

Université catholique de Louvain

Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale

Composition chimique et valorisation énergétique des biomasses végétales

Bruno GODIN

Essai présenté en vue de l'obtention du grade de docteur
en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs :

Prof. Patrick GERIN

Dr Jérôme DELCARTE

2013

Résumé

Composition chimique et valorisation énergétique des biomasses végétales

Notre recherche s'inscrit dans le contexte de la production de biomasses végétales riches en cellulose et en hémicelluloses, comme source d'énergie renouvelable. La sélection des espèces végétales adaptées aux conversions énergétiques requiert une bonne connaissance de leur composition chimique et de leurs aptitudes à être transformées en biométhane ou en bioéthanol par fermentation, ou à être utilisées comme combustible solide.

Nous avons développé une méthode d'analyse pour le dosage de la cellulose et des hémicelluloses appropriée au domaine de la conversion énergétique des biomasses végétales. Elle se base sur une extraction au détergent neutre des constituants interférant de la biomasse (Neutral Detergent Extraction), sur l'hydrolyse acide (Sulfuric Acid Hydrolysis) de la cellulose et des hémicelluloses, et sur l'analyse par une technique versatile (Liquid Chromatography - Charged Aerosol Detector) des monosaccharides libérés. Nous avons montré que cette méthode (NDE-SAH-LC-CAD) permet de quantifier la cellulose, les hémicelluloses et la composition des hémicelluloses avec un degré élevé d'exactitude. En analysant de nombreuses biomasses, nous avons découvert que la diversité de leur composition chimique peut se structurer en groupes de biomasses présentant non seulement des propriétés et des teneurs en fibres similaires, mais aussi des origines phylogénétiques communes. Pour réduire les coûts analytiques, notre approche a permis de sélectionner trois paramètres couramment analysés (teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en substances minérales) comme suffisants pour prédire les aptitudes des biomasses aux différentes conversions énergétiques. Finalement, il apparaît que la productivité brute d'énergie par hectare dépend prioritairement de la productivité en matière sèche des cultures, bien plus que de l'évolution de leur composition chimique en cours de croissance.

Abstract

Chemical composition and biofuel potential of plant biomasses

Our research comes within the scope of plant biomasses production as a source of cellulose and hemicelluloses to be used to produce biofuel. The selection of the most suitable plant species to be converted into biofuel requires a good knowledge of their chemical composition and their suitability to be converted into biomethane or into bioethanol by fermentation, or to be used as solid fuel.

We have developed an analytical method to quantify cellulose and hemicelluloses. This method is appropriate for the field of plant biomasses conversion into biofuel. It is based on a neutral detergent extraction which extracts interfering components of the biomass (Neutral Detergent Extraction), on an acid hydrolysis (Sulfuric Acid Hydrolysis) of cellulose and hemicelluloses and an analysis by a versatile technique (Liquid Chromatography - Charged Aerosol Detector) of the released monosaccharides. We have shown that this method (NDE-SAH-LC-CAD) quantifies cellulose, hemicelluloses and the composition of hemicelluloses with a high degree of accuracy. By the analyses of many biomasses, we found that the diversity of their chemical composition can be structured in groups of biomasses not only presenting similar properties and fiber contents, but also presenting common phylogenetic origins. To reduce the analytical costs, our approach has allowed us to select three commonly analyzed parameters (contents of cellulose, hemicelluloses and mineral compounds) as sufficient to predict the suitabilities of the different biomass to be converted into biofuel. Finally, it appears that productivity of gross energy per hectare depends primarily on the dry matter productivity of crops, rather than the evolution of their chemical composition during their growth.

Remerciements

Je tiens tout d’abord à adresser ma sincère gratitude à mes promoteurs, Patrick Gerin et Jérôme Delcarte, et à mon comité d’accompagnement, Marc Meurens et Pierre Van Cutsem, qui m’ont guidé tout au long de ce travail par leurs conseils judicieux, leurs disponibilités, leurs soutiens et leurs discussions enrichissantes.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Richard Agneessens pour m’avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses remarques avisées et sa disponibilité.

Je tiens également à adresser de vifs remerciements à Anja Janssen, Annick Samyn, Aurélie Vannerom, Bertrand Tasiaux, Didier Stilmant, François Ghysel, Georges Sinnaeve, Jean-Pierre Destain, Jean-Pierre Goffart, Marie Barthélémy, Nathaël Leclech, Patrick Méeus, Philippe Delfosse, Pierre Dardenne, Roger Piscaglia, Sébastien Gofflot, Stéphane Lamaudière, Thomas Schmit, Viviane Planchon, Yves Schenkel, au projet loi Moerman BIOETHA2 du CRA-W et au projet européen INTERREG IV-A ENERBIOM qui m’ont aidé à mener à bien ce travail.

Je remercie aussi tous ceux qui ont contribué aux analyses effectuées lors de cette thèse : Adèle Bridoux, Claudine Clément, Denis Mahin, Jean Herman, Jean-Michel Vaes, Jonathan Draux, Laurence Rossion, Patricia Destrée, Pol Dricot, Téodoro Trucios et Xavier Seffer.

Un grand merci aux équipes du CRA-W et, plus particulièrement celles des bâtiments Francini et Haute-Belgique, pour l’accueil, le travail et l’ambiance conviviale qu’elles entretiennent jour après jour.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui m’ont soutenu, supporté et qui ont contribué à enrichir cette grande expérience et celle de ma vie : ma famille, Aurélie, mes amis et ceux que j’ai oublié...

Table des matières

Introduction générale.....	1
Objectifs et démarche.....	7
Partie 1 : Synthèse bibliographique sur la composition chimique et la valorisation énergétique des biomasses végétales	
• <i>Chapitre 1 : Biomasses végétales à vocation énergétique.....</i>	<i>13</i>
• <i>Chapitre 2 : Hydrates de carbone et parois cellulaires des biomasses végétales.....</i>	<i>61</i>
• <i>Chapitre 3 : Méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses végétales.....</i>	<i>91</i>
• <i>Chapitre 4 : Hydrolyse acide analytique de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses végétales et dosage des monosaccharides libérés par LC-CAD.....</i>	<i>129</i>
Partie 2 : Dosage de la cellulose et des hémicelluloses	
• <i>Chapitre 5 : Dosage de la cellulose et des hémicelluloses par la méthode NDE-SAH-LC-CAD</i>	<i>153</i>
• <i>Chapitre 6 : Comparaison du dosage de la cellulose et des hémicelluloses entre la méthode NDE-SAH-LC-CAD et la méthode de Van Soest.....</i>	<i>191</i>
Partie 3 : Valorisation énergétique des constituants pariétaux des biomasses végétales	
• <i>Chapitre 7 : Composition chimique et potentiel énergétique de biomasses végétales cultivées dans diverses conditions</i>	<i>217</i>
• <i>Chapitre 8 : Influence de la maturité sur la composition chimique et le potentiel énergétique de biomasses végétales.....</i>	<i>253</i>
• <i>Chapitre 9 : Composition chimique et potentiel énergétique d'une grande diversité de biomasses végétales</i>	<i>283</i>
Discussion générale.....	325
Conclusions et perspectives.....	393

Abréviations

Ac : Acétyle

Ace : Acide acétique

ADF : Fibres insolubles au détergent acide

ADL : Lignine insoluble en milieu acide

AM : Riche en amidon

AOAC : Association of Official Analytical Chemists

Api : Apiose

Ara : Arabinose

asl : Au-dessus du niveau de la mer

AUT : Automne

AXyG : Arabinoxylglucane

CAD : Détecteur d'aérosol chargé

CDTA : N,N,N',N'-tétraacétate cyclohexanediamine

Cel : Cellulose

CO : Commélinoides

CO-AM : Biomasses commélinoides riches en amidon

CO-FI : Biomasses commélinoides fibreuses

CO-MF : Biomasses commélinoides moins fibreuses

COM : Biomasses commélinoides

Dha : Acide 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosonique

DM : Matière sèche

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DP : Degré de polymérisation

ELSD : Détecteur de diffusion de la lumière après évaporation

EtOH : Ethanol

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

fgXyG : Fucoxyglucane

FI : Fibreux

Fru : Fructose

Fuc : Fucose

GAX : Glucuronoarabinoxylane

Abréviations

Gal	: Galactose
GalA	: Acide galacturonique
GC	: Chromatographie gazeuse
Glc	: Glucose
GlcA	: Acide glucuronique
GY	: Gymnospermes
GY-FI	: Biomasses gymnospermes fibreuses
HC	: Cycle de récolte annuel
Hem	: Hémicelluloses
HPAEC	: Chromatographie liquide à échange d'anions à haute performance
HHV	: Pouvoir calorifique supérieur
Kdo	: Acide 3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonique
LC	: Chromatographie liquide à haute performance
LI	: Ligneux
LOD	: Limite de détection
LW	: Fin d'hiver
Man	: Mannose
MOD	: Matière organique digestible
MODe	: Matière organique digestible enzymatiquement
MF	: Moins fibreux
MH	: Matière humide
MS	: Matière sèche
NC	: Non-commélinoides
NC-FI	: Biomasses angiospermes non-commélinoides fibreuses
NC-LI	: Biomasses angiospermes non-commélinoides ligneuses
NC-MF	: Biomasses angiospermes non-commélinoides moins fibreuses
NC-SU	: Biomasses angiospermes non-commélinoides riche en sucres solubles
NCO	: Biomasses angiospermes non-commélinoides
NDE	: Extraction au détergent neutre de Van Soest
NDF	: Fibres insolubles au détergent neutre
NREL	: National Renewable Energy Laboratory
PAD	: Détecteur ampérométrique pulsé
PC	: Composante principale
PCI	: Pouvoir calorifique inférieur

Abréviations

PCS : Pouvoir calorifique supérieur
Rha : Rhamnose
RI : Détecteur à indice de réfraction
RMSE : Erreur quadratique moyenne
RPD: Rapport entre le RMSE de prédiction et le SD de la variable dépendante
RS1 : Amidon résistant de type 1
RS2 : Amidon résistant de type 2
RS3 : Amidon résistant de type 3
RSD: Ecart-type relatif
RSDi : RSD de précision intermédiaire
RSDr : RSD de répétabilité
SAH : Hydrolyse à l'acide sulfurique de la cellulose et des hémicelluloses
SD : Ecart-type
SDi : SD de précision intermédiaire
SDr : SD de répétabilité
SDC : Déoxycholate de sodium
SDS : Dodécyl sulphate de sodium
SU : Riche en sucres solubles
UV : Détecteur ultraviolet
VS: Van Soest
XyG : Xyloglucanes
Xyl : Xylose
WM : Matière humide

Définitions

Angiosperme : Plante vasculaire qui fait partie des plantes à graines (spermatophytes). Les angiospermes possèdent un ovaire enveloppant les ovules (pour permettre le développement d'un fruit), des organes reproducteurs condensés en une fleur et de l'albumen issu de la double fécondation de l'ovule. Sur base de la nature des constituants structuraux de la paroi végétale, les angiospermes sont divisés en deux catégories : commélinoides et non-commélinoides (Carpita et al., 2000 ; Campbell, 2004).

Angiosperme commélinoïde : Catégorie de plantes angiospermes qui est caractérisée par une paroi végétale constituée de polysaccharides hémicellulosiques riches en glucuronoarabinoxylane, riche en acide férulique et en acide p-coumarique liant la lignine aux hémicelluloses et aux pectines, et d'une paroi primaire pauvre en substances pectiques. Dans cette catégorie des angiospermes, les ordres suivants sont présents : Arécales, Commélinales, Cypéales, Poales et Zingibérales (Carpita et al., 2000).

Angiosperme non-commélinoïde : Catégorie de plantes angiospermes qui est caractérisée par une paroi végétale constituée de polysaccharides hémicellulosiques riches en xyloglucane, pauvre en acide férulique et en acide p-coumarique liant la lignine aux hémicelluloses et aux pectines, et d'une paroi primaire riche en substances pectiques. Cette catégorie contient tous les ordres des angiospermes à l'exception de ceux faisant parties des angiospermes commélinoides, à savoir : Arécales, Commélinales, Cypéales, Poales et Zingibérales (Carpita et al., 2000).

Arabinane : Polysaccharide constitué d'unités de L-arabinose. Ce terme est utilisé pour exprimer le contenu en L-arabinose des hémicelluloses et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités de L-arabinose s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de L-arabinose, et non en L-arabinose).

Biomasse : Désigne la matière organique d'origine biologique et non fossilisée issue de végétaux, d'animaux et de microorganismes.

Biomasse fibreuse : Biomasses végétales qui sont principalement constituées de fibres (cellulose, hémicelluloses et lignine) ; c'est-à-dire que la somme de la teneur en cellulose, en hémicelluloses et en lignine représente la plus grande partie des constituants de ces biomasses.

Biométhanisation : Procédé permettant de produire du biogaz à partir de la matière organique. Cette transformation est réalisée par l'action de plusieurs groupes de bactéries et d'archéobactéries en absence d'oxygène sur de la biomasse généralement humide (Braun, 2007). Cette digestion anaérobie est réalisée en régime mésophile (37°C) ou en régime thermophile (55°C) dans des conteneurs, silos ou fosses hermétiques appelés digesteurs (Braun, 2007). Quatre étapes se succèdent lors de la biométhanisation (Braun, 2007) :

- La transformation de la matière complexe (polymère) en molécules plus simples (monomères issus des polymères) par les bactéries ;
- La transformation de ces molécules simples en acides organiques, CO₂, hydrogène et alcools, par les bactéries acidogènes ;
- La transformation des acides organiques, CO₂, hydrogène et alcools en acide acétique par les bactéries acétogènes ;
- La production, par les bactéries méthanogènes, de méthane et de CO₂ à partir des molécules d'acide acétique (70% de la production de méthane) ou de méthane par réduction du CO₂ grâce l'hydrogène (30% de la production de méthane).

Le biogaz produit au final est un mélange de méthane (50% à 80% ; le combustible), de CO₂ (20% à 50 %) et de sulfure d'hydrogène (0,0% à 0,5%) (Braun, 2007).

Cellulose : Polysaccharide linéaire qui est uniquement constitué d'unités D-glucose. La cellulose est sous forme de microfibrilles paracrystallines contenant plusieurs milliers de chaînes linéaires constituées de plusieurs milliers de résidus β-D-glucopyranosyles. Ces résidus sont connectés entre eux par des liaisons β-(1-4). Toutes ces chaînes sont disposées parallèlement dans une microfibrille. Elles sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes (Carpita et al., 2000 ; Vermerris, 2008).

Les chaînes de cellulose cristalline des biomasses végétales sont de type I β . Elles se trouvent sous forme monoclinique (Zugenmaier, 2008).

Notons que la teneur en cellulose déterminée par la méthode NDE-SAH-LC-CAD correspond au glucane cellulosique. Ce terme correspond au contenu en D-glucose de la cellulose et il tient compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités de D-glucose s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de D-glucose, et non en D-glucose).

Chromatographie liquide à haute performance (LC) : Procédé dynamique à haute pression mettant en jeu essentiellement deux phases : une dite phase stationnaire et l'autre dite phase mobile liquide. Elles permettent la séparation sélective d'un mélange en ses divers composés qui se comportent différemment par rapport à un (ou plusieurs) phénomènes(s) physico-chimique(s) donné(s).

Combustion : Procédé d'oxydation thermique totale de la biomasse à très haute température en présence d'une quantité d'oxygène en excès et contrôlée (Demirbas, 2009).

Détecteur d'aérosol chargé (CAD) : Détecteur nébulisant tout d'abord à température ambiante l'éluant venant d'une colonne LC avec de l'azote. Durant cette étape, le solvant forme des gouttelettes qui s'évaporent et produisent ainsi des particules d'aérosol. En parallèle, un second flux d'azote se charge positivement en traversant un fil de platine corona sous haute tension. Cette charge est transférée aux particules sèches d'analytes non volatils. La charge de ces particules est ensuite transférée à un collecteur de charge où la charge est mesurée par un électromètre à haute sensibilité (Figure 1) (Gamache et al., 2005 ; ESA Biosciences, 2011).

Extraction au détergent neutre de Van Soest (NDE) : Extraction des constituants non-lignocellulosiques (comme les hydrates de carbone non structuraux, les pectines, les gommes, les mucilages, les lipides, les protéines solubles au détergent neutre et certaines substances minérales) par une solution de détergent neutre de Van Soest. Cette extraction est réalisée par cette solution, en excès, agissant sur l'échantillon pendant 1 h à 100°C avec un pH de $7 \pm 0,05$. Cette solution de détergent neutre est composée de Na_2HPO_4 , de tétraborate de sodium, de 2-éthoxyéthanol (qui extrait l'amidon), d'EDTA de sodium (qui facilitent l'extraction des pectines), de lauryle sulfate de sodium (qui extrait les protéines et les lipides) et de sulfite de sodium (qui hydrolyse les protéines) (Van Soest et al., 1991 ; Mertens, 2002).

Fermentation alcoolique : Procédé de conversion par des microorganismes qui permet la production d'alcools (bioéthanol et/ou biobutanol) par fermentation anaérobie des monosaccharides.. L'objectif poursuivi est soit de générer uniquement de l'éthanol (fermentation éthanolique) produit principalement par *Saccharomyces cerevisiae* (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007), soit de générer un mélange d'acétone, de butanol et d'éthanol (fermentation ABE) produit principalement par *Clostridium acetobutylicum* (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Les fermentations alcooliques peuvent se réaliser directement à partir de substrats contenant du glucose, du fructose et du saccharose libre (comme par exemple les betteraves et les cannes à sucre) (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Elles peuvent également s'effectuer à partir de l'amidon (comme avec les grains de maïs et de froment) ou des fructanes (comme avec les agaves). Pour ce faire, une hydrolyse transformant ces polysaccharides en monosaccharides est réalisée préalablement à la fermentation. Cette hydrolyse est généralement accomplie, par des amylases pour l'amidon et des fructanases pour les fructanes (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Il est également possible de procéder à ces fermentations à partir de la cellulose et des hémicelluloses (comme par exemple avec le bois et les cultures fibreuses) si les étapes suivantes sont successivement réalisées (Kamm et al., 2004 ; Hamelinck et al., 2005 ; Kamm et al., 2007) :

- Prétraitement (chimique, thermique et/ou mécanique) appliqué à la biomasse afin de libérer ces deux polysaccharides de la lignine qui les imprègne ;

- Détoxification et neutralisation des inhibiteurs d'hydrolyse et de fermentation. Ces inhibiteurs sont les acides organiques, le furfural, l'hydroxyméthylfurfural et les polyphénols ;
- Hydrolyse de la cellulose et des hémicelluloses en monosaccharides généralement accomplie par, respectivement, des cellulases et des hémicellulases.

L'alcool produit doit ensuite être concentré et purifié avant d'être utilisé pur ou mélangé à un autre combustible liquide. La distillation est généralement le procédé utilisé afin de concentrer l'éthanol (Galbe et al., 2007).

Galactane : Polysaccharide constitué d'unités de D-galactose. Ce terme est utilisé pour exprimer le contenu en D-galactose des hémicelluloses et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités de D-galactose s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de D-galactose, et non en D-galactose).

Galacturonane : Polysaccharide constitué d'unités d'acide D-galacturonique. Ce terme est utilisé pour exprimer le contenu en acide D-galacturonique des pectines et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités d'acide D-galacturonique s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère d'acide D-galacturonique, et non en d'acide D-galacturonique).

Gazéification : Procédé de décomposition thermique de la biomasse à 800°C en présence d'une quantité d'oxygène limitée et contrôlée. Ce procédé génère un gaz principalement constitué de monoxyde de carbone et d'hydrogène. Ce gaz est purifié et filtré afin d'en éliminer les goudrons, les alcalins, le soufre et le CO₂ (Demirbas, 2009).

Glucane hémicellulosique : Polysaccharide constitué d'unités de D-glucose. Ce terme est utilisé pour exprimer le contenu en D-glucose des hémicelluloses et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités de D-glucose s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de D-glucose, et non en D-glucose).

Glucuronane : Polysaccharide constitué d'unités d'acide D-glucuronique. Ce terme est utilisé pour exprimer le contenu en acide D-glucuronique dans les hémicelluloses. Il peut également se retrouver dans d'autres polysaccharides comme les pectines, les gommes et les mucilages. Ce terme permet également de tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités d'acide D-glucuronique s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère d'acide D-glucuronique, et non en d'acide D-glucuronique).

Gymnosperme : Plante vasculaire qui fait partie des plantes à graines (spermatophytes) dont l'ovule est à nu (non enclos dans un ovaire) (Campbell, 2004).

Hémicelluloses : Polysaccharides ramifiés qui sont constitués de plusieurs unités monosaccharidiques : D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-mannose et D-galactose. En se basant sur la structure et sur le ou les monomères principaux, les hémicelluloses ont été divisées en quatre catégories qui sont les suivantes (Carpita et al., 2000 ; Ebringerová et al., 2005 ; Vermerris, 2008) : xylane, xyloglucane, β -glucane et mannane.

Hydrolyse à l'acide sulfurique de la cellulose et des hémicelluloses (SAH) : Méthode analytique de dépolymérisation de la cellulose et les hémicelluloses en monosaccharides en deux étapes. Une première étape de solubilisation de la cellulose par de l'acide sulfurique concentré (72% ; p/p) à basse température (30°C) pendant 1h. Une deuxième étape d'hydrolyse des polysaccharides structuraux en monosaccharides par de l'acide sulfurique dilué (4% ; p/p) à haute température (121°C) pendant 2h. Si la première étape n'est pas effectuée seules les

hémicelluloses sont hydrolysées en monosaccharides lors de la deuxième étape. Notons que pour quantifier la cellulose et le glucane hémicellulosique, il est nécessaire de réaliser l'analyse en :

- Deux étapes comme décrites ci-dessus afin de doser le glucane total venant des polysaccharides structuraux ;
- Une seule étape (uniquement la deuxième étape sans la solubilisation de la cellulose) afin de doser le glucane hémicellulosique.

La cellulose est ensuite déterminée en faisant la différence entre le glucane total et le glucane hémicellulosique.

Lignine : Polymère ramifié qui est constitué d'unités phénylpropanes : alcools de type p-hydroxyphényle (dont l'alcool p-coumarylique), syringyle (dont l'alcool synapilique) et guaïacyle (dont l'alcool coniférylique). Pour former la lignine, ces unités sont polymérisées par des peroxydases et des laccases. Ces unités sont associées entre elles principalement par des liaisons de type éther, ester et carbone-carbone (Carpita et al., 2000).

Mannane : Polysaccharide constitué d'unités de D-mannose. Ce terme est utilisé pour exprimer le contenu en D-mannose des hémicelluloses et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités de D-mannose s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de D-mannose, et non en D-mannose).

Pectines : Polysaccharides ramifiés qui sont principalement constitués d'unités d'acide D-galacturonique. Les pectines sont divisées en cinq catégories qui sont les suivantes (Mohnen, 2008) : homogalacturonane, xylogalacturonane, apiogalacturonane, rhamnogalacturonane de type I et rhamnogalacturonane de type II.

Pyrolyse : Procédé de décomposition thermique de la biomasse en absence d'oxygène afin d'éviter toute combustion et oxydation. La pyrolyse peut se réaliser selon deux processus différents afin d'obtenir soit principalement du biocombustible solide (charbon végétal), soit principalement du biocombustible liquide (huile pyrolytique) (Demirbas, 2009).

Transformation biologique : Procédé de transformation par des microorganismes de la biomasse en biogaz par digestion anaérobie (biométhanisation) ou en alcool (bioéthanol ou biobutanol) par fermentation alcoolique.

Transformation thermochimique : Procédé de décomposition thermique de la biomasse en présence d'une quantité d'oxygène en excès et contrôlée (combustion), en présence d'une quantité d'oxygène limitée et contrôlée (gazéification) ou en absence d'oxygène (pyrolyse).

Xylane : Polysaccharide constitué d'unités de D-xylose. Ce terme est utilisé pour exprimer le contenu en D-xylose des hémicelluloses et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités de D-xylose s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de D-xylose, et non en D-xylose).

Introduction générale

Notre société est dépendante des énergies fossiles. La disponibilité de ces énergies est incertaine à cause de leur épuisement progressif. Le prix de ces énergies est extrêmement volatil en raison des fortes pressions sur les marchés (Ballerini et al., 2006). L'utilisation de ces énergies fossiles libère une quantité massive de gaz à effet de serre. Cela engendre des changements dangereux du climat mondial (Ballerini et al., 2006). Face à ces dangers, notre société cherche des sources alternatives d'énergies renouvelables et durables. Il faut néanmoins veiller à ce que le développement de ces nouvelles sources d'énergie ne soit pas délétère au niveau social (concurrence avec la production alimentaire) et environnemental (augmentation des gaz à effet de serre) (Ballerini et al., 2006). Les biomasses végétales comme le bois, les cultures fibreuses, et les résidus forestiers et agricoles représentent d'immenses ressources renouvelables et durables permettant la production d'énergie (Kamm & Kamm, 2004 ; Kamm & Kamm, 2007). Ces biomasses ne sont pas destinées au marché alimentaire car elles ne sont pas transformables en denrées alimentaires et valorisables sur ce marché. La nature du biocombustible produit peut aussi être importante, notamment en regard de son mode de consommation (Ghysel et al., 2010). Les biocombustibles solides et gazeux sont plutôt destinés à être convertis en énergie thermique et électrique à poste fixe. Les biocombustibles liquides sont plutôt destinés à être convertis en énergie mécanique mobile nécessaire aux véhicules de transport.

