d'obtenir une large gamme de tailles de particules, par 3 modes de sollicitation distincts: i) broyages à grille sélective produisant des tailles du grossier ( $800\ \mu\text{m}$ ) au fin ( $50\ \mu\text{m}$ ), ii) broyage à jet d'air (ultrafin,  $\sim 20\ \mu\text{m}$ ) et iii) broyage à boulets (ultrafin,  $\sim 10\ \mu\text{m}$ ). Une méthodologie d'analyse morphologique des particules a été développée par analyse d'images de microscopie optique. La paille soumise aux mécanismes complexes de rupture lors des broyages produit une forte variabilité de formes et de compositions des particules. L'analyse multiple de co-inertie a permis d'évaluer de façon globale les morphologies des particules. Globalement, le broyage diminue la taille et les facteurs de forme des particules, avec quelques exceptions dues aux configurations matérielles. La dégradabilité enzymatique (saccharification) des poudres produites a été améliorée par la réduction de la taille des particules. Jusqu'à  $\sim 100\ \mu\text{m}$  la solubilisation des polysaccharides augmente puis se stabilise à 36 % des polysaccharides totaux et 40 % de la cellulose. Seuls les échantillons issus du broyage à boulets dépassent cette limite et atteignent 46 % d'hydrolyse des polysaccharides totaux et 72 % de la cellulose. Ceci est lié à une augmentation de l'efficacité enzymatique due à la diminution de la cristallinité de la cellulose (de 22 à 13%). Ces résultats du broyage à boulets sont comparables à ceux de l'explosion à la vapeur, avec une meilleure préservation des hémicelluloses. Cette amélioration d'efficacité enzymatique s'est traduite par des dégradations anaérobies (biogaz) accélérées et légèrement augmentées (cas du broyeur à boulets). La décomposition aérobie dans le sol a été améliorée par le broyage grossier, mais les broyages plus fins n'ont pas entraîné de gain. Les caractéristiques de la paille broyée peuvent varier selon l'intensité et le mode de broyage. Bien que tous les broyages permettent la réduction de la taille, le broyage à grilles et le broyage à jet d'air n'engendrent pas de changements dans la structure fine des polymères pariétaux. Seul le broyage à boulets a engendré des changements de la structure interne des particules notamment en réduisant la cristallinité de la cellulose et en solubilisant partiellement les hémicelluloses. Ces résultats permettent de mettre en évidence que la fragmentation mécanique poussée par voie sèche est une alternative possible aux prétraitements utilisés en raffinerie végétale.

**Mots-clés** : bioraffinerie, broyage, broyage à boulets, jet d'air, poudre végétale, morphologie des particules, saccharification, méthanisation, décomposition dans le sol

---