La valorisation optimale des biomasses végétales en énergie exige de connaître leur composition en polymères structuraux (Kamm & Kamm, 2004 ; Kamm & Kamm, 2007). Ce point est d'autant plus important pour la cellulose et les hémicelluloses car ce sont des polysaccharides structuraux prépondérants de ces biomasses (Carpita et al., 2000). Les teneurs en ces deux polysaccharides structuraux sont utilisées pour évaluer le potentiel en bioéthanol (Spatari et al. 2010). La cellulose est un polymère linéaire constitué d'un seul type de monosaccharide alors que les hémicelluloses sont des polymères ramifiés constituées de plusieurs types de monosaccharides (Carpita et al., 2000). Le problème pour l'analyse de ces deux constituants dans le domaine de la valorisation des biomasses végétales en énergie et en bioproduits réside dans le fait qu'il existe différentes méthodes de dosage venant de domaines d'applications connexes (Southgate et al., 1995 ; Sluiter et al., 2010). Chacune de ces méthodes est fondée

sur une ou plusieurs hypothèses et néglige des facteurs qui n'ont pas d'intérêt dans le domaine d'application pour lequel elle a été optimisée.

En dehors des biomasses végétales issues des cultures alimentaires et des exploitations forestières, il existe peu de données sur la composition chimique de biomasses et leur aptitude aux conversions énergétiques. Il est nécessaire d'élargir nos connaissances à l'ensemble des biomasses végétales de façon à pouvoir les classer par catégorie correspondant chacune à des filières de valorisation énergétique qui leur conviennent le plus.

Pour chaque voie de conversion des biomasses en énergie, il existe des méthodes permettant d'évaluer leur aptitude à la conversion énergétique. Pour diminuer les coûts d'analyse liés à l'évaluation de ces différentes aptitudes, il serait intéressant d'évaluer cette aptitude sur base d'indicateurs communs. A cet effet, les paramètres les plus pertinents de la composition chimique des biomasses pourraient être utilisés. La quantification de ces paramètres permettrait de classer les biomasses en fonction de leur aptitude aux différentes conversions énergétiques et aiderait à prendre des décisions quant aux modes de productions et de transformation à leur appliquer.

Il nous paraît particulièrement important d'approfondir l'étude de la composition chimique des espèces végétales fibreuses et leurs aptitudes aux conversions énergétiques car leur intérêt en tant que source d'énergie est manifeste et grandissant (ENERBIOM, 2012). Pour ces espèces cultivées dans nos conditions pédoclimatiques, des données sont déjà disponibles concernant le rendement en matière sèche par hectare en fonction des modalités de cultures et de l'état physiologique (Cadoux et al., 2009 ; RMT Biomasse, 2009). Toutefois, cela n'est pas le cas pour les données relatives à leur composition chimique et leurs aptitudes aux conversions énergétiques. Il convient donc d'explorer ces aspects afin de savoir si, pour certains états physiologiques ou modalités de culture conviennent mieux pour la valorisation énergétique de ces biomasses. Une telle exploration permettrait d'établir des relations entre composition chimique, aptitudes aux conversions énergétiques, maturation, teneur en matière sèche et rendement en matière sèche, d'une part, la productivité brute d'énergie par hectare de culture, d'autre part. Grâce à ces relations, la production d'énergie à partir des biomasses pourra se fier à des indices précis de valeur énergétique.

Bibliographie

- Ballerini D. & Alazard-Toux N., 2006.** *Les Biocarburants. Etats des lieux. Perspectives et enjeux du développement.* Paris, France : Technip. 348 p.
- Cadoux S., Preudhomme M., Machet J., Mary B., Fourdinier E., Ferchaud F., Boizard H. & Gosse G., 2009.** *Productivity and environmental impacts of energy crops first results of the long term experiment « biomass & environment ».* Hamburg, Germany: 17th European Biomass Conference & Exhibition.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall. In: Buchanan B., Gruissem W. & Jones R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants.* Rockville, USA : American Society of Plant Physiologists, 52-108.
- ENERBIOM, 2012.** *ENERBIOM : Rapport final de projet.* Waremme, Belgique : Province de Liège - Services agricoles.
- Ghysel F., Godin B., Flamin C., Delfosse P., Delcarte J. & Stilmant D., 2010.** Valorisation énergétique des fourrages : comparaison de trois filières, enjeux et opportunités. *Fourrages* **203**, 163-173.
- Kamm B. & Kamm M., 2004.** Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 137-145.
- Kamm B. & Kamm M., 2007.** Biorefineries – Multi Product Processes. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **105**, 175-204.
- RMT Biomasse, 2009.** *Fiches cultures, synthèses.* Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Sluiter J., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter A. & Templeton D., 2010.** Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043-9053.
- Southgate D., 1995.** *Dietary fibre analysis*, Cambridge, UK : The Royal Society of Chemistry.
- Spatari S., Bagley D. & MacLean H., 2010.** Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. *Bioresource Technol.* **101**, 654-667.

Objectifs et démarche

Notre recherche s'inscrit dans le contexte de la production de biomasses végétales riches en cellulose et en hémicelluloses, comme source d'énergie renouvelables. La sélection des espèces végétales fibreuses adaptées à nos conditions pédoclimatiques et appropriées pour la conversion énergétique requiert une bonne connaissance de leur composition chimique et de leurs aptitudes à être transformées en biométhane ou bioéthanol par fermentation, ou à être utilisées comme combustible solide après déshydratation.

Nous avons cherché à répondre spécifiquement aux questions suivantes :

1. Quelle est la méthode appropriée pour doser correctement la cellulose et les hémicelluloses des biomasses végétales en vue de les valoriser en énergie ?
2. Quelle est la composition chimique des biomasses végétales considérées, et quelle est leur composition fine des hémicelluloses ? La composition chimique permet-elle de classer simplement ces biomasses en groupes présentant des propriétés chimiques similaires en vue de simplifier leur orientation vers les filières de valorisation énergétique ?
3. Quels sont les paramètres pertinents de la composition chimique qui permettent d'évaluer l'aptitude des biomasses végétales à aux conversions énergétiques dans un contexte d'optimisation de l'investissement analytique ?
4. Quels sont les paramètres déterminants pour classer les espèces végétales fibreuses afin d'optimiser la productivité brute d'énergie par hectare de culture ?

La démarche que nous avons adoptée pour répondre à ces questions est suivie en 4 étapes correspondant aux 4 paragraphes suivants.

1. Dosage de la cellulose et des hémicelluloses

Une analyse de la littérature nous a permis de comparer l'intérêt et les limitations de diverses méthodes dosant la cellulose et les hémicelluloses dans des domaines d'applications connexes (Partie 1 - Chapitres 2 à 4). En combinant les avantages respectifs de ces méthodes, nous avons défini notre propre méthode, en visant en outre à répondre à des contraintes supplémentaires au niveau de l'instrument analytique à mettre en œuvre. Nous avons mis au point et quantifié la précision de ce protocole (Partie 2 - Chapitre 5), et l'avons mis en œuvre pour caractériser un grand nombre de biomasses végétales (49 espèces ; 461 échantillons) (Partie 2 - Chapitre 2 ; Partie 3 - Chapitres 6). Notre méthode offre l'avantage de pouvoir réaliser l'analyse fine des hémicelluloses (c'est-à-dire leur composition monosaccharidique), mais reste néanmoins plus lourde et coûteuse que la méthode de Van Soest qui, bien qu'entachée d'un certains biais, sert de référence dans de nombreux laboratoires. La comparaison entre notre méthode et la méthode de Van Soest, nous a permis de tester dans quelle mesure les résultats qui seraient obtenus avec notre méthode peuvent être prédits en appliquant la méthode de Van Soest et en corrigeant les résultats sur base d'une connaissance générale de la nature de la biomasse analysée (Partie 2 - Chapitre 6).

2. Composition chimique et aptitudes à la conversion énergétique

Pour acquérir une meilleure connaissance de la composition chimique (y compris la composition fine des hémicelluloses) des biomasses végétales et de la diversité qui peut être rencontrée, nous avons analysé des biomasses issues de différents essais agronomiques (Partie 3 - Chapitres 7 à 9). Les essais agronomiques concernant ces biomasses portent sur des cultures fibreuses ayant un intérêt énergétique. Nous avons déterminé leurs aptitudes aux conversions énergétiques. Ces aptitudes sont basées sur la digestibilité enzymatique de la matière organique (MODE) (pris comme indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement) et le pouvoir calorifique supérieur de ces biomasses (PCS) (pris comme indicateur du potentiel en combustion après déshydratation). Nous avons

aussi prédit le potentiel de production d'éthanol (sur base de la composition en hydrates de carbone structuraux et non structuraux). Nous avons élargi ces approches en analysant diverses biomasses, d'origines phylogénétiques variées (Partie 3 - Chapitre 9). Notre étude de biomasses fibreuses nous a permis d'évaluer la variabilité de leur composition chimique et leurs aptitudes aux conversions énergétiques en fonction de son état physiologique (Partie 3 - Chapitre 8), ainsi que de l'année, du site, de la variété et du niveau de fertilisation azotée (Partie 3 - Chapitre 7). Une approche statistique (analyse en composantes principales) appliquée à l'ensemble des compositions chimiques des biomasses que nous avons déterminées, a mis en évidence que la diversité des compositions rencontrées peut se structurer en groupes de composition ayant des liens avec l'origine phylogénétique et la teneur en fibres (Partie 3 - Chapitre 9). Outre son intérêt biologique, ce lien entre composition chimique et phylogénie a permis d'affiner nos autres approches, en y distinguant notamment les biomasses commélinoides, angiospermes non-commélinoides et gymnospermes.

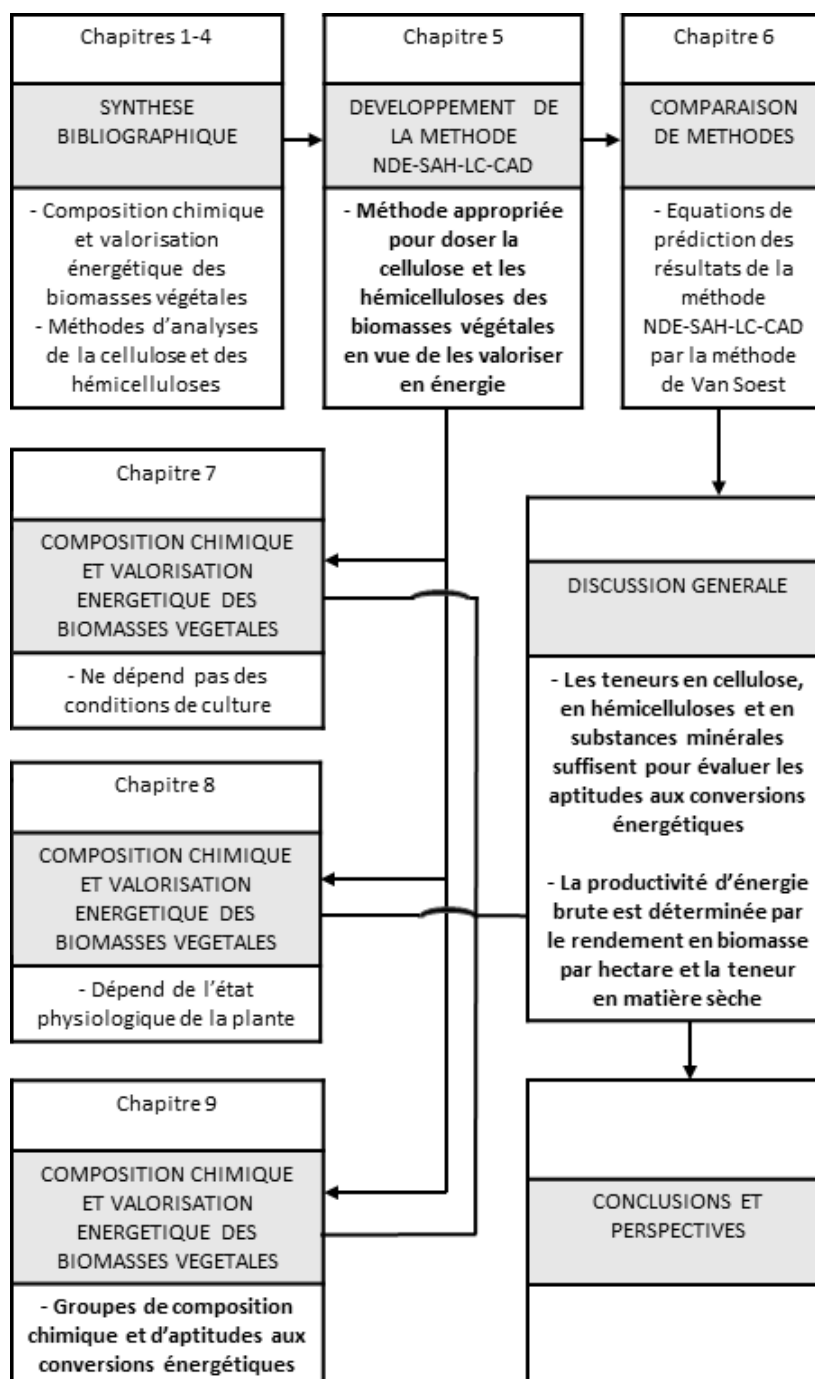
3. Evaluation des aptitudes aux conversions énergétiques

Pour réduire les coûts d'analyses liés à la détermination des aptitudes des biomasses végétales aux conversions énergétiques, nous avons sélectionné les paramètres pertinents de leur composition chimique permettant d'évaluer ces aptitudes sur base d'indicateurs communs. Pour ce faire, l'analyse en composante principale a été appliquée pour relier la composition chimique des biomasses et leurs modes de transformations en énergie par digestion anaérobie sans prétraitement, par combustion après déshydratation et par fermentation éthanolique (Discussion générale).

4. Productivité brute d'énergie

Les essais agronomiques ont fourni des biomasses fibreuses dont nous avons déterminé la composition chimique et les aptitudes aux conversions énergétiques, mais également des données de rendement en matière sèche (tonnes/(hectare x an)) et de teneur en matière sèche qui nous ont été communiquées (Partie 3 - Chapitres 7 et 8). Ces différentes données ont permis d'analyser l'influence respective de la composition chimique, des aptitudes aux conversions énergétiques, de la maturation,

de la teneur en matière sèche et du rendement en matière sèche sur la productivité brute d'énergie par hectare de culture (Discussion générale).



Représentation schématique de cette thèse

Partie 1

Chapitre 1

Biomasses végétales à vocation énergétique

Mots-clés. Valorisation biomasse, Biocombustible, Bioénergie

1. Introduction

Cette thèse s'inscrit dans le contexte du développement de la production de biomasses végétales, en vue du développement de filières de valorisations énergétiques. Afin de bien situer dans son contexte général, une revue bibliographique a été réalisée. Le cadre politique, législatif, énergétique et environnemental dans lesquels se développent les filières de valorisations énergétiques y sont brièvement présentées en distinguant les voies de transformation en énergie, que peuvent suivre les biomasses.

Nous nous intéressons spécialement à la composition chimique des biomasses fibreuses car leur intérêt en tant que source d'énergie est manifeste et grandissant (ENERBIOM, 2012). Nous nous intéressons aussi aux aptitudes des biomasses fibreuses à être converties en énergie. Des points spécifiques, comme l'étude agronomique de la production de ces biomasses sont approfondis.

2. Contexte

Ce début de siècle est marqué par la prise de conscience de notre société qu'il est temps de maîtriser la consommation des ressources limitées d'énergie fossile. Notre société se tourne vers une utilisation efficace de l'énergie et le développement d'une économie basée également sur de l'énergie renouvelable et durable (Ballerini et al., 2006). La mise en place d'une telle économie est nécessaire vu la dépendance de notre société aux ressources fossiles. La disponibilité de ces ressources fossiles est incertaine en raison de leur épuisement progressif. Le prix de ces ressources fossiles est extrêmement volatil en raison des fortes pressions des marchés. Ces incertitudes risquent également d'accroître les tensions géopolitiques (Ballerini et al., 2006). Notre économie et son développement sont directement et largement dépendants de l'énergie fossile. Il est désormais nécessaire de trouver des sources alternatives d'énergie permettant à notre société de répondre à nos besoins et de poursuivre sa progression tout en respectant les engagements internationaux qui ont été pris, comme le respect des objectifs fixés à Kyoto (Ballerini et al., 2006).

Ce nouveau modèle socio-économique permettra à notre société de faire face à sa production excessive de gaz à effet de serre responsable des changements dangereux du climat mondial. Ces changements sont liés à l'utilisation de l'énergie fossile responsable de la libération anarchique de carbone emprisonné depuis des millénaires (Ballerini et al., 2006).

Afin que l'énergie renouvelable soit également durable, sa production et son utilisation devra prendre en compte les éléments suivants (Ballerini et al., 2006) :

- Au niveau économique : la rentabilité financière de la production, le retour financier sur investissement, le coût de l'énergie, la sécurité d'approvisionnement en énergie, ... ;
- Au niveau social : l'accès à la nourriture, à l'eau et à l'énergie ; l'emploi et les conditions de travail ; l'accès à la propriété et les habitudes locales, ... ;
- Au niveau environnemental : les émissions de gaz à effet de serre, la biodiversité, la qualité de l'eau, de l'air et des sols, notamment leur stock en carbone organique,

2.1. Contexte politique et législatif

Tenant compte de sa dépendance aux importations d'énergies fossiles et la nécessité de développer des énergies renouvelables et durables, les Etats membres de l'Union européenne ont adopté la directive énergie sur les énergies renouvelables 2009/28/CE. Les objectifs de cette directive, à réaliser pour 2020, sont les suivants (Union européenne, 2009) :

- Augmenter de 20% l'efficacité de la consommation de l'énergie ;
- Atteindre une part de 20% d'énergie renouvelable dans la consommation d'énergie totale finale dont une part de 10% d'énergie renouvelable dans la consommation d'énergie totale finale au niveau du secteur de transport ;
- Réduire de 20% les émissions de gaz à effet de serre.

Pour s'assurer que l'objectif de la production de 10% d'énergie renouvelable dans le transport soit atteint tout en respectant l'environnement, les critères de durabilité suivants ont été définis pour ce secteur (Union européenne, 2009):

- Réduire les émissions de gaz à effet de serre d'au moins 35%, de 50% d'ici 2017 et de 60% pour les installations de production démarrant au 1^{er} janvier 2017 ;
- L'énergie ne peut pas être produite à partir de matières premières issues de terres à grande valeur biologique comme les forêts non perturbées par une activité humaine importante, les prairies à haute valeur biologique, les tourbières et les zones affectées à la protection de la nature ou d'écosystèmes ;
- L'énergie ne peut pas être produite à partir de matières premières issues de terres ayant un stock de carbone organique important comme les zones humides et les zones forestières continues.

Cette directive précise également que la contribution apportée par les biocarburants produits à partir de matières non alimentaires (comme les déchets, les résidus, les matières cellulosiques d'origine non alimentaire et les matières lignocellulosiques ; c'est-à-dire des substrats non-transformables en denrées alimentaires et non-valorisables en alimentation humaine) est considérée comme équivalente à deux fois celle des autres biocarburants (Union européenne, 2009).

En Belgique des lois spécifiques ont été mises en place pour stimuler la production d'énergies renouvelables destinées au secteur du transport. La loi belge du 10 juin 2006 permet un avantage fiscal de 0,62 €/l et 0,35 €/l pour, respectivement, le bioéthanol et le biodiesel lorsqu'ils sont mélangés à faible pourcentage, le premier à l'essence et le second au diesel. Pour bénéficier de cet avantage, la production de l'énergie renouvelable doit être agréée par l'Etat. Cette loi a pu être mise en œuvre grâce à la directive européenne 2003/96/CE permettant aux Etats membres d'appliquer des exonérations sur les énergies renouvelables destinées au secteur du transport. La loi belge du 22 juillet 2009 oblige d'incorporer au moins 4% en volume de bioéthanol et de biodiesel, respectivement, à l'essence et au diesel.

Les objectifs poursuivis par l'Union européenne en mettant en œuvre ces mesures sont les suivants (Union européenne, 2009) :

- Garantir sa sécurité d'approvisionnement en énergie ;
- Diminuer sa production de gaz à effet de serre ;
- Développer des énergies durables, compétitives et diversifiées ;
- Créer de l'emploi, innover et être compétitive dans le domaine des énergies renouvelables.

2.2. Contexte énergétique

Au niveau mondial en 2007, la part d'énergie fossile, nucléaire et renouvelable représentait, respectivement, 84%, 6% et 10% dans la consommation finale d'énergie (Conférence des Nations Unies sur le commerce et le développement, 2012). Au niveau de l'Union européen en 2010, la part d'énergie fossile, nucléaire et renouvelable représentait, respectivement, 77%, 13% et 10% dans la consommation finale d'énergie (Eurostat, 2012). En Belgique en 2010, la part d'énergie fossile, nucléaire et renouvelable représentait, respectivement, 75%, 21% et 4% dans la consommation finale d'énergie (Eurostat, 2012). Le secteur du transport routier est un grand consommateur d'énergie fossile. En 2010, le secteur du transport au niveau de l'Union européenne et de la Belgique représentait, respectivement, 28% et 32% de la consommation totale d'énergie dont, respectivement, 87% et 73% de cette consommation était due au transport routier (Eurostat, 2012).

Ces données confirment bien la dépendance de notre société par rapport aux ressources fossiles ainsi que le faible niveau de développement de l'énergie renouvelable. Au début des années 2000, le prix du baril de pétrole brut oscillait entre 30 à 40 \$ US (entre 0,19 à 0,25 \$ US par litre de pétrole brut). Depuis lors, son prix n'a cessé d'augmenter. Actuellement, il oscille entre 80 et 120 \$ US (entre 0,50 et 0,75 \$ US par litre de pétrole brut). Ce phénomène s'explique par l'épuisement des ressources fossiles et la demande accrue en pétrole brut des pays émergents (Conférence des Nations Unies sur le commerce et le développement, 2012). Ces pays connaissent une explosion démographique et/ou une forte croissance de leur activité économique. Du fait de la hausse et de la volatilité des prix du baril de

pétrole brut, notre société cherche à développer une économie basée sur les énergies renouvelables. Cette volatilité s'explique par les fortes pressions des marchés. Certaines de ces énergies sont déjà compétitives et d'autres le deviennent. Elles permettent de sécuriser l'approvisionnement en énergie de notre économie (Conférence des Nations Unies sur le commerce et le développement, 2012). Il faut néanmoins veiller à ce que le développement de ces nouvelles sources d'énergie ne soit pas délétère au niveau social (concurrence avec la production alimentaire) et environnemental (comme l'augmentation des gaz à effet de serre).

2.3. Contexte environnemental

L'effet de serre est indispensable à la vie sur terre car il élève la température de la surface de la terre. Néanmoins, la concentration en CO₂ (l'un des gaz à effet de serre) dans l'atmosphère n'a cessé de croître exponentiellement depuis la révolution industrielle. Cette augmentation est liée à celle de la consommation sans cesse croissante d'énergie fossile, générant des changements dangereux du climat mondial. L'usage d'énergie renouvelable est une alternative à l'énergie fossile. En évitant cette production excessive de gaz à effet de serre, l'énergie renouvelable permettra de réduire ces changements climatiques (Ballerini et al., 2006). Une partie de cette augmentation de la concentration en CO₂ dans l'atmosphère s'explique également par la déforestation et la mise en culture de forêts et de prairies (Schenkel et al., 2005).

L'utilisation de biomasses végétales pour la production d'énergies renouvelables est en théorie neutre au niveau du bilan d'émission net de CO₂. Le CO₂ libéré lors de l'utilisation de cette énergie issue de la biomasse est refixé lors du cycle de culture suivant. Pour ce faire, les conditions suivantes doivent être vérifiées (Schenkel et al., 2005) :

- Renouveler la production de la biomasse utilisée ;
- Maintenir la fertilité du sol utilisé ;
- Ne pas recourir à des pratiques agricoles engendrant un excès d'émissions de gaz à effet de serre ;
- Ne pas engendrer de changement direct ou indirect par l'affection du sol liée à la

culture utilisée.

La transformation des biomasses végétales en énergie (mécanique, électrique et/ou thermique) est réalisée par conversion biologique ou thermochimique, ou par extraction physicochimique des triglycérides. La transformation biologique correspond à la conversion de la biomasse par des microorganismes en alcool (comme le bioéthanol et le biobutanol) ou en biogaz. La transformation thermochimique correspond à la décomposition thermique en présence d'une quantité d'oxygène en excès et contrôlée (combustion), en présence d'une quantité d'oxygène limitée et contrôlée (gazéification) ou en absence d'oxygène (pyrolyse). L'étude de Rettenmaier et al. (2009) (Figure 1) montre que la production d'énergie à partir de biomasses végétales est principalement bénéfique à neutre en ce qui concerne le bilan des gaz à effet de serre et toujours bénéfique pour le bilan énergétique. Par contre, au niveau des autres critères environnementaux (acidification de l'air, eutrophisation de l'eau, destruction de la couche d'ozone, oxydation photochimique et toxicité humaine), le bilan est plus mitigé. Pour la production d'énergie, dans l'ordre décroissant du bilan environnemental et énergétique favorable au moins favorable (Rettenmaier et al., 2009) :

- Les biomasses les plus intéressantes proviennent des végétaux herbacées, ligneux (bois) puis oléagineux ;
- Les énergies les plus intéressantes proviennent de la cogénération (électricité et chaleur), de la chaleur de l'électricité puis des biocombustibles liquides ;
- Les biocombustibles liquides les plus intéressantes sont le bioéthanol puis le biodiesel. Au niveau du bilan énergétique et environnemental, le bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et le biodiesel obtenu par la voie de conversion Fischer-Tropsch sont un peu plus bénéfiques que le bioéthanol issu des hydrates de carbone non-structuraux et le biodiesel issu des graines d'oléagineux.

La production d'énergie par digestion anaérobie (c'est-à-dire de biogaz par biométhanisation) à partir de biomasses végétales possède également un bilan énergétique et des gaz à effet de serre qui sont bénéfiques (Cherubini et al., 2009).

Une caractéristique défavorable des biomasses végétales est leur faible densité. De ce fait, elles doivent être d'origine locale. Leur transport sur de longues

distances (plus de 70 km) engendre un impact négatif important sur le bilan environnemental, énergétique et économique de production d'énergie (Lindh et al., 2009 ; Rettenmaier et al., 2009). Afin d'être bénéfiques, ces bilans nécessitent généralement la valorisation en tant qu'énergie et/ou produit des co/sous-produits (Rettenmaier et al., 2009).

Chapitre 1

Environmental performance of different energy crops; '+++': <-400; '++': -400 to -100; '+': -100 to -25; 'o': -25 to +25; '-': 25 to 100; '- -': 100 to 400; all values given in inhabitant equivalents (IE) per 100 hectares. FAME = fatty acid methyl ester (biodiesel), HVO = hydrogenated vegetable oil, FT = Fischer-Tropsch, EtOH = bioethanol.							
	Energy savings	Greenh. effect	Acidification	Eutrophication	Summer smog	Ozone depletion	Human toxicity
Oil crops – FAME	+	o	o	-	o	--	o
Oil crops – HVO	+	o	o	-	o	--	-
Oil crops – Heat & power	+	o	-	-	o	--	-
Oil crops – Heat	+	o	-	-	o	--	-
Oil crops – Power	+	o	-	-	o	--	-
Woody crops – FT diesel	+	o	o	o	o	o	o
Woody crops – Second-generation EtOH	+	+	-	-	o	-	-
Woody crops – Heat & power	++	+	o	o	o	o	o
Woody crops – Heat	+	+	o	o	o	o	o
Woody crops – Power	+	o	o	o	o	o	o
Herb. crops – FT diesel	++	+	o	-	o	-	o
Herb. crops – Second-generation EtOH	++	++	-	-	+	-	-
Herb. crops – Heat & power	+++	++	o	-	o	-	o
Herb. crops – Heat	++	++	-	-	o	-	-
Herb. crops – Power	++	+	o	-	o	-	-
Sugar crops – First-generation EtOH	++	+	-	-	o	-	-
Indicators and LCI parameters for all environmental impact categories.							
Environmental impact category	Category indicator		Life cycle inventory parameters				
Energy savings	Cumulative primary non-renewable energy use		Crude oil, natural gas, hard coal, lignite, uranium ore				
Greenhouse effect	CO ₂ equivalent (carbon dioxide equivalent)		Carbon dioxide fossil, nitrous oxide, methane biogenous, methane fossil				
Acidification	SO ₂ equivalent (sulphur dioxide equivalent)		Sulphur dioxide, nitrogen oxides, ammonia, hydrochloric acid				
Eutrophication	PO ₄ equivalent (phosphate equivalent)		Nitrogen oxides, ammonia				
Summer smog (POCP)	C ₂ H ₄ equivalent (ethylene equivalent)*		Non-methane hydrocarbons, methane				
Ozone depletion	CFC-11 equivalent (CFC1 ₃ equivalent)		Trichlorofluoromethane, nitrous oxide, other CFCs, HFCs, FCs, ...				
Human toxicity	PM10 equivalent		Particulate matter, sulphur dioxide, nitrogen oxides, non-methane hydrocarbons, ammonia				
Biofuel and bioenergy chains, including conversion technology, main product and fossil reference system, for each crop category. FAME = fatty acid methyl ester (biodiesel), HVO = hydrogenated vegetable oil, FT = Fischer-Tropsch, EtOH = bioethanol, UCTE = Union for the Coordination of Transmission of Electricity.							
Crop category	Conversion technology		Biofuel / bioenergy type		Fossil reference system		
	Transesterification		FAME		Diesel fuel		
Oil crops	Hydrogenation		HVO		Diesel fuel		
	Direct combustion		Heat & power		Light fuel oil & UCTE mix		
			Heat		Light fuel oil		
			Power		UCTE mix		
Lignocellulosic crops (woody & herbaceous)	Gasification & FT synthesis		FT diesel		Diesel fuel		
	Hydrolysis & fermentation		Second-generation EtOH		Gasoline		
	Direct combustion		Heat & power		Light fuel oil & UCTE mix		
			Heat		Light fuel oil		
			Power		UCTE mix		
	Sugar crops	Fermentation		First-generation EtOH		Gasoline	
Inhabitant equivalent per environmental impact category (base year: 2005).							
Environmental impact category	Unit	EU27 inhabitant equivalent					
Energy Savings	GJ / yr	82					
Greenhouse effect	t CO ₂ equivalent / yr	11					
Acidification	kg SO ₂ equivalent / yr	49					
Eutrophication	kg PO ₄ equivalent / yr	6					
Summer smog (POCP)	kg C ₂ H ₄ equivalent / yr	20					
Ozone depletion	kg CFC-11 equivalent / yr	0.069					
Human toxicity	kg PM10 equivalent / yr	40					

Figure 1. Performances environnementales et énergétiques de différentes biomasses végétales liées à leurs valorisations énergétiques (Rettenmaier et al., 2010)

3. Biomasses végétales et valorisation énergétique

Les biomasses végétales stockent l'énergie solaire sous forme d'énergie chimique dans les molécules issues de la photosynthèse. La photosynthèse est le processus permettant la transformation du CO₂ et de l'eau en carbone organique (McKendry, 2002 ; Chandel et al., 2010). Ce carbone organique est principalement stocké au niveau des parois cellulaires sous forme des substances suivantes (Carpita et al., 2000 ; Grabber et al., 2005) :

- Cellulose (polysaccharide linéaire constitué seulement d'unités D-glucose) ;
- Hémicelluloses (polysaccharides ramifiés constitués d'unités D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-mannose et D-galactose) ;
- Lignine (polymère ramifié constitué d'unités phénylpropanes : alcools de type p-hydroxyphényle, syringyle et guaïacyle) ;
- Pectines (polysaccharides ramifiés constitués principalement d'unités d'acide D-galacturonique) ;
- Hydrates de carbone solubles (D-glucose, D-fructose, saccharose et fructanes) ;
- Amidon (polysaccharide linéaire ou ramifié constitué seulement d'unités D-glucose) ;
- Protéines.

La cellulose, les hémicelluloses et la lignine sont les constituants les plus abondants dans les biomasses végétales comme le bois, les cultures fibreuses, et les résidus forestiers et agricoles. De ce fait, ces constituants représentent d'immenses ressources renouvelables rendant ces biomasses favorables au bioraffinage (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Le bioraffinage couvre les opérations permettant de fractionner et de transformer les biomasses en vecteurs énergétiques et en produits dérivés, dénommés bioproduits (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Les vecteurs énergétiques sont produits à partir de biocombustibles solides (comme les pellets), liquides (comme le bioéthanol) ou gazeux (comme le biogaz) issus de la transformation des biomasses. Les vecteurs énergétiques permettent la conversion d'énergie sous différentes formes : mécanique, électrique ou/et thermique (United Nations Development Programme, 2000). La nature du biocombustible produite peut aussi être importante, notamment en regard de son mode de consommation

(Ghysel et al, 2010). Les biocombustibles solides et gazeux sont plutôt destinés à être convertis en énergie thermique et électrique à poste fixe. Les biocombustibles liquides sont plutôt destinés à être convertis en énergie mécanique mobile nécessaire aux véhicules de transport. Le combustible liquide est une forme aisément stockable, transportable et concentrée d'énergie potentielle. Néanmoins, la transformation en biocombustibles liquides de l'énergie initiale contenue dans ces biomasses est moins efficace par rapport aux biocombustibles solides et gazeux (Ghysel et al, 2010).

3.1. Les biomasses fibreuses

Le terme biomasse désigne la matière organique d'origine biologique et non fossilisée issue de végétaux, d'animaux et de microorganismes. Ce terme inclut (Hoogwijk et al., 2003 ; Demirbas, 2009) les:

- Produits et co/sous-produits forestiers ;
- Produits et co/sous-produits agricoles qui incluent les résidus agricoles (comme les pailles, les bagasses, les sons, les rafles, ...), des cultures annuelles (comme le froment, la betterave, ...) et des cultures pérennes (comme le miscanthus, le panic érigé, la fétuque élevée, ...) ;
- Déjections animales ;
- Co/sous-produits organiques industriels ;
- Déchets organiques urbains ;
- Biomatériaux (comme les fibres de chanvre et de lin utilisées comme isolant).

Nous avons défini les biomasses fibreuses comme étant les biomasses végétales principalement constituées de fibres (cellulose, hémicelluloses et lignine) ; c'est-à-dire que la somme de la teneur en cellulose, en hémicelluloses et en lignine représente la plus grande partie des constituants de ces biomasses.

Deux types d'espèces se distinguent au niveau de la durée de la culture des biomasses fibreuses (Cadoux et al., 2009 ; Cadoux et al., 2010 ; Ghysel et al., 2010) :

- Les espèces pérennes comme le miscanthus, le panic érigé et la fétuque élevée. Les cultures de ces espèces nécessitent moins d'interventions au cours du cycle cultural. Elles ont besoin de moins de fertilisants car pendant l'hiver ces espèces transloquent leurs éléments minéraux vers leurs rhizomes, si elles sont récoltées en fin d'hiver. Elles ont également besoin d'une utilisation moindre de produits phytosanitaires car la production de tiges et de feuilles est moins exigeante à ce niveau. Ces cultures permettent de lutter contre l'érosion, préserver la fertilité du sol et de contribuer au stockage de carbone organique dans le sol. En outre, ces cultures sont bénéfiques pour la biodiversité et ne requièrent qu'une seule implantation. Celle-ci peut toutefois s'avérer onéreuse, comme pour le miscanthus. Des cultures comme la fétuque élevée doivent être récoltées 3 fois par an afin de présenter un rendement annuel en matière sèche par hectare acceptable.
- Les espèces annuelles comme le sorgho fibre et le maïs fibre. Elles ont des exigences plus élevées au niveau des intrants et des conditions pédoclimatiques. Elles requièrent une implantation annuelle. Néanmoins, elles ne bloquent pas une sole pendant plusieurs années et s'insèrent facilement dans une rotation de cultures.

Pour les cultures de biomasses fibreuses, deux types d'espèces se distinguent au niveau de la fixation du CO₂ par la photosynthèse (Dohleman, 2010) :

- Les espèces de type C3. Elles sont principalement originaires des pays tempérés (comme l'épeautre, le seigle, la fétuque élevée, le dactyle, le topinambour, ...). Lors de la photosynthèse, elles forment une molécule à trois carbones, appelée le 3-phosphoglycérate, en fixant le CO₂. Cette fixation est réalisée par l'enzyme RuBisCo (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase). L'efficacité (fixation de carbone) de la photosynthèse de ces espèces diminue en fonction de l'augmentation de la température. Cela s'explique par la photorespiration. Celle-ci affecte négativement la photosynthèse de manière accrue en fonction de l'augmentation de la température.

- Les espèces de type C4. Elles sont généralement d'origine tropicale (comme le miscanthus, le panic érigé, le sorgho, le maïs, ...). Lors de la photosynthèse, elles forment une molécule à quatre carbones, appelée l'oxaloacétate, en fixant le CO₂. Cette fixation est réalisée par l'enzyme PEPcase (phosphoénolpyruvate carboxylase). Grâce à ce mécanisme, ces espèces ne sont pas affectées par la photorespiration. De ce fait, cette photosynthèse est plus efficace (plus de fixation de carbone) que les espèces de type C3. Elle permet également à ces espèces de mieux utiliser l'eau que les espèces de type C3. De ce fait, les espèces de type C4 offrent généralement des rendements en biomasse per hectare plus importants que les espèces de type C3. Néanmoins, à basse température, la photosynthèse de type C4 est moins efficace que celle des espèces de type C3.

L'utilisation des biomasses fibreuses comme source d'énergie permet de produire de l'énergie renouvelable et durable (ENERBIOM, 2012), et de diminuer la production de gaz à effet de serre (ENERBIOM, 2012). Cette utilisation permet également d'éviter au maximum la concurrence avec la production alimentaire (Ghysel et al., 2010) et les problématiques liées à la production du bioéthanol et du biodiesel générée à partir de cultures alimentaires (Ballerini et al., 2006).

Les cultures de biomasses fibreuses permettent de diversifier les revenus et les activités des exploitations agricoles (Ghysel et al., 2010). Afin d'être durable, la production d'énergie à partir de ces cultures nécessite (McKendry, 2002 ; Ghysel et al., 2010) :

- Des rendements élevés en matière sèche par hectare ;
- Des quantités élevées de biomasse disponible ;
- De faibles besoins en intrants (fertilisants, produits phytosanitaires, énergie) ;
- Des faibles impacts environnementaux sur le sol, l'eau et la biodiversité ;
- Une faible production de gaz à effet de serre ;
- Un faible coût de production.

Cependant, les critères pertinents (agronomiques, techniques, économiques et environnementaux) que les exploitations agricoles doivent également prendre en compte dans le cadre de leur développement durable sont les suivants (Ghysel et al., 2010) :

- L'adéquation de la culture avec le pédoclimat afin d'avoir des rendements en biomasse qui permettent à la culture d'être économiquement rentable ;
- La fréquence de récolte, le conditionnement, le stockage et la disponibilité en biomasse ;
- L'identification de débouchés et la qualité exigée (matière sèche et/ou composition chimique) de la biomasse en fonction de la valorisation ;
- La pertinence environnementale qui dépend de la conduite de la culture ;
- La cohérence territoriale vis-à-vis de la surface agricole.

Cette thèse s'intéresse spécialement aux biomasses fibreuses car leur importance en tant que source d'énergie est manifeste grandissant (ENERBIOM, 2012). De ce fait, des points spécifiques, comme l'étude agronomique, de ces biomasses fibreuses sont approfondis ci-dessous. Ces biomasses fibreuses sont les suivantes : miscanthus, panic érigé, paille d'épeautre, sorgho fibre, mélange « dactyle-luzerne » et fétuque élevée récoltés en 3 cycles de récolte annuel, seigle immature, maïs fibre, chanvre et la partie aérienne du topinambour. Ces biomasses fibreuses ont été choisies car elles sont non-alimentaires (ENERBIOM, 2012). Elles sont généralement destinées à être cultivées sur des terres non-adaptées aux cultures alimentaires et en apportant moins d'intrants par rapport aux cultures alimentaires tout en donnant des rendements acceptables en matière sèche (MS) par hectare (ENERBIOM, 2012). Elles permettent généralement la valorisation de la majorité de la plante (ENERBIOM, 2012). En outre, ces biomasses fibreuses ont été étudiées au cours de cette thèse car elles présentent un intérêt particulier :

- La paille d'épeautre est un résidu agricole d'une céréale rustique. Sa culture nécessite moins d'intrants (la fertilisation azotée est deux fois moindre) par rapport au froment (Escarnot, 2012). L'étude de la paille d'épeautre permet également de déterminer les caractéristiques chimiques et énergétiques d'une biomasse très semblable à la paille de froment. L'épeautre et le froment sont des sous-espèces d'une même espèce (Escarnot, 2012). La paille de froment est une

biomasse majeure au niveau mondial pour laquelle l'importance en tant que source d'énergie est grandissant (Escarnot, 2012).

- Dans le cadre de cette thèse, le seigle a été récolté immature, c'est-à-dire au début du printemps. Cette pratique permet d'implanter une nouvelle culture (comme le maïs) au printemps (ENERBIOM, 2012). Cette approche est bénéfique au niveau environnemental car elle permet de piéger les nitrates en automne (Destain et al., 2010). Cette approche permet également de réduire l'érosion par le maintien d'un couvert végétal hivernal (Destain et al., 2010). Ce mode de culture évite donc les problématiques liées à l'implantation d'une culture au printemps comme le maïs fibre (ENERBIOM, 2012).
- Le maïs fibre peut également être utilisé comme fourrage car il est très proche du maïs fourrager (Schmit, 2011). Cette culture est habituellement menée avec un niveau élevé d'intrants. Toutefois, elle peut être menée avec un niveau plus faible d'intrants (la fertilisation azotée est deux fois moindre) tout en donnant des rendements importants en MS par hectare (ENERBIOM, 2012). Vu que l'ensilage du maïs fourrager est parfois un échec, l'étude du maïs fibre permet également d'appréhender sa valorisation énergétique (Schmit, 2011).
- Le sorgho fibre peut également être utilisé comme fourrage tout comme le sorgho fourrager dont il est très proche (Schmit, 2011). Cette culture peut facilement être introduite dans une rotation de cultures (ENERBIOM, 2012). Il produit des rendements importants en fibres par hectare, et cela sans produire d'amidon contrairement au maïs fibre (ENERBIOM, 2012).

Les caractéristiques agronomiques des biomasses fibreuses, qui ont été étudiées de manière approfondie par cette thèse, sont décrites ci-dessous. Le récapitulatif des caractéristiques agronomiques de ces différentes cultures se trouvent au Tableau A1 en annexe.

Cultures fibreuses pérennes

Miscanthus giganteus



Famille : Poaceae

Espèce : *Miscanthus* x *giganteus*

J.M.Greef & Deuter ex Hodk. & Renvoize

Pérennité : 15-20 ans

Origine : Asie du sud-est

Figure 2. *Miscanthus giganteus*
(ENERBIOM, 2012)

Le *Miscanthus giganteus* est une plante monocotylée mesurant de 3 à 4 m de haut. La plantation de la culture de *Miscanthus giganteus* est réalisée au début du printemps dès que le sol est réchauffé (ENERBIOM, 2012). Le matériel végétal utilisé pour la plantation est un rhizome d'au moins 20 g ayant au moins un œil (RMT Biomasse, 2009a). Les rhizomes sont sensibles au dessèchement (RMT Biomasse, 2009a). Ils sont implantés avec une densité entre 10 000 et 20 000 pieds par hectare à une profondeur de 10 à 15 cm. Cette implantation est coûteuse (environ 3 000 € par hectare) et délicate (RMT Biomasse, 2009a). Le *Miscanthus giganteus* est stérile et non invasif. Sa multiplication est effectuée par voie végétative (par bouturage du rhizome) (RMT Biomasse, 2009a). Le *Miscanthus* est récolté sec en fin d'hiver (par une ensileuse ou une faucheuse) afin de lui permettre de transloquer ses éléments minéraux au niveau de ses rhizomes au cours de l'automne. Cela permet également de le récolter avec une teneur en MS d'au moins 70 % (RMT Biomasse, 2009a ; ENERBIOM, 2012). La première année de culture produit peu de biomasse. Cette biomasse est donc broyée et restituée au sol. Ceci permet de créer un « mulch » qui protège la culture des adventices et les rhizomes du gel pendant l'hiver. Les années suivantes, ce sont les feuilles tombant au sol qui

génèrent ce « mulch ». La récolte avec des rendements raisonnables en biomasse est possible dès la deuxième année de culture. La culture de *miscanthus giganteus* n'entre en pleine production qu'après 3 à 5 ans sans baisse de rendement en matière sèche au cours du temps (RMT Biomasse, 2009a). Cette culture est adaptée aux conditions des régions tempérées mais elle reste relativement exigeante en température et reste sensible au gel lors du démarrage des jeunes pousses (RMT Biomasse, 2009a ; ENERBIOM, 2012).

Au cours des deux premières années, cette culture est sensible aux adventices vu que le sol n'est pas assez couvert et que la levée est lente (plante de saison chaude) (RMT Biomasse, 2009a). Un désherbage chimique ou mécanique est donc nécessaire car les adventices ont un fort impact sur le rendement en biomasse par hectare des premières années et sur la vitesse d'entrée en pleine production. Une fois passée ces deux premières années, la conduite de cette culture est aisée (RMT Biomasse, 2009a).

La culture de *miscanthus giganteus* a des faibles besoins en intrants (RMT Biomasse, 2009a ; ENERBIOM, 2012). Les 2 à 3 premières années, aucune fertilisation azotée n'est nécessaire. Les années suivantes, elle a de faibles besoins en azote. Cet apport d'azote n'est pas obligatoire mais il permet d'accroître les rendements en biomasse par hectare (RMT Biomasse, 2009a). Cette culture exporte des quantités plus importantes de potassium que de phosphore (RMT Biomasse, 2009a). Cette culture s'adapte bien à tous les types de sols sauf aux suivants : argile lourd hydromorphe, crayeux avec un pH supérieur à 8,5 ou sableux très superficiel (RMT Biomasse, 2009a). Elle peut être conduite sur des sols contaminés par des métaux lourds (RMT Biomasse, 2009a). Elle préfère les sols bien pourvus en eau et/ou profond. La plante de *miscanthus giganteus* développe un système racinaire profond (RMT Biomasse, 2009a). La culture de *miscanthus giganteus* protège le sol de l'érosion et crée un abri pour la faune (RMT Biomasse, 2009a). Elle est sensible au stress hydrique de juin à septembre (RMT Biomasse, 2009a). La culture de *miscanthus giganteus* a des exigences pédoclimatiques modérées (ENERBIOM, 2012).

La photosynthèse de type C4 du *miscanthus giganteus* (Dohleman, 2010 ; Byrt et al., 2011) explique le rendement annuel important en biomasse par hectare de sa culture. En pleine production, cette culture permet de produire de 7 à 25 tonnes

MS/(hectare x an) pour une récolte en fin d'hiver. Ce type de récolte est particulièrement adapté à la valorisation par voie thermochimique du fait de ses faibles teneurs en eau (RMT Biomasse, 2009a ; ENERBIOM, 2012). Elle est également adaptée à la valorisation en tant que biomatériaux et litière (RMT Biomasse, 2009a). Cette culture peut aussi être récoltée en automne, le rendement annuel par hectare en pleine production est alors de 10 à 35 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS de 40 à 50%). Ce type de récolte est alors adapté à la valorisation par digestion anaérobie (biométhanisation) (RMT Biomasse, 2009a, ENERBIOM, 2012). Néanmoins, une récolte en automne empêche la plante de *miscanthus giganteus* la translocation ses éléments minéraux vers ses rhizomes. De ce fait, une fertilisation azotée plus importante est nécessaire pour la culture de *miscanthus giganteus* afin qu'elle donne un rendement en biomasse par hectare équivalent l'année suivante (RMT Biomasse, 2009a).

Panic érigé



Famille : Poaceae

Espèce : *Panicum virgatum* L.

Pérennité : 15-20 ans

Origine : Amérique du Nord

**Figure 3. Panic érigé
(ENERBIOM, 2012)**

Le panic érigé (switchgrass en anglais) est une plante monocotylée mesurant de 2 à 3 m de haut. Le panic érigé est non invasif (RMT Biomasse, 2009b). Le semis de la culture du panic érigé est réalisé au milieu du printemps. La levée du semis peut s'avérer problématique (70% de levée en moyenne en conditions favorables) à cause d'un taux de dormance trop élevé (ENERBIOM, 2012). La culture de panic

érigé entre en pleine production après 2 à 4 ans. Son rendement en matière sèche par hectare au cours du temps ne baisse pas (RMT Biomasse, 2009b). Cette culture est récoltée en sec en fin d'hiver (par une ensileuse ou une faucheuse) afin de lui permettre de transloquer ses éléments minéraux vers ses rhizomes au cours de l'automne. Cela permet également de le récolter avec une teneur en MS d'au moins 70 % (RMT Biomasse, 2009b ; ENERBIOM, 2012). Un risque de verse de la plante de panic érigé existe lorsque la densité de semis et/ou la fertilisation azotée de sa culture sont trop élevées (RMT Biomasse, 2009b). Dans des moindres mesures que pour la culture de *miscanthus giganteus*, la culture de panic érigé reste relativement exigeante en température et reste sensible au gel au démarrage des jeunes pousses (RMT Biomasse, 2009b).

La culture de panic érigé est sensible aux adventices au cours de la (ou les deux) première(s) année(s), le sol n'étant pas couvert et sa levée étant lente (plante de saison chaude) (RMT Biomasse, 2009b). Afin que le rendement en biomasse par hectare et la vitesse d'entrée en pleine production ne soient pas affectés par la concurrence venant des adventices, un désherbage chimique ou mécanique est nécessaire (ENERBIOM, 2012). Une fois la (ou les deux) première année passée, la conduite de cette culture est aisée (RMT Biomasse, 2009b).

Il existe deux catégories de variétés de panic érigé à privilégier en fonction des conditions pédoclimatiques. Le type « *lowland* » est adapté aux sols humides. Le type « *upland* » préfère les sols secs (Schmit, 2011).

La culture de panic érigé a des faibles besoins en intrants. La (ou les deux) première(s) année(s) aucune fertilisation azotée n'est nécessaire. Elle a ensuite des faibles besoins en azote. Cet apport n'est pas obligatoire mais il permet d'avoir des rendements en biomasse par hectare accrus (RMT Biomasse, 2009b). La culture de panic érigé s'adapte bien à tous les types de sols sauf aux suivants : hydromorphe et crayeux avec un pH supérieur à 8,5 (RMT Biomasse, 2009b). Cette culture préfère les sols bien pourvus en eau et/ou profond (RMT Biomasse, 2009b). Le système racinaire très profond de la plante de panic érigé lui permet de puiser des ressources en profondeur et d'aérer le sol (RMT Biomasse, 2009b). La culture de panic érigé protège le sol de l'érosion (RMT Biomasse, 2009b). La culture de panic érigé a des faibles exigences pédoclimatiques (ENERBIOM, 2012).

La photosynthèse de type C4 du panic érigé (Dohleman, 2010 ; Byrt et al., 2011) explique le rendement annuel important en biomasse par hectare de sa culture. En pleine production, elle produit de 7 à 20 tonnes MS/(hectare x an) pour une récolte en fin d'hiver. Ce type de récolte est particulièrement adapté à la valorisation par voie thermochimique du fait de ses faibles teneurs en eau (RMT Biomasse, 2009b ; ENERBIOM, 2012). Cette culture peut aussi être récoltée en automne, le rendement annuel par hectare en pleine production est alors de 10 à 25 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS de 35 à 50%). Ce type de récolte est alors adapté à la valorisation par digestion anaérobie (biométhanisation) (RMT Biomasse, 2009a, ENERBIOM, 2012). Néanmoins, une récolte en automne empêche la plante de panic érigé à transloquer ses éléments minéraux vers ses rhizomes. De ce fait, une fertilisation azotée plus importante est nécessaire pour la culture de panic érigé afin qu'elle donne un rendement en biomasse par hectare équivalent l'année suivante (RMT Biomasse, 2009b).

Fétuque élevée



**Figure 4. Fétuque élevée
(ENERBIOM, 2012)**

Famille : Poaceae

Espèce : *Festuca arundinacea* Schreb.

Pérennité : 6-15 ans

Origine : Europe

Dactyle



**Figure 5. Dactyle
(ENERBIOM, 2012)**

Famille : Poaceae

Espèce : *Dactylis glomerata* L.

Pérennité : 6-10 ans

Origine : Régions tempérées de l'hémisphère nord

La fétuque élevée et le dactyle sont des plantes herbacées monocotylées pouvant atteindre jusqu'à 2 m de haut à l'inflorescence. Le semis de culture de fétuque élevée et de dactyle se réalise au début du printemps ou à la fin de l'été

(ENERBIOM, 2012). Les rendements par hectare de ces cultures sont très faibles la première année. Les années suivantes, ces cultures sont récoltées (sous forme d'ensilage ou de foin après séchage) trois fois par an afin d'obtenir un rendement acceptable en biomasse par hectare, 5 à 15 tonnes MS/(hectare x an) en pleine production (avec une teneur en MS de 30 à 35%) (ENERBIOM, 2012). Ce type de récolte est particulièrement adapté à la valorisation par digestion anaérobie (biométhanisation) (ENERBIOM, 2012). Si elles sont destinées à être utilisées en combustion alors elles sont récoltées (sous forme de foin) une fois qu'elles ont séché sur pied (teneur en MS d'au moins 70%). Dans ce cas, les rendements de ces cultures en pleine production sont de 5 à 7 tonnes MS/(hectare x an) (RMT Biomasse, 2009c).

Les cultures de fétuque élevée et de dactyle sont très robustes et résistantes à la sécheresse et au froid (RMT Biomasse, 2009c). Elles peuvent être associées à une légumineuse (trèfle ou luzerne) afin de réduire l'apport en azote (RMT Biomasse, 2009c). Elles protègent le sol de l'érosion (RMT Biomasse, 2009c). Les sols trop humides ne leur conviennent pas, surtout pour le dactyle. Elles se développent mieux sur les sols profonds (RMT Biomasse, 2009c). La faible densité de semis et la lenteur de levée des cultures de fétuque élevée et de dactyle engendrent une concurrence venant des adventices. Si la concurrence est trop importante alors un désherbage chimique ou mécanique est nécessaire (ENERBIOM, 2012). Ces cultures herbacées de saison froide supportent bien les températures élevées (RMT Biomasse, 2009c). Les systèmes racinaires forts développés et profonds de la plante de fétuque élevée et de dactyle leur confèrent une bonne croissance estivale (RMT Biomasse, 2009c). La culture de fétuque élevée et de dactyle ont des faibles exigences pédoclimatiques (ENERBIOM, 2012).

Topinambour



Famille : Asteraceae

Espèce : *Helianthus tuberosus* L.

Pérennité : 5 ans si les tubercules ne sont pas récoltés

Origine : Amérique du Nord

**Figure 6. Topinambour
(ENERBIOM, 2012)**

Le topinambour (jerusalem artichoke en anglais) est une plante dicotylée rustique pouvant atteindre jusqu'à 2,5 m de haut. La culture de topinambour est implantée sous forme de tubercules en fin d'hiver. Cette plantation nécessite un buttage (Schmit, 2011). Les fanes de topinambour sont récoltées au début de l'automne (sous forme d'ensilage). Cette récolte offre des rendements annuels par hectare de 7 à 11 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS de 25 à 35%) (Schmit, 2011). Lors de la récolte des fanes, il est possible d'en faire de même avec les tubercules. Ceux-ci représentent une quantité importante de biomasse par hectare mais dont la récolte mécanisée et la conservation sont difficiles (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998a).

La culture de topinambour peut être menée sur des sols pauvres et nécessite peu d'intrants. Elle est néanmoins exigeante en eau (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998a). Le topinambour a des faibles exigences pédoclimatiques (Schmit, 2011).

Cultures fibreuses annuelles

Sorgho fibre



Famille : Poaceae

Espèce : *Sorghum bicolor* (L.) Moench

Origine : Afrique

**Figure 7. Sorgho fibre
(ENERBIOM, 2012)**

Le sorgho fibre est une plante monocotylée mesurant de 3 à 4 m de haut. Le semis et la récolte de la culture de sorgho fibre sont réalisés, respectivement, au printemps (dès que le sol est réchauffé) et au début de l'automne (sous forme d'ensilage ou de paille après séchage) (ENERBIOM, 2012). Cette culture tropicale, bien qu'adaptée aux conditions des régions tempérées, est exigeante en température et reste sensible au gel. De ce fait, les variétés précoces sont préconisées en région tempérées (RMT Biomasse, 2009d).

Le système racinaire très développé et la photosynthèse de type C4 du sorgho fibre (Dohleman, 2010 ; Byrt et al., 2011) lui permettent d'utiliser efficacement l'eau et les nutriments à sa disposition (RMT Biomasse, 2009d). De ce fait, la culture de sorgho fibre nécessite de faibles apports en eau et n'a pas d'exigences particulières au niveau du sol, à l'exception des sols hydromorphes à éviter. Cette culture préfère néanmoins un sol profond (RMT Biomasse, 2009d). Sa culture nécessite un désherbage chimique ou mécanique afin d'éviter la concurrence des adventices (ENERBIOM, 2012). Le sorgho fibre a des exigences pédoclimatiques élevées (ENERBIOM, 2012).

Grâce à la photosynthèse de type C4 du sorgho fibre (Dohleman, 2010 ; Byrt et al., 2011), sa culture offre un important rendement en biomasse par hectare, de 5 à 20 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS de 20 à 30%) (ENERBIOM, 2012). Dans des régions avec un climat au moins aussi chaud que celui de la méditerranée, la culture de sorgho fibre peut être fauchée et séchée au champ. Cela permet d'obtenir un substrat avec une teneur en MS d'au moins 80%. Sous cette forme, il est également adapté à la valorisation par voie thermochimique (RMT Biomasse, 2009d).

Maïs fibre



Famille : Poaceae

Espèce : *Zea mays* L.

Origine : Amérique latine et centrale

**Figure 8. Maïs fibre
(ENERBIOM, 2012)**

Le maïs fibre est une plante monocotylée mesurant de 3 à 4 m de haut. Le semis et la récolte de la culture de maïs fibre sont réalisés, respectivement, au printemps (dès que le sol est réchauffé) et au début de l'automne (sous forme d'ensilage) (ENERBIOM, 2012). Cette culture est adaptée aux conditions des régions tempérées mais elle reste relativement exigeante en température et reste sensible au gel (ENERBIOM, 2012).

La culture de maïs fibre peut se contenter de sols médiocres mais elle préfère néanmoins un sol profond, riche et de bonne structure. Elle nécessite un désherbage chimique ou mécanique afin d'éviter la concurrence des adventices (ENERBIOM, 2012). Elle a des besoins importants en produits phytosanitaires et en fertilisants (ENERBIOM, 2012). L'apport en eau est capital pour un bon rendement en

biomasse par hectare de maïs fibre (ENERBIOM, 2012). La culture de maïs fibre a des exigences pédoclimatiques modérées (ENERBIOM, 2012).

Grâce à la photosynthèse de type C4 du maïs fibre, sa culture offre un important rendement en biomasse par hectare, de 13 à 20 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS de 30 à 35%). Elle est particulièrement adaptée à la valorisation par digestion anaérobie (biométhanisation) (ENERBIOM, 2012) et à la production de bioéthanol issu de l'amidon (Ballerini et al., 2006).

Chanvre



Famille : Cannabaceae

Espèce : *Cannabis sativa* L.

Origine : Asie

**Figure 9. Chanvre
(ENERBIOM, 2012)**

Le chanvre est une espèce dicotylée constituée de plusieurs sous-espèces (sativa, indica, spontanea, kafiristanica). La sous-espèce utilisée pour la production de fibres est sativa. Elle mesure de 2 à 3 m de haut. Celle-ci regroupe plusieurs variétés qui sont adaptées à différentes conditions pédoclimatiques (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998b). Autrefois, le chanvre était très présent en Europe comme fibre pour l'industrie textile mais son utilisation en tant stupéfiant a engendré l'interdiction de sa culture. Aujourd'hui, la culture des variétés certifiées contenant moins de 0,3% de tétrahydrocannabinol (THC) (qui est le principal psychotrope du chanvre) est autorisée (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998b). Le semis et la récolte de la culture de chanvre fibre sont réalisés, respectivement, au printemps (dès que le sol est réchauffé) et au début de l'automne (battage des inflorescences et fauchage des tiges) (ENERBIOM, 2012). Le rendement en biomasse par hectare de cette culture est de 10 à 14 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS de 35 à 45%) (ENERBIOM, 2012). Elle

est adaptée à la valorisation en tant que biomatériaux et litière. Une fois sèches, les tiges de chanvre fibre sont très résistantes au broyage (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998b). L'extraction de l'huile (riche en acide linoléique) contenue dans ses graines est importante pour sa rentabilité économique. Le rendement en huile est de 300 à 400 litres/(hectare x an) (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998b).

La culture de chanvre fibre n'est pas exigeante quant au sol et à ses réserves en eau car le chanvre fibre possède un système racinaire bien développé lui permettant d'exploiter les réserves du sol. La culture de chanvre fibre ne tolère pas les sols trop acides (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998b). Cette culture nécessite ni produits phytosanitaires, ni de travaux entre le semis et la récolte. Cette culture est aisée à mener (ENERBIOM, 2012). La culture de chanvre fibre a des faibles exigences pédoclimatiques (ENERBIOM, 2012).

Seigle



Famille : Poaceae

Espèce : *Secale cereale* L.

Origine : Turquie et environs

Figure 10. Seigle
(ENERBIOM, 2012)

Le seigle est une céréale rustique possédant une inflorescence avec des rangées de petites barbes et de longues barbes terminales (ENERBIOM, 2012). Cette culture monocotylée est dite « nettoyante » car elle permet un bon contrôle des adventices (ENERBIOM, 2012). Le seigle est de plus en plus utilisé comme culture intercalaire piège à nitrates (CIPAN). Cela permet également de réduire l'érosion du sol par le maintien d'un couvert végétal hivernal (entre deux cultures) (Destain et

al., 2010). Le seigle est semé en automne (Destain et al., 2010). En culture intercalaire, il est soit enfoui au printemps avant la culture suivante, soit récolté sous forme d'ensilage et offre des rendements par hectare de 1 à 3 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS de 20 à 25%) (Destain et al., 2010 ; ENERBIOM, 2012). Ce type de récolte est particulièrement adapté à la valorisation par digestion anaérobie (biométhanisation) (ENERBIOM, 2012). En culture classique, il est récolté soit à maturité en juillet-août, soit moins mature en juin-juillet (ENERBIOM, 2012).

Le seigle est une plante robuste, très résistante au froid et tolérante aux sols acides mais l'humidité stagnante ne lui convient pas (ENERBIOM, 2012). La culture de seigle a des faibles exigences pédoclimatiques moindres. Elles sont moindres par rapport à celles du froment (ENERBIOM, 2012).

Résidu agricole fibreux

Paille d'Epeautre



Famille : Poaceae

Espèce : *Triticum aestivum* L. ssp. *spelta* (L.) Thell.

Origine : Moyen-Orient

**Figure 11. Epeautre
(ENERBIOM, 2012)**

L'épeautre est une céréale rustique proche du froment. La différenciation entre l'épeautre et le froment est aisée grâce à ses grains vêtus. Les grains restent couverts de leur balle lors de la récolte (Escarnot, 2012). La paille de cette culture monocotylée est un résidu agricole facile à récolter (ENERBIOM, 2012). Le semis et la récolte de la culture d'épeautre sont réalisés, respectivement, en automne et l'été suivant (Escarnot, 2012). La récolte de cette culture offre des rendements en paille par hectare de 3 à 8 tonnes MS/(hectare x an) (avec une teneur en MS d'au

moins 70 %) (ENERBIOM, 2012). Elle est particulièrement adaptée à la valorisation par voie thermochimique du fait de ses faibles teneurs en eau (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998c). Elle est également adaptée à la valorisation en tant que biomatériaux et litière (Escarnot, 2012).

La culture d'épeautre offre des rendements inférieurs au froment mais sa culture peut être menée sur des sols pauvres. Elle nécessite un plus faible apport en eau (Escarnot, 2012). Cette culture est très résistante au froid, aux maladies et aux infestations (Escarnot, 2012). La culture d'épeautre a des faibles exigences pédoclimatiques. Elles sont moindres par rapport à celles du froment (ENERBIOM, 2012).

Coût annuel de production de biomasses fibreuses

Le coût annuel de production de biomasses fibreuses a été estimé par l'étude de Hopquin (2011). Certaines de ces biomasses (sorgho fibre, panic érigé et miscanthus giganteus) correspondent à celles étudiées de manière approfondie par cette thèse. L'étude de Hopquin (2011) a estimé le coût annuel de production de ces biomasses dans le contexte agronomique et pédoclimatique de la Picardie (France).

Le coût de production par hectare et année des cultures fibreuses considérées par cette étude se situe entre 220 à 600 €/hectare x an (Figure 12) (Hopquin, 2011). Ce coût dépend majoritairement du coût lié à la récolte. Ce dernier coût est le plus élevé pour la culture de taillis à très courte rotation et de miscanthus giganteus. Les cultures les plus ligneuses montrent la plus grande résistance mécanique à être récoltée. Le coût lié à l'implantation du miscanthus giganteus est important car son implantation est réalisée à partir de rhizomes onéreux (Hopquin, 2011).

Le coût de production par tonne de MS des cultures fibreuses considérées par l'étude de Hopquin (2011) se situe entre 22 à 70 €/tonne MS (Figure 13). Les cultures fibreuses ayant des rendements en biomasse annuels par hectare élevés sont celles pour lesquelles ce coût de production est bas. Ce coût dépend également majoritairement du coût lié à la récolte (Hopquin, 2011).

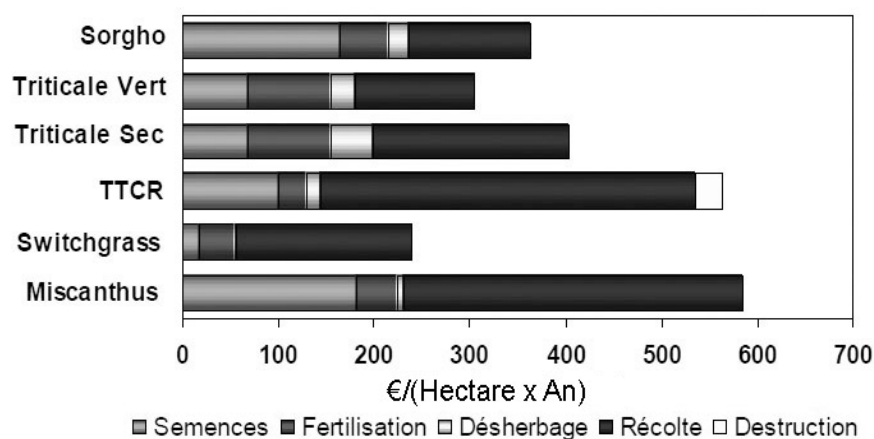


Figure 12. Coût de production de différentes cultures fibreuses en euros par hectare et par an (Adapté de Hopquin, 2011)

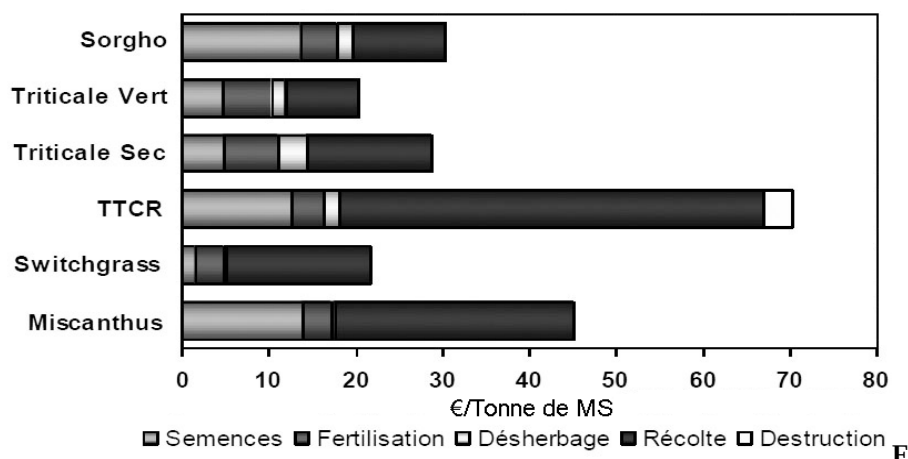
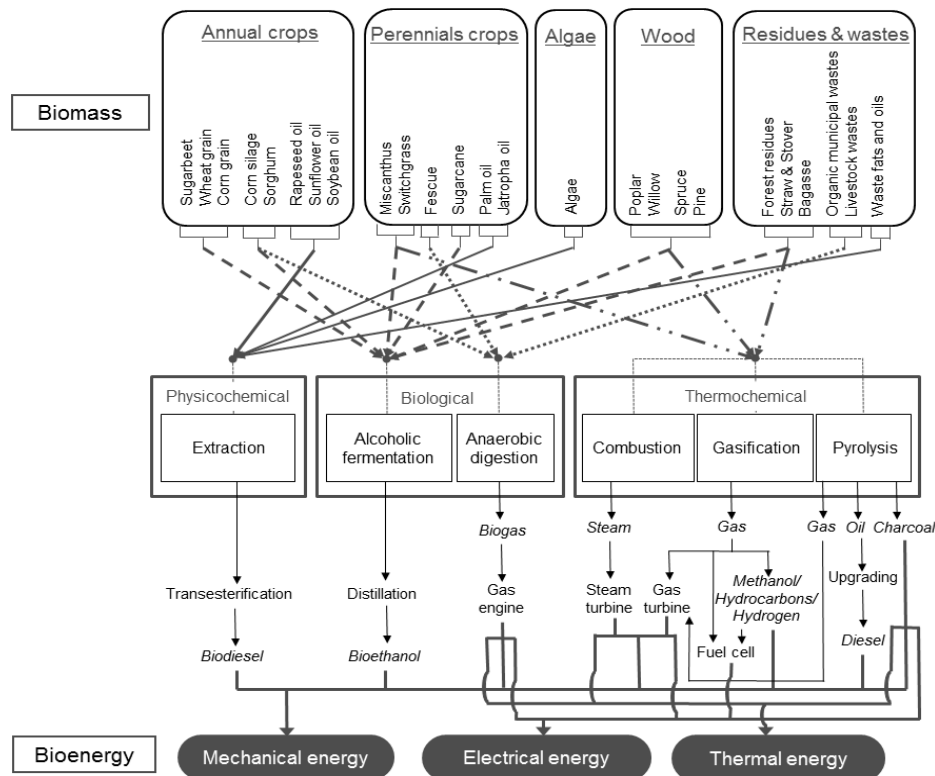


Figure 13. Coût de production de différentes cultures fibreuses en euros par tonne de MS (Adapté de Hopquin, 2011)

3.2. Voies de transformation en énergie

La conversion des biomasses végétales en formes utilisables d'énergies (mécanique, électrique et/ou thermique) est réalisée par l'une de trois voies de transformation suivantes (Figure 14) (United Nations Development Programme, 2000) :

- La transformation biologique, c'est-à-dire la transformation par des microorganismes de la biomasse en biogaz par digestion anaérobie (biométhanisation) ou en alcool (bioéthanol ou biobutanol) par fermentation alcoolique ;
- La transformation thermochimique, c'est-à-dire la décomposition thermique de la biomasse en présence d'une quantité d'oxygène en excès et contrôlée (combustion), en présence d'une quantité d'oxygène limitée et contrôlée (gazéification) ou en absence d'oxygène (pyrolyse) ;
- L'extraction physicochimique des triglycérides des graines de cultures oléagineuses ou des cellules d'algues riches en triglycérides.



Légende. Pour les flèches justes en dessous de «biomass»; les flèches continues correspondent à la conversions physico-chimique; les flèches en grands pointillés correspondent à la conversions par fermentation alcoolique; les flèches en petits pointillés correspondent à la conversions par digestion anaérobie; les flèches en petits et grands pointillés correspondent à la conversions thermochimique

Figure 14. Les voies de valorisation énergétique des biomasses (Adaptée d'United Nations Development Programme, 2000)

Transformation biologique

Biométhanisation

La biométhanisation est un procédé permettant de produire du biogaz à partir de la matière organique. Cette transformation est réalisée par l'action de plusieurs groupes de bactéries et d'archéobactéries en absence d'air sur de la biomasse généralement humide (Braun, 2007). Cette digestion anaérobie est réalisée en régime mésophile (37°C) ou en régime thermophile (55°C) dans des conteneurs, silos ou fosses hermétiques appelés digesteurs (Braun, 2007). Quatre étapes se succèdent lors de la biométhanisation (Braun, 2007) :

- La transformation de la matière complexe (polymère) en molécules plus simples (monomères issus des polymères) par les bactéries ;
- La transformation de ces molécules simples en acides organiques, CO₂, hydrogène et alcools, par les bactéries acidogènes ;
- La transformation des acides organiques, CO₂, hydrogène et alcools en acide acétique par les bactéries acétogènes ;
- La production, par les bactéries méthanogènes, de méthane et de CO₂ à partir des molécules d'acide acétique (70% de la production de méthane) ou de méthane par réduction du CO₂ grâce l'hydrogène (30% de la production de méthane).

Le biogaz produit au final est un mélange de méthane (50% à 80% ; le combustible), de CO₂ (20% à 50 %) et de sulfure d'hydrogène (0,0% à 0,5%). La teneur et la quantité de ces gaz dépendent de la nature de la matière organique introduite (Braun, 2007). Avant de transformer le biogaz en énergie électrique et/ou thermique, il faut l'épurer de ses vapeurs d'eau par condensation (Braun, 2007). Une autre étape courante d'épuration est la désulfuration du biogaz par oxydation car l'acide sulfurique est un important agent de corrosion (Braun, 2007). Les effluents solides et liquides des digesteurs peuvent être utilisés comme fertilisants (Braun, 2007). La production de biogaz permet de valoriser des co/sous-produits (résidus végétaux et effluents d'élevage) et des déchets (ordures ménagères organiques) (Braun, 2007).

La taille des unités de biométhanisation fait de quelques dizaines de kW à plusieurs dizaines de MW. Le coût de production du biogaz est modéré. Il est estimé entre 0,06 et 0,10 €/kWh pour la production d'électricité (Defossez, 2009a).

Fermentation alcoolique

Le procédé de fermentation alcoolique permet la production d'alcools (bioéthanol et/ou biobutanol) par fermentation anaérobie des monosaccharides. L'objectif poursuivi est soit de générer uniquement de l'éthanol (fermentation éthanolique) produit principalement par *Saccharomyces cerevisiae* (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007), soit de générer un mélange d'acétone, de butanol et d'éthanol (fermentation ABE) produit principalement par *Clostridium acetobutylicum* (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Les fermentations alcooliques peuvent se réaliser directement à partir de substrats contenant du

glucose, du fructose et du saccharose libre (comme par exemple les betteraves et les cannes à sucre) (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Elles peuvent également s'effectuer à partir de l'amidon (comme avec les grains de maïs et de froment) ou des fructanes (comme avec les agaves). Pour ce faire, une hydrolyse transformant ces polysaccharides en monosaccharides est réalisée préalablement à la fermentation. Cette hydrolyse est généralement accomplie, par des amylases pour l'amidon et des fructanases pour les fructanes (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Il est également possible de procéder à ces fermentations à partir de la cellulose et des hémicelluloses (comme par exemple avec le bois et les cultures fibreuses) si les étapes suivantes sont successivement réalisées (Kamm et al., 2004 ; Hamelinck et al., 2005 ; Kamm et al., 2007) :

- Prétraitement (chimique, thermique et/ou mécanique) appliqué à la biomasse afin de libérer ces deux polysaccharides de la lignine qui les imprègne ;
- Détoxification et neutralisation des inhibiteurs d'hydrolyse et de fermentation. Ces inhibiteurs sont les acides organiques, le furfural, l'hydroxyméthylfurfural et les polyphénols ;
- Hydrolyse de la cellulose et des hémicelluloses en monosaccharides généralement accomplie par, respectivement, des cellulases et des hémicellulases.

Un avantage au niveau de la composition chimique des cultures fibreuses de type commélinoïde par rapport aux essences forestières est qu'elles ont un rapport (cellulose+hémicelluloses)/lignine plus élevé. Cela implique que leur transformation en bioéthanol issu de la cellulose et des hémicelluloses nécessite une intensité de prétraitement moins sévère (Didden et al., 2008).

L'alcool produit doit ensuite être concentré et purifié avant d'être utilisé pur ou mélangé à un autre combustible liquide. La distillation est généralement le procédé utilisé afin de concentrer l'éthanol (Galbe et al., 2007). Pour que la consommation énergétique de cette étape ne soit pas excessive, il faut que le contenu en éthanol après fermentation soit d'au moins 3 à 4% (v/v) d'éthanol (Galbe et al., 2007). L'éthanol produit peut également être utilisé dans d'autres domaines que celui de l'énergie tels que les produits pharmaceutiques et cosmétiques, l'alcool de bouche et des bioproduits (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). La fermentation éthanolique génère du CO₂ de haute pureté qui peut être purifié et comprimé pour

être utilisé dans d'autres domaines (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Les effluents solides issus de la fermentation éthanolique de la cellulose et/ou des hémicelluloses possèdent une teneur élevée en lignine (qui possède une teneur très élevée en carbone). De ce fait, ces effluents sont favorables pour la production d'électricité et/ou de chaleur (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Les effluents liquides de la fermentation éthanolique peuvent être biométhanisés pour permettre la production d'électricité et/ou de chaleur (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007).

La taille des unités de production est située entre 100 et 300 kt par an de bioéthanol venant d'hydrates de carbone non-structuraux (hydrates de carbone solubles et amidon) (Defossez, 2009b). La taille des unités de production est située entre 50 et 100 kt par an de bioéthanol venant d'hydrates de carbone structuraux (cellulose et hémicelluloses) (Morris, 2006). La taille de ces dernières unités correspond aux unités semi-commerciales en construction. Le coût de production estimé du bioéthanol venant d'hydrates de carbone non-structuraux est faible, entre 0,25 et 0,45 €/litre (Ballerini et al., 2006 ; Morris, 2006). Le coût de production estimé du bioéthanol venant d'hydrates de carbone structuraux est modéré, entre 0,40 et 0,50 €/litre (Morris, 2006). Le procédé de fermentation acétone-butanol-éthanol (ABE) est actuellement qu'au stade de pilote. Son coût de production est donc important. Il est actuellement estimé aux environs de 1,50 €/litre (Pfromm et al., 2010).

Transformation thermochimique

Les substrats utilisés pour la transformation thermochimique sont ceux venant de biomasses fibreuses comme le bois, les cultures fibreuses et les résidus agricoles fibreux. Ces biomasses ont une teneur plus élevée en carbone que les autres biomasses végétales (Demirbas, 2009). Ce type de transformation nécessite des biomasses possédant une faible teneur en eau afin d'éviter la perte d'énergie liée à la présence de celle-ci. La transformation thermochimique est destinée aux biomasses possédant une faible teneur en substances minérales, et contenant des faibles teneurs en soufre, chlore et azote. Les substances minérales engendrent la production de mâchefers (Demirbas, 2009). Ces dernières peuvent s'avérer problématique car ils entrent en fusion (à une température inférieure à 1200°C). Cette fusion des mâchefers est due (Defossez, 2009d) soit à :

- Une teneur trop élevée en potassium et, la présence simultanément, d'une teneur importante en silice ;

Des substances minérales créant un eutectique à bas point de fusion.

L'ajout de chaux permet d'augmenter la température de fusion des mâchefers (Defossez, 2009d). La présence de soufre, de chlore et d'azote entraîne la formation de fumées acides contenant, respectivement, de l'acide sulfurique, chlorhydrique et nitrique. Ces acides engendrent de la corrosion de l'unité de transformation. L'ajout de bicarbonate de soude permet de piéger ces acides avant qu'ils se condensent (Defossez, 2009d). Les substances alcalines présentes dans les fumées jouent également un rôle dans la corrosion de l'unité de transformation. De plus, le rejet des fumées acides engendre l'acidification de l'atmosphère et la libération de puissants gaz à effet de serre (les oxydes d'azote) (Defossez, 2009d). Il est donc nécessaire d'installer un système d'épuration des fumées afin d'éviter cette problématique.

La taille des unités de transformation thermochimique fait de quelques dizaines de kW à plusieurs dizaines de MW (Defossez, 2009d ; Defossez, 2009e).

Combustion

La combustion consiste en l'oxydation thermique totale de la biomasse à très haute température en présence d'une quantité d'oxygène en excès et contrôlée. Afin que la combustion se réalise correctement, il faut éviter de trop grands volumes de fumée et des pertes importantes de rendement (Schenkel et al., 2005). Dans la chaudière, la chaleur produite est transférée à un fluide caloporteur qui est de l'eau dans le cas d'un réseau de chauffage ou de la vapeur envoyée dans une turbine pour la production d'électricité et de chaleur (cogénération) (Schenkel et al., 2005). Le coût de production d'énergie par combustion est modéré. Il est estimé entre 0,06 et 0,10 €/kWh pour la production d'électricité (Forest Products Laboratory, 2004 ; Shelly, 2010).

Gazéification

La gazéification est un procédé de décomposition thermique de la biomasse à 800°C en présence d'une quantité d'oxygène limitée et contrôlée. Ce procédé génère un gaz principalement constitué de monoxyde de carbone et d'hydrogène (Demirbas, 2009). Ce gaz est purifié et filtré afin d'en éliminer les goudrons, les alcalins, le soufre et le CO₂. Ces substances interfèrent avec les catalyseurs permettant la production de méthane, de méthanol, d'éthanol, de diméthyléther, d'hydrogène ou de chaînes hydrocarbonées de type diesel (produites par la procédé Fischer-Tropsch) à partir du monoxyde de carbone et de l'hydrogène (Defossez, 2009c ; Defossez, 2009e ; Demirbas, 2009). Le gaz produit peut également être utilisé comme combustible pour générer de l'électricité et de la chaleur en l'utilisant dans des turbines à gaz ou pour produire de l'électricité par l'intermédiaire de piles à combustible (Defossez, 2009e ; Demirbas, 2009). Le coût de production de chaînes hydrocarbonées de type diesel (produites par la procédé Fischer-Tropsch) est modéré. Son coût de production est estimé entre 0,50 et 1,00 €/litre (Hamelinck, 2004 ; van Ree et al., 2005). Le coût de production d'énergie par gazéification est modéré. Il est estimé entre 0,05 et 0,09 €/kWh pour la production d'électricité (van der Drift et al., 2000 ; Shelly, 2010).

Il est préférable d'alimenter le processus de gazéification par de la matière pyrolysée afin d'avoir une matière initiale très homogène. La gazéification est particulièrement sensible à ce point (Demirbas, 2009).

Pyrolyse

La pyrolyse correspond à la décomposition thermique de la biomasse en absence d'oxygène afin d'éviter toute combustion et oxydation. La pyrolyse peut se réaliser selon deux processus différents afin d'obtenir soit principalement du biocombustible solide (charbon végétal), soit principalement du biocombustible liquide (huile pyrolytique) (Defossez, 2009f ; Demirbas, 2009).

Le premier type processus consiste à monter lentement jusqu'à une température de 300 à 400°C et de rester à cette température pendant plusieurs minutes. Ce procédé permet de produire principalement du charbon végétal (Defossez, 2009f ; Demirbas, 2009). Ce dernier a l'avantage d'être un combustible solide végétal avec un contenu

énergétique élevé et de brûler plus proprement. Le coût de production de ce charbon végétal est modéré. Il est estimé aux environs de 60 €/tonne (Penmetsa et al., 2011). Le deuxième type processus consiste à monter très rapidement jusqu'à une température de 600 à 1000°C et de rester à cette température pendant quelques secondes (Demirbas, 2009). Dans ce type de processus, la granulométrie doit être plus faible comparée au premier type de pyrolyse décrite. Le temps d'incubation est très court (Demirbas, 2009). Ce deuxième type procédé permet de produire principalement de l'huile pyrolytique. Le raffinage de cette huile pyrolytique permet d'obtenir un combustible liquide proche du diesel. Le coût de production de cette huile pyrolytique raffinée est modéré. Il est estimé entre 0,50 et 1,00 €/litre (Wright et al., 2010 ; Rapier, 2012).

La pyrolyse génère également un gaz contenant du monoxyde de carbone et de l'hydrogène. Ce gaz permet la production d'électricité et de chaleur en l'utilisant dans des turbines à gaz (Demirbas, 2009).

Transformation physicochimique

Le procédé physicochimique est dédié à la production d'huile en extrayant les triglycérides de la biomasse (comme les graines d'oléagineux et les cellules d'algues) par voie mécanique (pressage) ou par voie physicochimique (avec solvants comme l'hexane) (Bessou et al., 2011). Les propriétés de l'huile extraite divergent trop pour qu'elle puisse être utilisée telle quelle par des moteurs standards diesel. Sa viscosité est trop élevée. Par contre, les esters méthylique ou éthylique d'acides gras (ou biodiesel) possèdent des propriétés plus proches à celles du diesel et peuvent être utilisés par les moteurs diesel. Ces esters sont produits par la purification de l'huile suivie par sa transestérification avec du méthanol ou de l'éthanol des acides gras des triglycérides. Ce procédé génère des quantités importantes de glycérine (glycérol) qui doit à son tour être valorisée (Bessou et al., 2011).

La taille des unités de production est située entre 50 et 500 kt de biodiesel par an (Defossez, 2009b). Le coût de production estimé du biodiesel venant de graines d'oléagineux est modéré, entre 0,50 et 0,75 €/litre (Ballerini et al., 2006). Le coût de production estimé du biodiesel venant d'algues est important, entre 1,5 et 2,5 €/litre pour les algues cultivées dans des bassins à ciel ouvert et entre 3 et 5 €/litre pour les algues cultivées dans des photobioréacteurs (Haspeslagh, 2010).

4. Conclusions

Notre société est dépendante des énergies fossiles. La disponibilité de ces énergies fossiles est incertaine à cause de leur épuisement progressif. Le prix de ces énergies fossiles est extrêmement volatil en raison des fortes pressions sur les marchés. L'utilisation de ces énergies fossiles libère une quantité massive de gaz à effet de serre. Cela engendre des changements dangereux du climat mondial. Face à ces dangers, notre société cherche des sources alternatives afin de produire des énergies renouvelables et durables. Certaines de ces énergies sont déjà compétitives et d'autres le deviennent. Il faut néanmoins veiller à ce que le développement de ces nouvelles sources d'énergie ne soit pas délétère au niveau social (concurrence avec la production alimentaire) et environnemental (comme l'augmentation des gaz à effet de serre). Pour se diriger vers ce type d'énergie et cadrer son développement, les Etats membre de l'Union européenne ont adopté la directive sur les énergies renouvelables 2009/28/CE (Objectifs 20-20-20).

Les biomasses végétales comme le bois, les cultures fibreuses, et les résidus forestiers et agricoles représentent d'immenses ressources renouvelables et durables permettant la production d'énergie. Ces biomasses fibreuses ne sont pas destinées au marché alimentaire car elles ne sont pas transformables en denrées alimentaires et valorisables dans ce marché. Au niveau des espèces de ces biomasses fibreuses, il y a une distinction entre les espèces annuelles et pérennes. Les cultures des biomasses fibreuses sont plus bénéfiques pour l'environnement. Il faut également faire la distinction entre les espèces avec une photosynthèse en C3 et en C4. Les cultures d'espèces de type C4 offrent des rendements en biomasse per hectare plus importants. Les filières de conversion d'énergie qui conduisent aux bilans énergétiques les plus avantageux sont celles qui valorisent la plus grande partie de la matière organique (y compris la valorisation des co/sous-produits) ; c'est-à-dire la source d'énergie contenue dans la biomasse. La nature du biocombustible produit peut aussi être importante, notamment en regard de son mode de consommation. Les biocombustibles solides et gazeux sont plutôt destinés à être convertis en énergie thermique et électrique à poste fixe. Les biocombustibles liquides sont plutôt destinés à être convertis en énergie mécanique mobile nécessaire aux véhicules de transport.

Bibliographie

Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998a. *Résidus de culture : Fanes de Topinambour*. Paris, France : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.

Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998b. *Chanvre*. Paris, France : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.

Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 1998c. *Résidus de culture : Paille de Céréales*. Paris, France : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.

Ballerini D. & Alazard-Toux N., 2006. *Les Biocarburants. Etats des lieux. Perspectives et enjeux du développement*. Paris, France : Technip. 348 p.

Bessou C., Ferchaud F., Gabrielle B. & Mary B., 2011. Biofuels, greenhouse gases and climate change. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **31**, 1-79.

Byrt C., Grof C. & Furbank R., 2011. C4 Plants as Biofuel Feedstocks: Optimising Biomass Production and Feedstock Quality from a Lignocellulosic Perspective. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**(2), 120-135.

Braun R. 2007. Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. In: Ranalli P., eds. *Improvement of Crop Plants for Industrial End Uses*. New York, USA: Springer, 335-416.

Carpita N. & McCann M., 2000. The cell wall. In: Buchanan B., Gruissem W. & Jones R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists, 52-108.

Cadoux S., Briand S., Chabbert B., Besnard A., Félix I., Savouré M., Marsac S., Preudhomme M., Labalette F. & Boizard H., 2010. *Biomass productivity of different energy crops under French conditions: Results of the "Regix" Experimental network*. Lyon, France: 18th European Biomass Conference & Exhibition.

Cadoux S., Preudhomme M., Machet J., Mary B., Fourdinier E., Ferchaud F., Boizard H. & Gosse G., 2009. *Productivity and environmental impacts of energy crops first results of the long term experiment « biomass & environment »*. Hamburg, Germany: 17th European Biomass Conference & Exhibition.

- Cherubini F., Bird N., Cowie A., Jungmeier G., Schlamadinger B. & Woess-Gallasch S., 2009.** Energy- and greenhouse gas-based LCA of biofuel and bioenergy systems. *Resources, Conservation and Recycling* **53**, 434-447.
- Conférence des Nations Unies sur le commerce et le développement, 2012.** Coup d'œil sur les produits de base. Genève, Suisse : Organisation des Nations unies.
- De Wit M. & Faaij M., 2010.** European biomass resource potential and costs. *Biomass and Bioenergy* **34**, 188-202.
- Defossez E., 2009a.** *La méthanisation*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Defossez E., 2009b.** *Les technologies de production de biocarburants de 1^{ière} génération*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Defossez E., 2009c.** *Les technologies agrocarburants de 2^e génération*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Defossez E., 2009d.** *Les technologies de combustion*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Defossez E., 2009e.** *Les technologies de gazéification*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Defossez E., 2009f.** *Les technologies de pyrolyse*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Demirbas A., 2009.** Biorefineries: Current activities and future developments. *Energy Conversion and Management* **50**, 2782-2801.
- Destain J.-P., Reuter V. & Goffart J.-P., 2010.** Les cultures intermédiaires pièges à nitrate (CIPAN) et engrais verts : protection de l'environnement et intérêt agronomique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**(S1), 73-78.
- Didderen I., Destain J., & Thonart P., 2008.** *Le bioéthanol de seconde generation. La production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Gembloux, Belgique : Presses Agronomiques de Gembloux, 128 p.
- Dohleman F., 2010.** Perennial Grasses as Second-Generation Sustainable Feedstocks Without Conflict with Food Production. In: Khanna M., Scheffran J. & Zilberman D., eds. *Handbook of Bioenergy Economics and Policy*. New York, USA : Springer, 27-37.
- ENERBIOM, 2012.** *ENERBIOM : Rapport final de projet*. Waremmme, Belgique : Province de Liège - Services agricoles.

- Escarnot E., 2012.** *Extraction and Characterization of Arabinoxylan from Spelt bran and Hemicelluloses from Spelt hull by Chemical and Enzymatical methods.* Gembloux, Belgium: Gembloux Agro Bio Tech - Ulg.
- Eurostat, 2012.** *Consommation brute d'énergie intérieure, par type de combustible.* Kirchberg, Luxembourg : Commission européenne.
- Forest Products Laboratory, 2004.** *Wood Biomass for Energy.* Madison, USA: Forest Products Laboratory.
- Galbe M., Sassner P., Wingren A. & Zacchi G., 2007.** Process Engineering Economics of Bioethanol Production. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **108**, 303-327.
- Ghyssels F., Godin B., Flamin C., Delfosse P., Delcarte J. & Stilmant D., 2010.** Valorisation énergétique des fourrages : comparaison de trois filières, enjeux et opportunités. *Fourrages* **203**, 163-173.
- Grabber J., 2005.** How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability ? *Crop Sci.*, **45**, 820.
- Hamelinck C., van Hooijdonk G. & Faaij A., 2005.** Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, **28**, 384-410.
- Hamelinck C., 2004.** *Outlook for advanced biofuels.* Utrecht, Pays-Bas : Universiteit Utrecht.
- Haspeslagh L., (2010).** *Aquatic phototrophs for the production of fuels and green chemicals.* European Biofuels Technology Platform, 3rd stakeholder Plenary meeting. *Developing the contribution of sustainable biofuels to European 2020 targets.* Brussels, Belgium: EBPT.
- Hopquin J.-P., 2011.** *Cultures biomasse. Evaluation des impacts et potentialités en Picardie.* Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Hoogwijk M., Faaij A., van den Broek R., Berndes G., Gielen D. & Turkenburg W., 2003.** Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass and Bioenergy* **25**, 119-133.
- Kamm B. & Kamm M., 2004.** Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 137-145.
- Kamm B. & Kamm M., 2007.** Biorefineries – Multi Product Processes. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **105**, 175-204.

- Lindh T., Paappanen T., Rinne S., Sivonen K. & Wihersaaric M., 2009.** Reed canary grass transportation costs – Reducing costs and increasing feasible transportation distances. *Biomass and Bioenergy* **33**, 209-212.
- McKendry P., 2002.** Energy production from biomass (part 1): conversion technologies, *Bioresource Technol.* **83**, 37.
- Morris D. 2006.** *Putting the Pieces Together: Commercializing Ethanol from Cellulose*. Washington, D.C., USA: Institute for Local Self-Reliance.
- Penmetsa K & Steele P. 2011.** *Production of Torrefied Pellets with Natural Biomass Compounds*. Mississippi State University, USA: Mississippi State University.
- Pfromm P., Amanor-Boadu V., Nelson R., Vadlani P. & Madl R., 2010.** Bio-butanol vs. bio-ethanol: A technical and economic assessment for corn and switchgrass fermented by yeast or *Clostridium acetobutylicum*. *Biomasse and Bioenergy* **34**, 515-524.
- Rapier R. 2012.** *Current and Projected Costs for Biofuels from Algae and Pyrolysis*. Lansing, USA: Consumer Energy Report.
- Rettenmaier N., Köppen S., Gärtner S. & Reinhardt G., 2010.** Life cycle assessment of selected future energy crops for Europe. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **4**, 620-636.
- RMT Biomasse, 2009a.** *Le Miscanthus*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- RMT Biomasse, 2009b.** *Le Switchgrass*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- RMT Biomasse, 2009c.** *La Fétuque*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- RMT Biomasse, 2009d.** *Le Sorgho*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Schenkel Y. & Benabdallah B., 2005.** *Guide biomasse énergie*. Quebec, Canada : IEPF.
- Schmit T., 2011.** *Production agricole durable de biomasse-énergie en zones à fortes contraintes environnementales : « Quelles alternatives pour quelles filières ? »*. *Partie phytotechnie*. Gembloux, Belgique : Centre wallon de Recherches agronomiques.

Shelly J. 2010. *Biomass Conversion to Electricity: Stand Alone Power Plants, Co-Generation, and Combined Heat and Power (CHP)*. Berkeley, USA: University of California.

van der Drift A., de Kant H. & Rajani J., 2000. *Commercialisation Bivkin-based Gasification Technology*. Petten, Netherlands: ECN Biomass

van Ree R., van der Drift A., Zwart R. & Boerrigter H., 2005. *Market competitive Fischer-Tropsch diesel production*. Petten, Netherlands: ECN Biomass

United Nations Development Programme, 2000. *World Energy Assessment: Energy and the challenge of sustainability*. New York, USA: United Nations.

Union européenne, 2009. Directive 2009/28/CE du parlement européen et du conseil du 23 avril 2009 relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables. *J. officiel de l'Union européenne*, **L 140**, 16-62.

Wright M., Satrio J., Brown R., Daugaard D. & Hsu D., 2010. *Techno-Economic Analysis of Biomass Fast Pyrolysis to Transportation Fuels*. Golden, USA: National Renewable Energy Laboratory.

Annexe

Tableau A1. Récapitulatif des caractéristiques agronomiques de différentes cultures de biomasses fibreuses (Adapté d'ENERBIOM, 2012)

Culture	Monocotylée / Dicotylée	C3 / C4	Annuelle / Pérenne	Récolte	Intrants	Avantages	Inconvénients
Miscanthus giganteus	Monocotylée	C4	Pérenne 15 à 20 ans	1 fois par an Fin d'hiver	- Faible fertilisation azotée - Désherbage les premières années	- Rendements en biomasse élevés - Faible besoin en intrants si récolté sec - S'adapte à de nombreux sols - Simplicité de conduite une fois en pleine production - Stérile et non invasif	- Implantation onéreuse et délicate - Planteuse spécifique nécessaire - 3 à 5 ans avant l'entrée en pleine production - Exigeante en température - Sensible au stress hydrique de juin à septembre - Récolte d'hiver en sec non adaptée à la digestion anaérobie
Panic érigé	Monocotylée	C4	Pérenne 15 à 20 ans	1 fois par an Fin d'hiver	- Faible fertilisation azotée - Désherbage les premières années	- Rendements en biomasse élevés - Faible besoin en intrants si récolté sec - S'adapte à de nombreux sols et climats - Simplicité de conduite une fois en pleine production - Non invasif	- Implantation délicate - 2 à 4 ans avant l'entrée en pleine production - Risque de verse si la densité de semis et/ou la fertilisation azotée sont élevées - Récolte d'hiver en sec non adaptée à la digestion anaérobie

Tableau A1 (Suite). Récapitulatif des caractéristiques agronomiques de différentes cultures de biomasses fibreuses (Adapté d'ENERBIOM, 2012)

Fétuque élevée	Monocotylée	C3	Pérenne 6 à 15 ans	3 fois par an	- Fertilisation azotée - Désherbage peut être nécessaire	- Phytotechnie bien connue - Implantation facile - S'adapte à de nombreux sols et climats - Possibilité d'association avec une légumineuse	- Implantation un peu lente - Récolte en vert non adaptée à la transformation thermochimique
Dactyle	Monocotylée	C3	Pérenne 6 à 10 ans	3 fois par an	- Fertilisation azotée - Désherbage peut être nécessaire	- Phytotechnie bien connue - Implantation facile - S'adapte à de nombreux sols et climats - Possibilité d'association avec une légumineuse	- Implantation un peu lente - Récolte en vert non adaptée à la transformation thermochimique
Sorgho fibre	Monocotylée	C4	Annuelle	1 fois par an Automne	- Fertilisation azotée - Désherbage nécessaire	- Rendements en biomasse élevés - Phytotechnie bien connue - Intégration aisée dans une rotation - S'adapte à de nombreux sols - Faible besoin en eau	- Risque de verse si la fertilisation azotée est élevée - Très exigeant en température - Récolte en vert non adaptée à la transformation thermochimique
Maïs fibre	Monocotylée	C4	Annuelle	1 fois par an Automne	- Fertilisation azotée - Désherbage nécessaire	- Rendements en biomasse élevés - Phytotechnie connue - S'adapte à de nombreux sols	- Besoin élevé en eau - Exigeant en température - Récolte en vert non adaptée à la transformation thermochimique

Tableau A1 (Suite). Récapitulatif des caractéristiques agronomiques de différentes cultures de biomasses fibreuses (Adapté d'ENERBIOM, 2012)

Culture	Monocotylée / Dicotylée	C3 / C4	Annuelle / Pérenne	Récolte	Intrants	Avantages	Inconvénients
Seigle immature	Monocotylée	C3	Annuelle	1 fois par an Printemps	- Fertilisation azotée - Désherbage nécessaire	- Phytotechnie bien connue - Culture rustique - S'adapte à de nombreux sols et climats - Lutte contre l'érosion hivernale des sols - Utilisation comme culture intercalaire piège à nitrates (CIPAN)	- Rendements en biomasse faibles pour la récolte au printemps - Utilisation de fongicides - Récolte en vert non adaptée à la transformation thermochimique
Paille d'épeautre	Monocotylée	C3	Annuelle	1 fois par an Eté	- Fertilisation azotée - Désherbage nécessaire	- Phytotechnie bien connue - Culture rustique - S'adapte à de nombreux sols et climats - Lutte contre l'érosion hivernale des sols	- Utilisation de fongicides et d'insecticides - Récolte en sec non adaptée à la digestion anaérobie

Tableau A1 (Suite). Récapitulatif des caractéristiques agronomiques de différentes cultures de biomasses fibreuses (Adapté d'ENERBIOM, 2012)

Topinambour	Dicotylée	C3	Pérenne 5 ans si les tubercul es ne sont pas récoltés	1 fois par an Automne	- Faible fertilisation azotée	- Phytotechnie connue - Culture rustique - S'adapte à de nombreux sols	- Exigeante en eau - Nécessite un buttage - Récolte et conservation des tubercules sont difficiles - Récolte en vert non adaptée à la transformation thermochimique
Chanvre	Dicotylée	C3	Annuelle	1 fois par an Automne	- Fertilisation azotée	- Phytotechnie connue - Nettoie et ameublir le sol - Bonne tête de rotation - S'adapte à de nombreux climats et sols sauf ceux qui sont acides - Particulièrement adapté à la valorisation comme biomatériaux	- Très résistant un broyage une fois sec - Utilisation de variétés certifiées inférieures à 0,3% THC - Extraction de l'huile des graines est nécessaire pour la rentabilité économique de cette culture

Partie 1

Chapitre 2

Hydrates de carbone et parois cellulaires des biomasses végétales

Mots-clés. Cellulose, Hémicelluloses, Pectines, Glucose, Fructose, Amidon, Fructanes

1. Introduction

Les hydrates de carbone des biomasses végétales sont séparés en deux catégories : les hydrates de carbone non structuraux comme les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides de réserves, et les hydrates de carbone structuraux (dont la dénomination plus commune de « polysaccharides structuraux » est utilisée par la suite dans ce chapitre) (Southgate, 1995 ; Carpita et al., 2000). La paroi cellulaire des plantes est constituée d'une grande diversité de ces polysaccharides structuraux. Ces polysaccharides sont divisés en différentes catégories (Carpita et al., 2000) :

- Cellulose ;
- Hémicelluloses (xyloglucane, xylane, β -glucane et mannane) ;
- Pectines (homogalacturonane, xylogalacturonane, rhamnogalacturonane type I et type II).

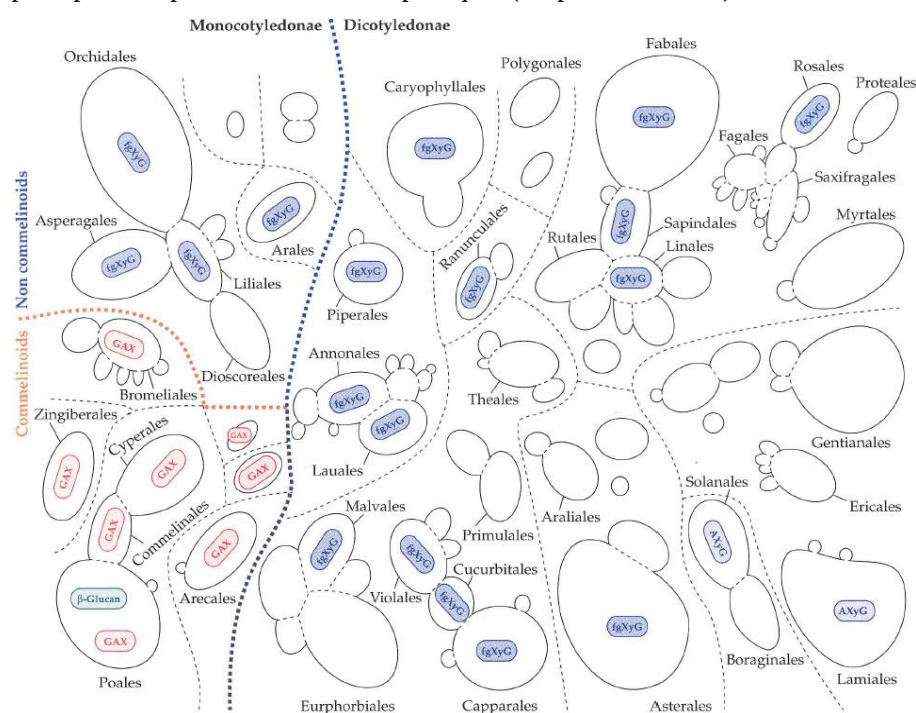
Ces composés sont liés à des protéines pariétales (polymères ramifiés constitués principalement d'acides aminés de type hydroxyproline, thréonine-hydroxyproline et glycine). Ces composés sont également liés et à des polyphénols, plus particulièrement la lignine qui est un polymère d'unités phénylpropanes tels que les alcools de type (Carpita et al., 2000 ; Grabber et al., 2005) :

- p-hydroxyphényle (dont l'alcool p-coumarylique) ;
- Syringyle (dont l'alcool synapilique) ;
- Guaiacyl (dont l'alcool coniférylique).

Les polysaccharides structuraux et la lignine sont les constituants les plus abondants dans la paroi cellulaire (Ebringerová et al., 2005).

Les angiospermes sont divisées en deux classes : les dicotylédones et les monocotylédones (Campbell, 2004 ; Figure 1). La classe des monocotylédones est à son tour divisée en deux catégories sur base de la nature des constituants structuraux de la paroi végétale (Figure 1). La catégorie des monocotylédones non-commélinoides est caractérisée par une paroi végétale constituée de polysaccharides hémicellulosiques riches en xyloglucane (fgXyG et AXyG sur la Figure 1), pauvre

en acide férulique et en acide p-coumarique liant la lignine aux hémicelluloses et aux pectines, et d'une paroi primaire riche en substances pectiques. La nature des constituants pariétaux des dicotylédones est similaire à celle des monocotylédones non-commélinoïdes. La catégorie des monocotylédones commélinoïdes est caractérisée par une paroi végétale constituée de polysaccharides hémicellulosiques riches en glucuronoarabinoxylane (GAX sur la Figure 1), riche en acide férulique et en acide p-coumarique liant la lignine aux hémicelluloses et aux pectines, et d'une paroi primaire pauvre en substances pectiques (Carpita et al., 2000).



Légende. AXyG : Arabinoxylloglucane ; fgXyG : Fucoxyloglucane ; GAX: Glucuronoarabinoxylane

Figure 1. Classement phylogénétique des familles angiospermes (Carpita et al., 2000)

2. Hydrates de carbone non structuraux

Les principaux hydrates de carbone non structuraux des biomasses végétales sont divisés en trois catégories en fonction de leur degré de polymérisation : les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides. Leurs concentrations varient d'une plante à l'autre, d'un organe de la plante à l'autre ainsi que du stade phénologique et donc des fonctions physiologiques qu'ils exercent telles que (Avigdad, 1982 ; Kandler et al., 1982 ; Jarrige et al, 1995 ; Ritsema et al., 2003) :

- La lutte contre le gel ;
- Le stockage dans les vacuoles ou les plastes ;
- Le transport d'un organe à un autre.

2.1. Monosaccharides

Les monosaccharides libres présents dans les biomasses végétales sont majoritairement l' α -D-glucose et le β -D-fructose. Ils sont hydrosolubles à pH neutre et solubles dans l'alcool aqueux comme l'éthanol 80% (v/v) (Southgate, 1995). Ils résultent principalement de la photosynthèse ou alors de l'hydrolyse de polysaccharides de réserve tels que l'amidon, les fructooligosaccharides ou les polyfructanes. S'ils ont été initialement synthétisés par la photosynthèse alors soit ils sont :

- Consommés par la cellule ;
- Stockés dans la cellule ;
- Transportés sous forme de monosaccharides ou d'oligosaccharides par l'intermédiaire du phloème vers les organes puits comme les fruits et l'apex de la tige en croissance ou vers les zones de stockages.

Ensuite dans la cellule de destination, ils sont consommés ou utilisés pour la synthèse de polysaccharides de réserve tels que ceux cités ci-dessus (Kandler et al., 1982 ; Farino et al., 2006).

2.2. Oligosaccharides

Les oligosaccharides sont des hydrates de carbone hydrosolubles à pH neutre et solubles dans l'alcool aqueux à 80% comme le sont les monosaccharides (Southgate, 1995). Leur degré de polymérisation est situé entre 2 et 10 unités monosaccharidiques (Dixon, 1982). Ils servent aux fonctions suivantes (Avigdad, 1982 ; Kandler et al., 1982 ; Jarrige et al., 1995 ; Ritsema et al., 2003) :

- Transport des hydrates de carbone ;
- Stockage dans des vacuoles ;
- Synthèse des polysaccharides de réserve ;
- Croissance ;
- Germination ;
- Protéger les plantes contre des stress abiotiques comme le gel.

Cette catégorie d'hydrate de carbone est essentiellement formée par le saccharose, les fructooligosaccharides et les α -galactooligosaccharides dans les biomasses végétales (Avigdad, 1982 ; Kandler et al., 1982).

Saccharose

Le saccharose ou α -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranoside est un disaccharide omniprésent dans les végétaux. Il résulte soit de la formation d'une liaison osidique entre le carbone 1 d'une molécule d' α -D-glucose et le carbone 2 d'une molécule de β -D-fructose, soit de l'hydrolyse des polysaccharides de réserve comme les fructooligosaccharides et les α -galactooligosaccharides (Avigdad, 1982 ; Kandler et al., 1982).

Fructooligosaccharide

Les fructooligosaccharides sont des oligosaccharides constitués par des résidus β -D-fructofuranosyles où chaque fructooligosaccharide possède un résidu d' α -D-glucopyrosyle venant de la molécule initiale, le saccharose, à partir desquels ils ont été initialement synthétisés. Il existe quatre types de structure pour les fructooligosaccharides :

- L'inuline (Figure 2) est une chaîne linéaire composée d'un α -D-glucose terminal et d'une série de β -D-fructoses liés en β -(1-2). Si $n=0$ sur la Figure 2 alors la

molécule est appelée le 1-kestose ou isokestose et correspond au représentant le plus simple des inulines. Les inulines représentent le principal type de fructooligosaccharides présents dans les dicotylédones. Dans les monocotylédones, cette catégorie est rarement observée. Les espèces des ordres suivants peuvent contenir de l'inuline : Astérales, Ericales, Gentianales et Malpighiales (Meier et al., 1982 ; Pollock, 1986).

- La néo-inuline (Figure 3) est une chaîne linéaire composée d'un α -D-glucose non-terminal et d'une série de β -D-fructoses liés en β -(1-2) de part et d'autre du résidu d' α -D-glucose. Si $n=0$ et $m=0$ sur la Figure 3 alors la molécule est appelée le néokestose. Il correspond au représentant le plus élémentaire des néo-inulines. Cette catégorie est essentiellement retrouvée dans certaines espèces de l'ordre des Liliales (Meier et al., 1982 ; Pollock, 1986).
- La lévane ou la phlein (Figure 4) est une chaîne linéaire composée d'un α -D-glucose terminal et d'une série de β -D-fructoses liés en β -(2-6). Si $n=0$ sur la Figure 4 alors la molécule est appelée le 6-kestose ou kestose. Il correspond au représentant le plus court des lévanes. Cette catégorie est majoritairement présente dans certaines espèces de l'ordre des Asparagales, des Liliales et des Poales (Meier et al., 1982 ; Pollock, 1986).
- La graminane, la lévane mixte ou la phlein ramifiée (Figure 5) est une chaîne ramifiée composée d'un α -D-glucose terminal ou non terminal s'il est ramifié par une série de β -D-fructoses liés en β -(1-2). Deux chaînes formées de résidus de β -D-fructoses sont liées au résidu de β -D-fructose de l'unité de saccharose qui est à la base de la molécule de la graminane. Une de ces chaînes est linéaire et constituée de résidus β -D-fructoses liés en β -(1-2) et l'autre chaîne est formée de résidus β -D-fructoses liés en β -(2-6) qui peuvent être ramifiés par une chaîne linéaire de β -D-fructoses liée en β -(1-2). L'oligomère le plus simple de cette série est appelé le bifurcose. Il possède un résidu d' α -D-glucose terminal et deux résidus β -D-fructoses liés sur le résidu de β -D-fructose de l'unité de saccharose à la base de la molécule de graminane. Il correspond au représentant le plus simple des graminanes. Cette catégorie est essentiellement retrouvée dans certaines espèces de l'ordre des Asparagales, des Liliales et des Poales (Meier et al., 1982 ; Pollock, 1986 ; Ritsema et al., 2003).

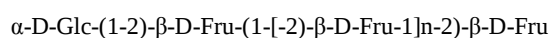


Figure 2. Inuline (Ritsema et al., 2003)

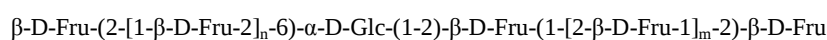


Figure 3. Néo-inuline (Ritsema et al., 2003)

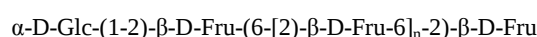


Figure 4. Lévané (Ritsema et al., 2003)

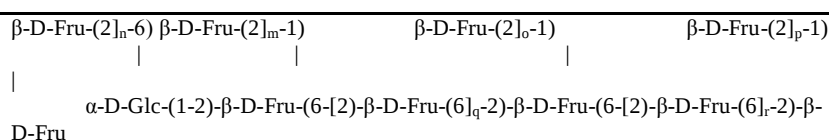


Figure 5. Structure simplifiée d'une graminane (Ritsema et al., 2003)

Ces fructooligosaccharides peuvent également être formés par l'hydrolyse d'autres fructooligosaccharides ou de polyfructanes (Le Roy et al., 2008).

α -Galactooligosaccharide

La catégorie des α -galactooligosaccharides est composée du raffinose ou α -D-galactopyranosyl-(1-6)- α -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranoside qui possède un résidu α -D-galactose alors que les autres α -galactooligosaccharides ont un nombre plus d'important de résidus α -D-galactopyranosyles dont le premier est lié au résidu α -D-glucopyranosyle d'une molécule de saccharose. Ils résultent soit de l'hydrolyse d'autres α -galactooligosaccharides, soit de la formation d'une première liaison osidique entre le carbone 1 d'une molécule d' α -D-galactose et le carbone 6 du résidu α -D-glucose d'une molécule de saccharose et, selon le type d' α -galactooligosaccharides, la présence ou non d'une série de liaisons osidiques entre le carbone 1 d'un résidu d' α -D-galactose et le carbone 6 d'un autre α -D-galactose (Ekvall et al., 2007).

2.3. Polysaccharides

La condensation de quelques dizaines à quelques milliers de monosaccharides forme des polysaccharides. Dans les biomasses végétales, les polysaccharides non structuraux sont constitués d'amidon, des polyfructanes, des mucilages et des gommages (Southgate, 1995). Le rôle de ces trois premiers polysaccharides non structuraux est celui de polysaccharides de réserve (Meier et al., 1982) alors que les gommages sont des exsudats qui protègent la plante en cas d'atteinte pathologique (Southgate, 1995).

Amidon

L'amidon est un homopolymère d' α -D-glucopyranosyle. A l'état natif, il est partiellement soluble dans l'eau à pH neutre et à température ambiante alors que dans l'eau chaude à pH neutre il est totalement solubilisé (John, 1992a). Il est composé de deux types de structure : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est une chaîne principalement linéaire constituée de résidus α -D-glucopyranosyles liés par des liaisons α -(1-4). Le degré de polymérisation varie entre 1500 et 6000 d'unités glucosyles (John, 1992a). L'amylopectine est constituée de chaînes linéaires formées par en moyenne vingt résidus α -D-glucopyranosyles liés par des liaisons α -(1-4). Ces chaînes linéaires sont reliées entre elles par des liaisons α -(1-6) entre les résidus α -D-glucopyranosyles. Le degré de polymérisation varie entre 300000 et 3 000000 d'unités glucosyles (John, 1992a). Un autre classement existe pour l'amidon en tant que fibre alimentaire pour l'Homme. Celui-ci est constitué de deux catégories :

- L'amidon non résistant qui est digestible dans l'intestin grêle humain ;
- L'amidon résistant qui est indigestible dans l'intestin grêle humain.

Cette dernière catégorie est divisée en trois classes (Asp, 1995 ; McCleary et al., 2002):

- L'amidon résistant de type 1 (RS1) qui est inaccessible physiquement à l' α -amylase pancréatique ;
- L'amidon résistant de type 2 (RS2) qui est non gélatinisé et fortement résistant à l'hydrolyse par l' α -amylase pancréatique ;

- L'amidon résistant de type 3 (RS3) qui est gélatinisé et fortement résistant à l'hydrolyse par l' α -amylase pancréatique. Ce dernier peut être solubilisé par du KOH ou du diméthylsulfoxyde (DMSO).

Polyfructane

Les polyfructanes sont des polysaccharides formés par de résidus β -D-fructofuranoyles identiques et classés de la même manière que les fructooligosaccharides. La caractéristique qui les différencie est leur degré de polymérisation. Pour les fructooligosaccharides, il est de 3 à 10 alors que pour les polyfructanes il est supérieur à 10 (John, 1992b). Pour les inulines, le degré de polymérisation d'unités de β -D-fructoses peut aller jusqu'à 50 alors que pour les lévanes et les graminanes, il peut atteindre 250 (John, 1992b ; Ritsema et al., 2003). Le degré de polymérisation important des polyfructanes les rend peu solubles dans l'eau à pH neutre et à 10°C, largement solubles dans l'alcool aqueux à 80% (v/v) et complètement solubles dans l'eau chaude à pH neutre (Hoebregs et al., 1997).

Mucilage et gomme

Les mucilages et les gommes sont des polysaccharides hétérogènes fortement ramifiés et de haut poids moléculaire. Ils sont majoritairement hydrosolubles à pH neutre. Les principaux monomères de ces polysaccharides sont le α -L-arabinose, le β -D-galactose, l'acide α -D-galacturonique, le α -L-rhamnose et le α -D-xylose. S'ils contiennent des acides uroniques alors ils sont qualifiés « d'acide » ou sinon ils sont qualifiés « de neutre » (Southgate, 1995 ; Medina-Torres et al., 2000).

3. Hydrates de carbone structuraux

La cellule végétale des plantes est entourée par une paroi cellulaire qui lui apporte (Meier et al., 1982 ; Gamauf et al., 2007) :

- De la rigidité structurale et mécanique ;
- Contrebalance la pression osmotique ;
- Détermine la direction de croissance, l'architecture et la forme de la plante.
- Protège contre les pathogènes.

Les hydrates de carbone structuraux peuvent également être utilisés comme des polysaccharides de réserve si cette situation s'avère nécessaire et s'ils ont rempli

leur rôle structural. Les composants polysaccharidiques structuraux prédominants de la paroi végétale sont la cellulose, les hémicelluloses et les pectines (Meier et al., 1982 ; Gamauf et al., 2007).

3.1. Structure des parois végétales

La paroi végétale est divisée en trois régions qui, en partant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, sont les suivantes (Gamauf et al., 2007) (Figure 6) :

- La lamelle mitoyenne ;
- La paroi primaire ;
- La paroi secondaire.

La lamelle mitoyenne est une fine couche constituée essentiellement de pectines et de lignine (Argyropoulos et al., 1997 ; Carpita et al., 2000). Les parois primaires sont constituées de fines couches de polymères structuraux. Les parois secondaires sont constituées de couches épaisses de polymères structuraux. Ces deux types de parois sont principalement composées de :

- Cellulose ;
- Hémicelluloses (xylane, xyloglucane, β -glucane et mannane) ;
- Pectines (homogalacturonane, xylogalacturonane, rhamnogalacturonane type I et type II) ;
- Protéines pariétales (polymères ramifiés constitués principalement d'acides aminés de type hydroxyproline, thréonine-hydroxyproline et glycine) ;
- Polyphénols, plus particulièrement la lignine qui est un polymère d'unités phénylpropanes tels que les alcools de type p-hydroxyphényle (dont l'alcool p-coumarylique), syringyle (dont l'alcool synapilique) et guaïacyle (dont l'alcool coniférylique) (Figure 7).

Pour former la lignine, ces unités sont polymérisées par des peroxydases et des laccases. Ces unités sont associées entre elles principalement par des liaisons de type éther, ester et carbone-carbone (Carpita et al., 2000). La paroi végétale est en moyenne constituée entre 25 à 40% de cellulose, entre 10 et 30% d'hémicelluloses, entre 5 à 15% de lignine et entre 5 à 10% de protéines structurales (Carpita et al., 2000 ; Grabber et al., 2005 ; Vermerris, 2008).

Les constituants structuraux de la paroi végétale interagissent entre eux et forment trois types de réseaux imbriqués l'un dans l'autre.

Le premier réseau est le plus fondamental, il correspond à celui des hémicelluloses et des microfibrilles de cellulose. La majorité des interactions présentes dans celui-ci sont de type liaison hydrogène et interaction de Van der Waals, et déterminent la rigidité de ce réseau (Carpita et al., 2000 ; Grabber et al., 2005). Ces interactions des xylandes et des xyloglucanes avec la cellulose sont inhibées par les éventuelles ramifications des chaînes linéaires et les O-acétylations de ces deux types d'hémicelluloses (Vincken et al., 1995 ; Kabel et al., 2007).

Le deuxième réseau est constitué de pectines encerclant le premier réseau. Il n'existe pas dans les parois secondaires. Les pectines interagissent entre elles et avec les autres réseaux par des ponts calciques et des liaisons covalentes. Les espacements entre les ponts calciques définissent la porosité de la paroi végétale (Carpita et al., 2000 ; Ridley et al., 2001). Le degré d'estérification de la fonction carboxylique des résidus d'acide α -D-galacturonique des pectines déterminent la charge à la surface de la paroi végétale (Carpita et al., 2000 ; Ridley et al., 2001).

Le troisième réseau est formé de protéines pariétales et de lignine. Ces composés se lient avec les deux autres réseaux. La lignine se lie aux polysaccharides structuraux soit par des liaisons (Carpita et al., 2000 ; Grabber, 2005 ; Alvira et al., 2010) :

- Benzyles, éthers ou esters ;
- Ethers ou esters (par exemple avec les résidus arabinoses des glucuronoarabinoxylanes) par l'intermédiaire d'un résidu férulate ou p-coumarate (Figure 8).

La lignine interagit également avec les groupements acétyles des polysaccharides structuraux (Carpita et al., 2000 ; Grabber, 2005 ; Alvira et al., 2010). Le troisième réseau apporte de la rigidité aux parois végétales, bloque l'élongation cellulaire et inhibe l'attaque de microorganismes. Il est différent dans la paroi primaire et secondaire. Dans la paroi primaire, la lignine (principalement composée d'alcool guaïacyle et d'alcool p-hydroxyphényle) et les protéines pariétales sont présentes (Higuchi, 1982 ; Carpita et al., 2000 ; Grabber, 2005). Dans la paroi secondaire, seule la lignine (principalement composée d'alcool guaïacyle et d'alcool syringyle) forme ce réseau (Higuchi, 1982 ; Carpita et al., 2000 ; Grabber, 2005).

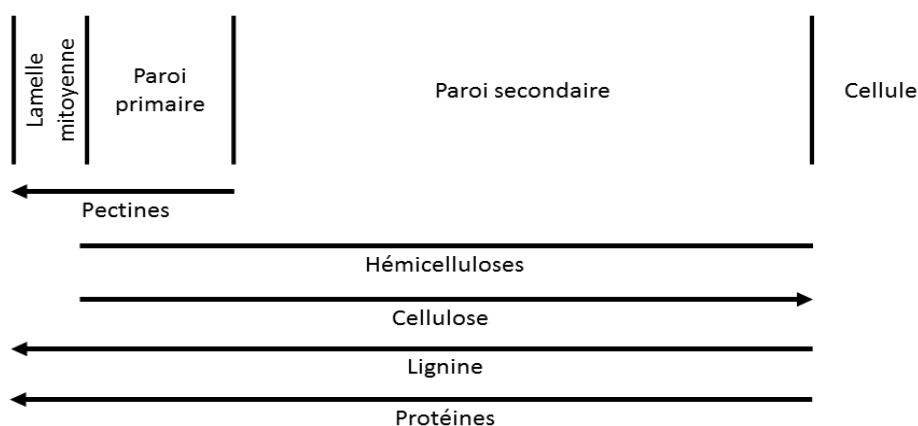


Figure 6. Répartition des différentes classes de polymères structuraux dans la paroi végétale (Les flèches correspondent au gradient croissant de concentration)

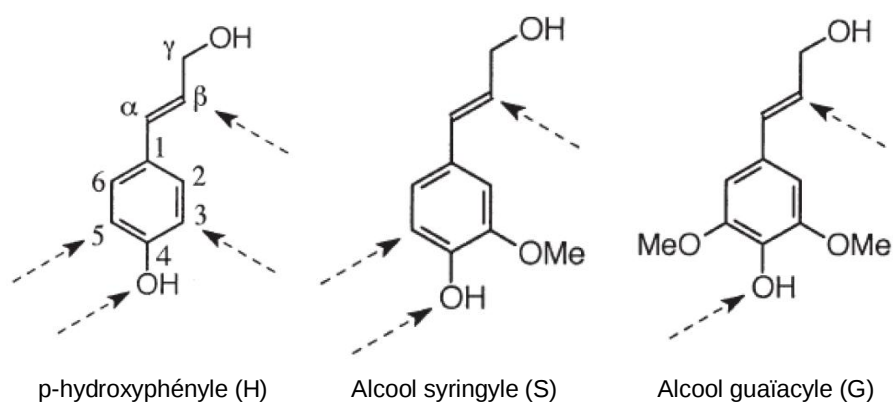


Figure 7. Les 3 monomères constitutifs de la lignine

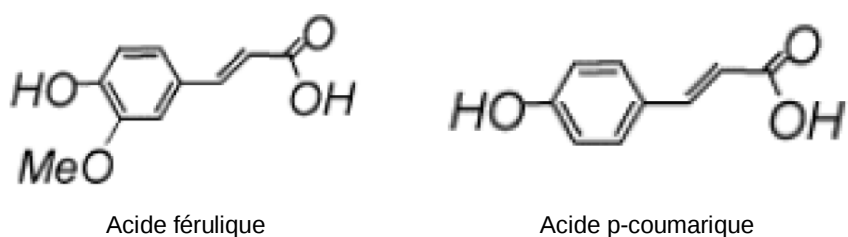


Figure 8. Acide férulique et acide p-coumarique

Les parois primaires et secondaires sont divisées en deux types en fonction de l'origine phylogénétique de l'espèce végétale. La composition et la nature des constituants structuraux y sont significativement différentes (Carpita et al., 2000) (Tableau 1 ; Figure 1 et 9).

Le type I est constitué des angiospermes non-commélinoides (dicotylédones et monocotylédones non-commélinoides). Cette catégorie contient tous les ordres des angiospermes à l'exception de ceux faisant parties des angiospermes commélinoides, à savoir : Arécales, Commélinales, Cypéales, Poales et Zingibérales (Carpita et al., 2000). Dans la paroi primaire du type I, les microfibrilles de cellulose interagissent avec les xyloglucanes (XyG). Généralement ce sont des fucogalacto-XyG, sauf dans les ordres des Lamiales et des Solanales où ce sont des arabino-XyG. Dans la paroi primaire du type I, les pectines forment un réseau dense. La lignine y est faiblement présente contrairement aux protéines pariétales de type p-hydroxyproline. Dans la paroi secondaire de type I et II par rapport à leur paroi primaire, la cellulose a un degré de polymérisation plus importante et les couches de microfibrilles y sont alignées parallèlement. Celles-ci interagissent avec des xylanes de type glucuronoarabinoxylane (GAX) spécifiques à la paroi de type I. Les pectines et les protéines pariétales sont absentes de la paroi secondaire (Carpita et al., 2000 ; Gamauf et al., 2007).

Le type II est formé des angiospermes commélinoides (monocotylédones commélinoides). Dans cette catégorie, les ordres suivants sont présents : Arécales, Commélinales, Cypéales, Poales et Zingibérales (Carpita et al., 2000). Dans la paroi primaire du type II, les microfibrilles de cellulose interagissent avec des XyG présents en très faibles quantités par rapport aux xylanes de type glucuronoarabinoxylane (GAX). Dans les espèces végétales appartenant à l'ordre des Poales, les β -glucanes sont également présents. Dans ce type de paroi primaire, les pectines et les protéines pariétales sont très faiblement présentes contrairement au dense réseau de lignine. Ce dernier possède des liaisons esters et/ou éthers avec l'acide p-coumarique et l'acide férulique. L'acide p-coumarique et l'acide férulique sont liés à certains résidus d' α -L-arabinose des GAX, de β -D-galactose des XyG, de β -D-galactose des pectines ou d' α -L-arabinose des pectines. Les acides féruliques peuvent également se lier entre eux. Les protéines pariétales sont des polymères ramifiés constitués principalement d'acides aminés de type hydroxyproline,

thréonine-hydroxyproline et glycine. Le réseau de lignine y joue les rôles des pectines et des protéines pariétales de la paroi primaire de type I du fait de la faible teneur de ces deux types de composés dans cette paroi. Pour la paroi secondaire du type II, ce qui la différencie de la paroi secondaire du type I est la nature et la structure des GAX (Carpita et al., 2000 ; Allerdings et al., 2006 ; Gamauf et al., 2007 ; Vogel, 2008).

Comparaison des constituants pariétaux des cellules végétales entre les angiospermes commélinoides et les angiospermes non-commélinoides

	Angiospermes non-commélinoides	Angiospermes commélinoides
Type de paroi	I	II
Cellulose et hémicelluloses	Structure de microfibrilles de cellulose attachées par des fucoxyloglucanes (Fucogalacto-XgG). Cet ensemble est imprégné de pectines, de protéines et de lignine dans la paroi primaire.	Structure de microfibrilles de cellulose attachées par des glucuronoarabionoxylanes (GAX), des (1→3),(1→4)-β-D-glucanes (principalement dans l'ordre des Poales), xyloglucanes (XyG) et des glucomannes. Ces trois derniers constituants sont présents en moindre proportions que les GAX. Cet ensemble est imprégné de lignine, de protéines et de pectines dans la paroi primaire.
Pectines	Réseau dense constitué de rhamnogalactorunanes présent dans la paroi primaire. Elles sont les constituantes essentielles de la lamelle mitoyenne.	Réseau constitué de très peu de rhamnogalacturonanes quasiment inexistant dans la paroi primaire. Elles sont les constituantes essentielles de la lamelle mitoyenne.
Lignine	Faiblement présente dans la paroi primaire mais fortement présente dans la paroi secondaire. Elle est liée aux fucoxyloglucanes (Fucogalacto-XgG). Elle est également présente dans la lamelle mitoyenne.	Réseau dense présent dans la paroi primaire et secondaire. Il est riche en acide p-coumarique et en acide férulique. Ils sont liés aux glucuronoarabionoxylanes (GAX). Elle est également faiblement présente dans la lamelle mitoyenne.
Protéines	Réseau protéique présent dans la paroi primaire et composé d'extensine	Réseau quasi inexistant dans la paroi primaire contenant de la thréonine et de l'hydroxyproline

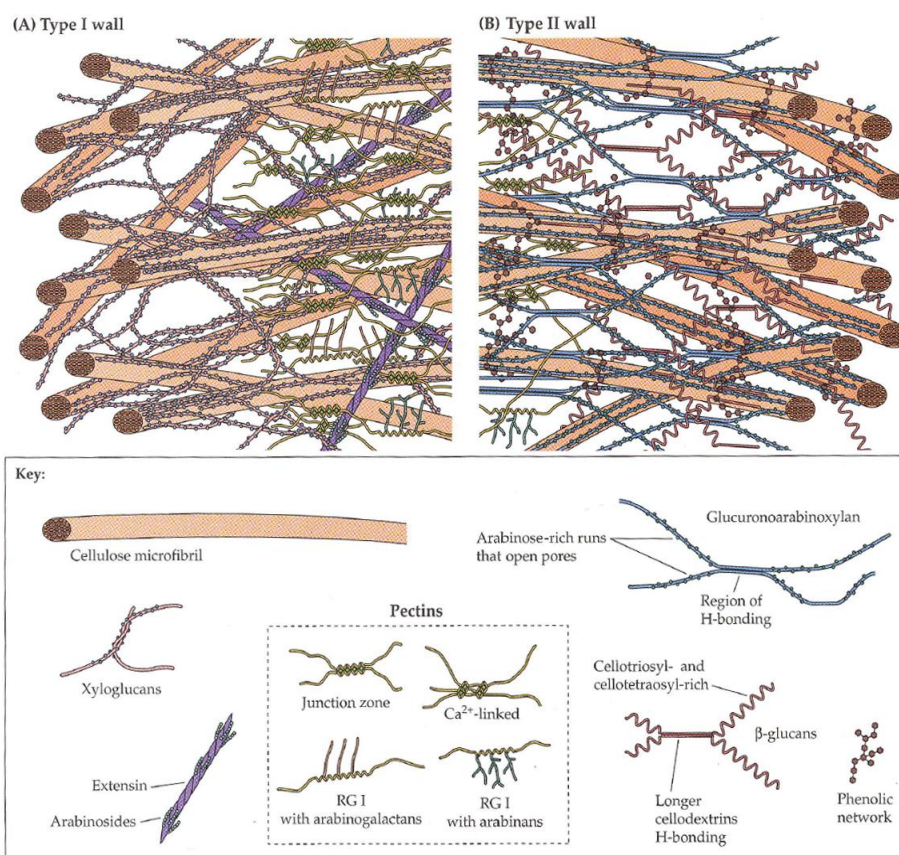


Figure 9. Comparaison des constituants pariétaux des cellules végétales entre les angiospermes commélinoides et les angiospermes non-commélinoides (Carpita et al., 2000)

3.2. Polysaccharides structuraux des parois végétales

La cellulose, les hémicelluloses (xyloglucane, xylane, β -glucane et mannane), les pectines (homogalacturonanes, xylogalacturonane, rhamnogalacturonane type I et type II) et la lignine sont les principaux composants polysaccharidiques structuraux des biomasses végétales. Il existe une diversité extrêmement importante au sein des polysaccharides structuraux venant de leur structure et de leur composition en monosaccharides.

Cellulose

La cellulose (Figure 10) est le polymère le plus abondant dans les biomasses végétales. Elle représente de 15 à 30% des constituants pariétaux de la paroi primaire et de 50 à 60% des constituants pariétaux de la paroi secondaire. La cellulose représente en moyenne de 30 à 40% des constituants pariétaux. La cellulose est sous forme de microfibrilles paracristallines contenant plusieurs milliers de chaînes linéaires constituées de plusieurs milliers de résidus β -D-glucopyranosyles. Ces résidus sont connectés entre eux par des liaisons β -(1-4). Toutes ces chaînes sont disposées parallèlement dans une microfibrille. Elles sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes (Carpita et al., 2000 ; Vermerris, 2008). Les chaînes de cellulose cristalline des biomasses végétales sont de type I β . Elles se trouvent sous forme monoclinique (Zugenmaier, 2008). La cellulose native est insoluble dans l'eau à pH neutre (Southgate, 1995).

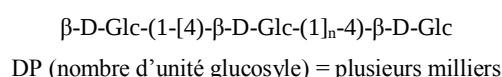


Figure 10. Cellulose (Carpita et al., 2000)

Hémicelluloses

Les hémicelluloses se démarquent par leur abondance dans la paroi cellulaire après la cellulose. Elles ont un degré de polymérisation plus faible que la cellulose (Lundqvist et al., 2002). Les hémicelluloses représentent en moyenne de 15 à 35% des constituants pariétaux. En se basant sur la structure et sur le ou les monomères principaux, les hémicelluloses ont été divisées en quatre catégories qui sont les suivantes (Carpita et al., 2000 ; Ebringerová et al., 2005 ; Vermerris, 2008) :

- Xylane ;
- Xyloglucane ;
- β -glucane ;
- Mannane.

Xylane

Les xylanes sont des polysaccharides hétérogènes ramifiés avec une longue chaîne de base. Cette chaîne est constituée de résidus β -D-xylopyranosyles connectés entre eux par des liaisons β -(1-4). Elle est ramifiée par des résidus qui sont principalement l' α -L-arabinose, l'acide α -D-glucuronique et l'acide α -D-4-O-méthylglucuronique. Ces polysaccharides sont appelés les glucuronoarabinoxylanes (GAX). Ils sont le principal type d'hémicelluloses dans les angiospermes commélinoides (de 20 à 25% des constituants pariétaux). Par contre, dans les angiospermes non-commélinoides, les GAX sont moins présents (moins de 5% des constituants pariétaux). Pour les GAX des angiospermes commélinoides (Figure 11), les résidus α -L-arabinofuranosyles sont toujours liés en position O-3 des résidus β -D-xylopyranosyles de la chaîne principale. Par contre, dans les angiospermes non-commélinoides (Figure 12), les résidus α -L-arabinofuranosyles sont principalement liés en position O-2 des résidus β -D-xylopyranosyles de la chaîne principale. Les résidus α -L-arabinofuranosyles peuvent également être liés en position O-3. Les résidus d'acide α -D-glucuropyranosyle et d'acide α -D-4-O-méthylglucuropyranosyle sont toujours liés en position O-2 de la chaîne principale (Carpita et McCann, 2000 ; Vermerris, 2008). Certains GAX sont hydrosolubles à pH neutre alors que d'autres ne le sont pas car ils sont liés à la lignine (Southgate 1995).

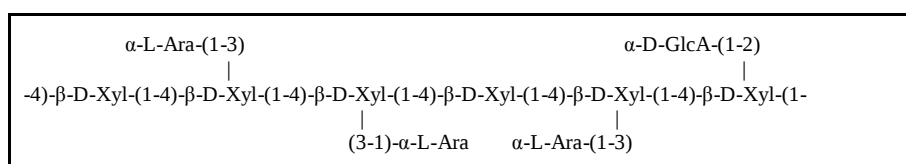


Figure 11. Glucuronoarabinoxylane de type angiosperme commélinoïde (Carpita et al., 2000)

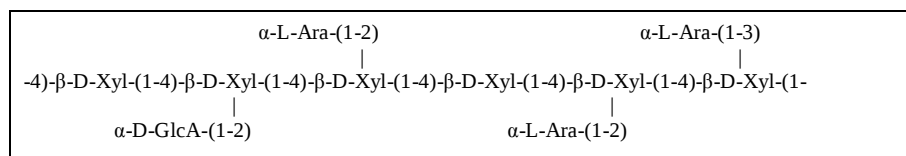


Figure 12. Glucuronoarabinoxylane de type angiosperme non-commélinoïde (Carpita et al., 2000)

Xyloglucane

Les xyloglucanes sont des polysaccharides hétérogènes ramifiés avec une longue chaîne de base. Cette chaîne est constituée de résidus β -D-glucopyranosyles connectés entre eux par des liaisons β -(1-4). Elle est principalement substituée par des résidus α -D-xylopyranosyles liés sur certaines positions O-6. Ces polysaccharides structuraux sont appelés des xyloglucanes (XyG). Ils sont le principal type d'hémicelluloses dans les angiospermes non-commélinoides (entre 20 et 25% des constituants pariétaux de la paroi primaire). Par contre, dans les angiospermes commélinoides, ils sont moins présents (entre 2 et 5% des constituants pariétaux de la paroi primaire) (Figure 13). Les XyG des angiospermes non-commélinoides sont substitués sur certaines positions O-6 des résidus de la chaîne principale par un trimère d' α -L-fucopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-2)- α -D-xylopyranosyl-(1- (Figure 14). Dans les ordres des Lamiales et des Solanales, ce trimère est absent et remplacé par un dimère d' α -L-arabinofuranosyl-(1-2)- α -D-xylopyranosyl-(1- (Figure 15) (Carpita et al., 2000 ; Ebringerová et al., 2005). Les XyG sont insolubles dans l'eau à pH neutre (Southgate, 1995).

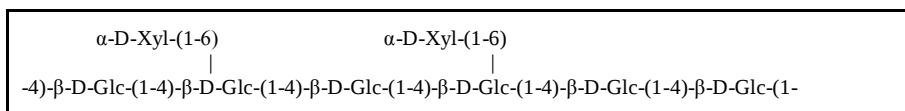


Figure 13. Xyloglucane (Carpita et al., 2000)

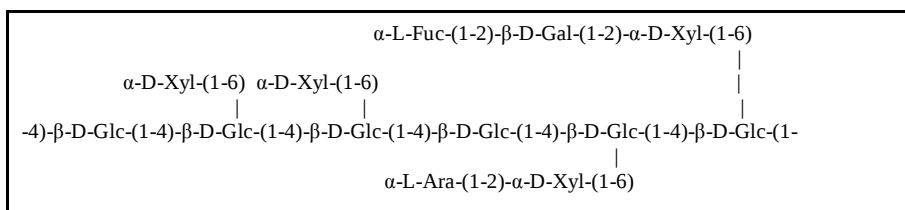


Figure 14. Fucogalactoxyloglucane (Carpita et al., 2000)

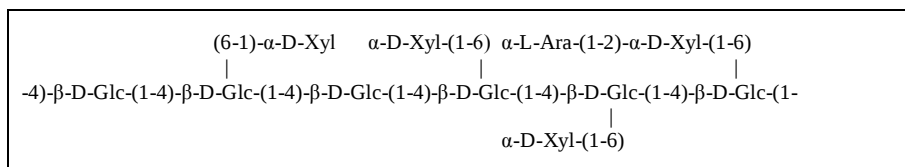


Figure 15. Arabinoxylglucane (Carpita et al., 2000)

Les β -glucanes (Figure 16) sont des polysaccharides homogènes non ramifiés en forme de spirale. Ils sont constitués d'unités de cellotriosyle et de cellotétraosyle dans un rapport 2:1. Ces unités sont connectées entre elles par des liaisons β -(1-3). Ces polymères se trouvent uniquement dans l'ordre des Poales où ils sont un type mineur d'hémicelluloses (Carpita et McCann, 2000 ; Ebringerová et al., 2005). Les β -glucanes sont généralement hydrosolubles à pH neutre (Southgate, 1995).

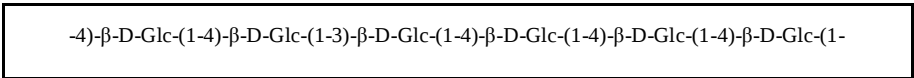


Figure 16. β -glucane (Carpita et al., 2000)

Les mannanes sont des polysaccharides hétérogènes ramifiés divisés en deux catégories : les galactomannanes (Figure 17) et les galactoglucomannanes (Figure 18). Les galactomannanes ont des chaînes principales constituées de résidus β -D-mannopyranosyles connectés entre eux par des liaisons β -(1-4). Certains de ces résidus sont substitués en position O-6 par des résidus α -D-galactopyranosyles. Les galactoglucomannanes sont constitués de tétramères de résidus β -D-glucopyranosyles liés à des tétramères de résidus β -D-mannopyranosyles. Tous les résidus y sont connectés par des liaisons β -(1-4). Certains de ces résidus β -D-mannopyranosyles sont substitués en position O-6 par des résidus α -D-galactopyranosyles. Les mannanes sont un type mineur d'hémicelluloses des monocotylédones et des dicotylédones (Carpita et McCann, 2000 ; Ebringerová et al., 2005). Par contre, les mannanes sont un type majeur d'hémicelluloses des gymnospermes. (Carpita et McCann, 2000 ; Ebringerová et al., 2005). Les mannanes ramifiées sont hydrosolubles à pH neutre si le degré de ramification est assez élevé ou sinon ils ne le sont pas (Southgate, 1995).

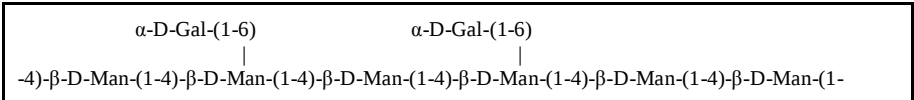


Figure 17. Galactomannane (Carpita et al., 2000)

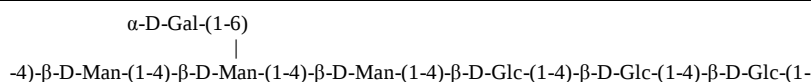


Figure 18. Galactoglucomannane (Carpita et al., 2000)

Pectines

Les pectines sont les polysaccharides structuraux les plus complexes de la paroi végétale. Elles représentent de 20 à 35% des constituants de la paroi primaire dans les angiospermes non-commélinoides et de 2 à 10% dans celles des angiospermes commélinoides. Les pectines sont divisées en cinq catégories qui sont les suivantes (Mohnen, 2008) :

- Homogalacturonanes ;
- Xylogalacturonanes ;
- Apiogalacturonanes ;
- Rhamnogalacturonanes de type I ;
- Rhamnogalacturonanes de type II.

Elles sont généralement hydrosolubles à pH neutre en présence d'agent chélatant (Southgate, 1995). Notons que les pectines sont chargées positivement dans les organes différenciés (Mohnen, 2008).

Homogalacturonane

Les homogalacturonanes (Figure 19) sont des polysaccharides homogènes linéaires. Ils sont constitués de résidus d'acide α -D-galacturonique connectés entre eux par des liaisons α -(1-4). Ces résidus peuvent être estérifiés par un groupement méthyle au niveau de groupement carboxylique et/ou O-acétylés en position O-2 ou O-3. La catégorie des homogalacturonanes représente environ 65% des pectines (Mohnen, 2008).

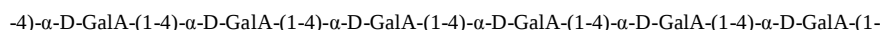


Figure 19. Homogalacturonane (Mohnen, 2008)

Xylogalacturonane

Les xylogalacturonanes (Figure 20) sont des polysaccharides hétérogènes ramifiés. Ils sont formés d'une chaîne principale avec des résidus d'acide α -D-galacturonique. Ces résidus sont connectés entre eux par des liaisons α -(1-4). Certains de ces résidus sont substitués en O-3 par un résidu β -D-xylopyranosyle-(1- ou par un dimère β -D-xylopyranosyle-(1-4)- β -D-xylopyranosyle-(1-. Les xylogalacturonanes sont une catégorie mineure de pectines (Mohnen, 2008).

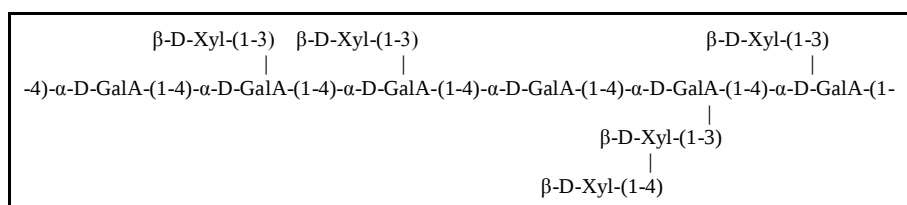


Figure 20. Xylogalacturonane (Mohnen, 2008)

Apiogalacturonane

Les apiogalacturonanes (Figure 21) sont des polysaccharides hétérogènes ramifiés. Ils sont constitués d'une chaîne principale avec des résidus d'acide α -D-galacturonique. Ces résidus sont connectés entre eux par des liaisons α -(1-4). Certains de ces résidus sont substitués en O-2 par un résidu β -D-apiofuranosyle-(1-. Les apiogalacturonanes sont une catégorie mineure des pectines qui se trouvent dans les ordres des Alismatales et des Arales (Mohnen, 2008).

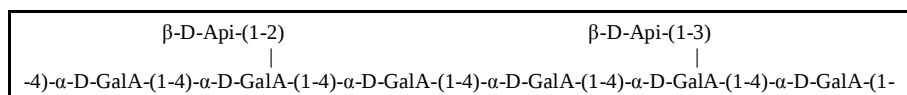


Figure 21. Apiogalacturonane (Mohnen, 2008)

Rhamnogalacturonane type I

Les rhamnogalacturonanes de type I (Figures 22, 23, 24 et 25) sont des polysaccharides hétérogènes ramifiés. Ils sont constitués d'une chaîne principale formée d'une succession de dimères de α -D-acide galacturonique-(1-2)- α -L-rhamnopyranosyle-(1-. Les résidus d' α -D-acide galacturonique peuvent être estérifiés par un groupement méthyle au niveau de groupement carboxylique et/ou O-acétylés en position O-2 ou O-3. Entre 20 à 80% des résidus de α -L-

rhamnopyranosyle sont substitués en position O-4 et, selon la nature de cette substitution, les rhamnogalacturonanes de type I sont divisée en trois catégories (Carpita et al., 2000 ; Mohnen, 2008) :

- Les arabinanes (Figure 22) dont les substituants sont des chaines secondaires formées de résidus α -L-arabinofuranosyles. Ces résidus sont connectés par des liaisons en α -(1-5) qui peuvent être ramifiées par des résidus α -L-arabinofuranosyles liés en position O-2 ou O-3 de la chaine d'arabinane (Carpita et al., 2000 ; Mohnen, 2008).
- Les galactanes (Figure 23) dont les substituants sont des chaines secondaires formées de résidus β -D-galactopyranosyles. Ces résidus sont connectés par des liaisons en β -(1-4) (Carpita et al., 2000 ; Mohnen, 2008).
- Les arabinogalactanes sont divisés en deux classes. La classe des arabinogalactanes 1 (Figure 24) qui est similaire aux galactanes, sauf que certains résidus β -D-galactopyranosyles de la chaine secondaire sont substitués en position O-3 par un résidu α -L-arabinofuranosyle. La classe des arabinogalactanes 2 (Figure 25) où les substituants des résidus α -L-rhamnopyranosyles de la chaine principale sont des chaines secondaires formées de résidus β -D-galactopyranosyles. Ces résidus sont connectés par des liaisons en β -(1-3). Des chaines tertiaires de résidus β -D-galactopyranosyles connectés par des liaisons β -(1-6) sont liées à certains résidus en position O-6 de la chaine secondaire. Ces chaines tertiaires peuvent être substituées en position O-3 par des résidus α -L-arabinofuranosyles-(1-

La catégorie des rhamnogalacturonanes de type I représente entre 20 à 35% des pectines. Les rhamnogalacturonanes de type I sont liés aux protéines structurales (Carpita et al., 2000 ; Mohnen, 2008).

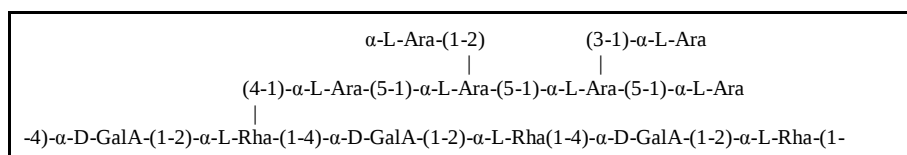


Figure 22. Rhamnogalacturonane type I (arabinane) (Mohnen, 2008)

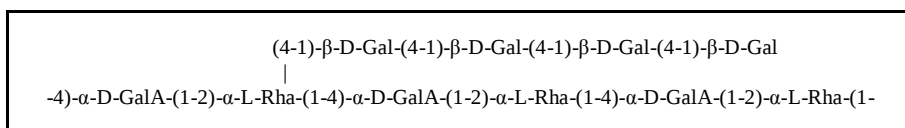


Figure 23. Rhamnogalacturonane type I (galactane) (Mohnen, 2008)

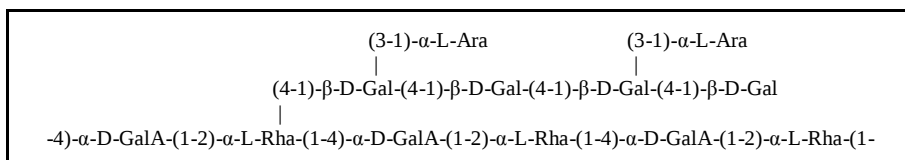


Figure 24. Rhamnogalacturonane type I (arabinogalactane 1) (Mohnen, 2008)

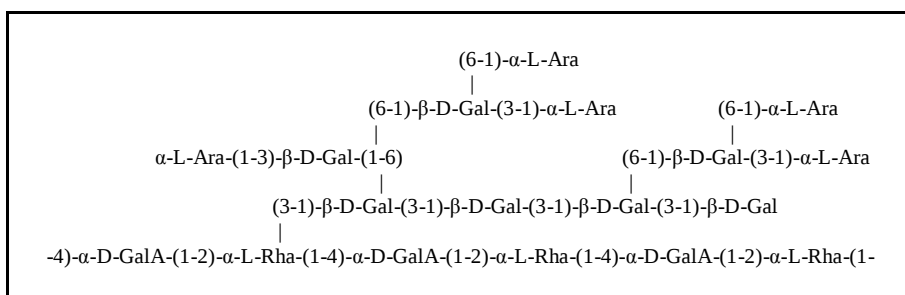


Figure 25. Rhamnogalacturonane type I (arabinogalactane 2) (Mohnen, 2008)

Rhamnogalacturonane type II

Les rhamnogalacturonanes de type II (Figure 26) sont des polysaccharides hétérogènes ramifiés. Ils sont constitués d'une chaîne principale avec des résidus d'acide α -D-galacturonique. Ces résidus sont connectés entre eux par des liaisons α -(1-4). Certains de ces résidus sont substitués par une chaîne de résidus monosaccharidiques neutres soit en position O-2 par la chaîne A ou B représentée à la Figure 24, soit O-3 par la chaîne C ou D illustrée à la Figure 24. La catégorie des rhamnogalacturonanes de type deux représente environ 10% des pectines (Mohnen, 2008).

Les rhamnogalacturonanes de type II peuvent former des dimères par l'intermédiaire de deux liaisons esters entre un ions borate et le résidu de β -D-apiose de chacune des deux chaînes de rhamnogalacturonane (Carpita et al., 2000).

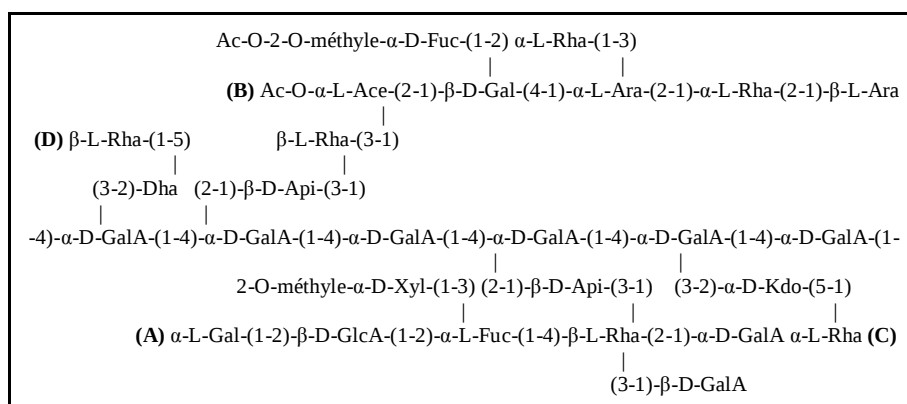


Figure 26. Rhamnogalacturonane type II (Mohnen, 2008)

4. Conclusions

Les biomasses végétales sont composées de deux catégories d'hydrates de carbone : les hydrates de carbone non structuraux et les polysaccharides structuraux.

Les hydrates de carbone non structuraux comme les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides de réserves. Ils sont facilement mobilisables par le métabolisme de la plante et ne se trouvent pas dans les parois végétales. Soit ils se trouvent sous forme d'un faible degré de polymérisation et sont directement impliqués dans le métabolisme, soit ils sont stockés sous forme d'un degré de polymérisation important et restent facilement mobilisables. Les deux principaux types d'hydrate de carbone de réserve sont l'amidon et les fructanes. La nature des fructanes présents dans une biomasse végétale dépend de la classe botanique à laquelle elle appartient. Le type de fructane présent dans les dicotylédones est l'inuline. Dans les monocotylédones, ce sont les néo-inulines, les lévanes et/ou les graminanes.

Les polysaccharides structuraux comme la cellulose, les hémicelluloses (xylane, xyloglucane, β -glucane et mannane) et les pectines (homogalacturonane, xylogalacturonane, rhamnogalacturonane type I et type II) ne sont pas facilement mobilisables par le métabolisme de la plante. Ils se trouvent dans les parois végétales. Ces polysaccharides structuraux apportent de la rigidité structurale et mécanique. Ils permettent de contrebalancer la pression osmotique et de protéger la plante contre les pathogènes. Ces polysaccharides structuraux déterminent la

direction de croissance, l'architecture et la forme de la plante. Ces polysaccharides structuraux peuvent également être utilisés comme des polysaccharides de réserve. La cellulose et les hémicelluloses sont les polymères les plus abondants dans les biomasses végétales. La cellulose est un polysaccharide de structure homogène au niveau de sa structure et de sa composition (uniquement composé de D-glucose cellulosique). Les hémicelluloses sont des polysaccharides structuraux ramifiés et hétérogènes au niveau, respectivement, de leurs structures et de leurs compositions (composés de D-xylose, de L-arabinose, de D-mannose, de D-glucose hémicellulosique et de D-galactose). La composition monosaccharidique des hémicelluloses dans une biomasse végétale dépend de la classe phylogénétique à laquelle elle appartient. La catégorie des xyloglucanes représente la majorité des hémicelluloses dans les angiospermes non-commélinoides (tels que le topinambour, le chanvre et la pomme de terre). Dans les angiospermes commélinoides (tels que le miscanthus, le maïs et la fétuque élevée) et les gymnospermes (tels que l'épicéa et le pin), les principales hémicelluloses sont, respectivement, les arabinoxylanes et les mannanes.

Bibliographie

- Allerdings E., Ralph J., Steinhart H. & Bunzel M., 2006.** Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry*, **67**, 1276-1286.
- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M. & Negro M., 2010.** Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* **101**, 4851-4861.
- Argyropoulos D. & Menachem S., 1997.** Lignin. *Adv. in Biochem. Eng./Biotechnol.*, **57**, 127-158.
- Asp N.-G., 1995.** Dietary fibre analysis - an overview. *Eur. J. of Clin. Nutr.*, **49**(Suppl. 3), S42-S47.
- Avigdad G., 1982.** Sucrose and Other Disaccharides. In: Loewus F. & Tanner W., eds. *Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates*. New York : Springer-Verlag, 217-347.

- Campbell N. & Reece J., 2004.** La diversité des végétaux II : L'évolution des plantes à graines. *In*: Campbell N. & Reece J., eds. *Biologie*. 2^e édition. Bruxelles, Belgique : De Boeck Université, 649-668.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall. *In*: Buchanan B., Gruissem W. & Jones R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA : American Society of Plant Physiologists, 52-108.
- Dixon H., 1982.** Abbreviationn therminology of oligosaccharide chains. *Pure & Appl. Chem.*, **54** (8), 1517-1522.
- Ebringerová A. Hromádková Z. & Heinze T., 2005.** Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.*, **186**, 1-67.
- Ekvall J., Stegmark R. & Nyman M., 2007.** Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. *J. of Food Composition and Anal.*, **20**, 13-18.
- Farino J., Morot-Gaudry J.-F. & Soussana J.-F., 2006.** Synthèse et exportation des glucides. *In*: Farino J., Morot-Gaudry J.-F. & Soussana J.-F., eds. *La photosynthèse : Processus physique, moléculaires et physiologique*. Paris : Inra, 279-292.
- Gamauf C., Metz B. & Seiboth B., 2007.** Degradation of Plant Cell Wall Polymers by Fungi. *In*: Kubicek C. & Druzhinina I., eds. *Environmental and Microbial Relationships*. 2nd edition. Berlin : Springer-Verlag, 325-340.
- Grabber J., 2005.** How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability ? *Crop Sci.*, **45**, 820-831.
- Higuchi T., 1982.** Biosynthesis of Lignin. *In*: Tanner W. & Loewus F., eds. *Plant Carbohydrates II. Extracellular Carbohydrates*. New York : Springer-Verlag, 194-224.
- Hoebregs H., 1997.** Fructans in Foods and Food Products, Ion-Exchange Chromatographic Method: Collaborative Study. *AOAC International J.*, **80**(5), 1029-1037.
- Jarrige R., Grenet E., Demarquilly C. & Besle J.-M., 1995.** Les constituants de l'appareil végétatif dans les plantes fourragères. *In*: Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H. & Journet M., eds. *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion*. Paris : Inra Editions, 25-82.

- John P., 1992a.** Starch. *In: John P., eds. Biosynthesis of the major crop products.* Chichester, UK : John Wiley & Sons, 32-54.
- John P., 1992b.** Fructan. *In: John P., eds. Biosynthesis of the major crop products.* Chichester, UK : John Wiley & Sons, 55-69.
- Kabel M., van den Borne H., Vincken J.-P., Voragen A. & Schols H., 2007.** Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydr. Polymers*, **69**, 94–105.
- Kandler O. & Hopf H., 1982.** Oligosaccharides Based on Sucrose (Sucrosyl Oligosaccharides). *In: Loewus F. & Tanner W., eds. Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates.* New York : Springer-Verlag, 348-383.
- Le Roy K., Lammens W., Van Laere A. & Van den Ende W., 2008.** Influencing the binding configuration of sucrose in the active sites of chicory fructan 1-exohydrolase and sugar beet fructan 6-exohydrolase. *New Phytol.*, **178**, 572–580.
- Lundqvist J., Teleman A., Junell L., Zacchi G., Dahlman O., Tjerneld F. & Stalbrand H., 2002.** Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*). *Carbohydr. Polymers*, **48**, 29-39.
- McCleary B. & Monaghan D., 2002.** Measurement of Resistant Starch. *AOAC International J.*, **85**(2), 665-675.
- Medina-Torres L., Brito-De La Fuente E., Torrestiana-Sanchez B. & Katthain R., 2000.** Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids*, **14**, 417–424.
- Meier H. & Reid J., 1982.** Reserve Polysaccharides Other Than Starch in Higher Plants. *In: Loewus F. & Tanner W., eds. Plant Carbohydrates I. Intracellular Carbohydrates.* New York : Springer-Verlag, 348-383.
- Mohnen D., 2008.** Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opinion in Plant Biol.*, **11**, 266-277.
- Pollock C., 1984.** Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytol.*, **104**, 1-24.
- Ridley B., O'Neill M. & Mohnen D., 2001.** Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. *Phytochemistry*, **57**, 929–967.
- Ritsema T. & Smeekens S., 2003.** Fructans: beneficial for plants and humans. *Curr. Opinion in Plant Biol.*, **6**, 223-230.

Smith B. & Harris P., 1999. The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique. *Biochem. Systematics and Ecol.*, **27**, 33-53.

Southgate D., 1995. *Dietary fibre analysis*, Cambridge, UK : The Royal Society of Chemistry.

Vermerris W., 2008. Composition and Biosynthesis of Lignocellulosic Biomass. In: Vermerris W., eds. *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. New York : Springer-Verlag, 89-142.

Vincken J.-P., de Keizer A., Beldman C. & Voragen A., 1995. Fractionation of Xyloglucan Fragments and Their Interaction with Cellulose. *Plant Physiol.*, **108**, 1579-1585.

Vogel J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Curr.Opinion in Plant Biol.*, **11**, 301–307.

Zugenmaier P., 2008. *Crystalline Cellulose and Derivatives : Characterization and Structures*. Berlin : Springer-Verlag, 285 pp.

Partie 1

Chapitre 3

Méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses végétales

Adapté de la publication :

Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P. A., Delcarte J., 2011. Revue sur les méthodes de caractérisation des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **15**, 165-182.

Mots-clés. Cellulose, Hémicelluloses, Pectines, Van Soest, Prosby, Polysaccharides non amylacés, Uppsala, Selvendran

1. Introduction

Les hydrates de carbone des biomasses végétales sont séparés en deux catégories : les hydrates de carbone non structuraux comme les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides de réserves, et les hydrates de carbone structuraux (dont la dénomination plus commune de « polysaccharides structuraux » est utilisée par la suite dans ce chapitre) (Southgate, 1995 ; Carpita et al., 2000). La paroi cellulaire des biomasses végétales est constituée d'une grande diversité de ces polysaccharides structuraux qui sont divisés en différentes catégories : la cellulose, les hémicelluloses (xyloglucane, xylanes, β -glucane et mannane) et les pectines (homogalacturonane, xylogalacturonane, rhamnogalacturonane type I et type II) (Carpita et al., 2000). Ces composés sont liés à des protéines pariétales (polymères ramifiés constitués principalement d'acides aminés de type hydroxyproline, thréonine-hydroxyproline et glycine). Ces composés sont également liés à des polyphénols, plus particulièrement la lignine qui est un polymère constitué d'unités phénylpropanes telles que (Carpita et al., 2000 ; Grabber et al., 2005) :

- p-hydroxyphényle (dont l'alcool p-coumarylique) ;
- Syringyle (dont l'alcool synapilique) ;
- Guaiacyle (dont l'alcool coniférylique).

Les polysaccharides structuraux et la lignine sont les constituants les plus abondants dans la paroi cellulaire (Ebringerová et al., 2005).

Tous les constituants des parois végétales (Figure 1) sont qualifiés de fibres et plus spécifiquement de fibres alimentaires dans le domaine de la nutrition (FAO, 2007 ; Ampuero, 2008). La FAO définit les fibres alimentaires comme « des polymères glucidiques avec un degré de polymérisation (DP) non inférieur à trois, qui ne sont ni digérés ni absorbés dans l'intestin grêle. Un degré de polymérisation non inférieur à trois est destiné à exclure les mono- et disaccharides et non à refléter le DP moyen du mélange. Si elles sont d'origine végétale, les fibres alimentaires peuvent comprendre des fractions de lignine et/ou d'autres composants s'ils sont associés avec des polysaccharides dans les parois cellulaires végétales et

si ces composants sont quantifiés par la méthode d'analyse gravimétrique qui a été adoptée pour l'analyse des fibres alimentaires (AOAC)» (FAO, 2007).

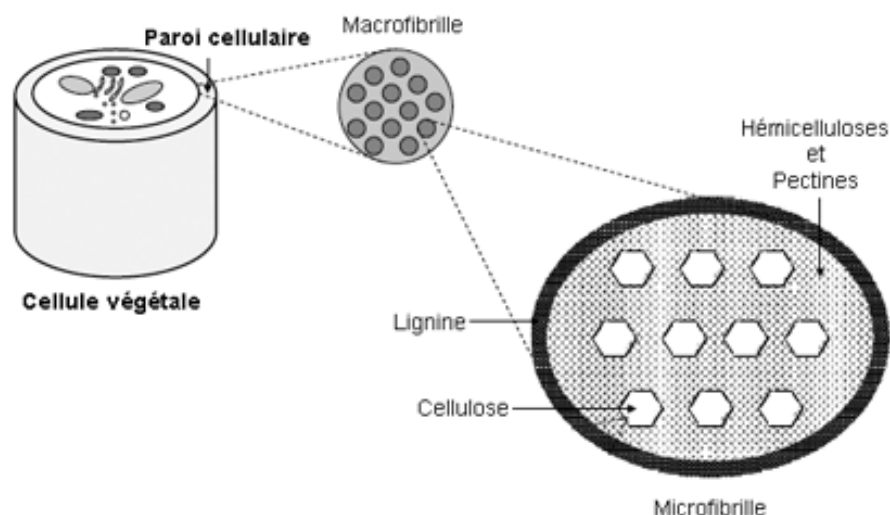


Figure 1. Organisation des polysaccharides structuraux et de la lignine dans les parois végétales (adapté de Zhang, 2008)

Deux catégories de méthodes existent afin de déterminer la nature des polysaccharides structuraux des biomasses végétales: les méthodes globales et les méthodes sélectives.

Les méthodes globales permettent de déterminer des ensembles de polysaccharides structuraux sans en distinguer la nature dans chaque ensemble isolé. Ces polysaccharides sont séparés soit sous forme de fibres alimentaires totales, soit divisés en fibres alimentaires solubles et insolubles dans l'eau. Il faut noter que la lignine, les protéines pariétales, les tannins et d'autres composants liés aux polysaccharides structuraux se trouvent également dans les fibres alimentaires car ils font partie intégrante de ces fractions de fibres alimentaires (Dorleans et al., 1996 ; Carpita et al., 2000 ; FAO, 2007). Les principales méthodes globales sont la méthode aux détergents neutre et acide de Van Soest et al. (1985), la méthode des fibres alimentaires de Prosky et al. (1992), la méthode des polysaccharides non amylacés d'Englyst et al. (1994), la méthode des fibres alimentaires d'Uppsala (Theander et al., 1994) et la méthode alcaline de Selvendran et al. (1985).

Les méthodes sélectives isolent sélectivement un ou deux polysaccharides

structuraux, comme la cellulose (Sun et al., 1995), les xylanes (Izydorczyk et al., 1998a ; Izydorczyk et al., 1998b ; Genestie, 2006), les xyloglucanes (Cutillas-Iturralde et al., 1998), les β -glucanes (Izydorczyk et al., 1998a ; Izydorczyk et al., 1998b), les mannanes (Selvendran et al., 1985) et les pectines (Selvendran et al., 1985 ; Le Goff et al., 2001).

L'objectif de cette synthèse est de déterminer la méthode présentant le meilleur compromis entre les données obtenues sur la nature (la structure et la composition en monosaccharides) des polysaccharides structuraux constituant la biomasse végétale et le temps d'analyse pour parvenir à obtenir cette information. Les hydrates de carbone non structuraux représentent une des interférences majeures lors de l'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses végétales. La purification des polysaccharides structuraux par une méthode suffisamment sélective est donc nécessaire pour déterminer la nature de ces polysaccharides des biomasses végétales.

Les méthodes globales de Van Soest, de Prosky, des polysaccharides non amylacés, d'Uppsala et de Selvendran seront présentées et comparées dans cette revue. Les méthodes sélectives à la cellulose, aux xylanes, aux xyloglucanes, aux β -glucanes, aux mannanes et aux pectines des biomasses végétales seront également présentées dans cette revue.

2. Méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux

2.1. Méthode aux détergents neutre et acide de Van Soest

La méthode aux détergents neutre et acide de Van Soest et al. (1985) (Figure 2, Tableaux 1 et 2) fractionne les fibres de la biomasse végétale par des extractions successives par voie chimique et quantifie par gravimétrie les fibres insolubles sèches récupérées après filtration.

La méthode de Van Soest (Van Soest et al., 1985 ; Van Soest et al., 1991 ; Mertens, 2002 ; Ampuero 2008) permet d'extraire les hydrates de carbone non structuraux, les pectines, les gommages, les mucilages, les tannins solubles à pH neutre, les lipides, les protéines solubles au détergent neutre et certaines substances minérales à l'aide d'une solution de détergent neutre, en excès, agissant sur l'échantillon pendant 1 h à 100°C avec un pH de $7 \pm 0,05$. Cette solution de détergent neutre est composée de Na_2HPO_4 , de tétraborate de sodium, de 2-éthoxyéthanol (qui extrait l'amidon), d'EDTA de sodium (qui facilitent l'extraction des pectines), de lauryle sulfate de sodium (qui extrait les protéines et les lipides) et de sulfite de sodium (qui hydrolyse les protéines). La fraction extraite est séparée des fibres insolubles au détergent neutre (NDF) par filtration. La fraction NDF est constituée de cellulose, d'hémicelluloses, de lignine, de tannins insolubles à pH neutre, de protéines insolubles au détergent neutre et de certaines substances minérales.

Parallèlement (ou séquentiellement) à l'action du détergent neutre, une solution de détergent acide, en excès, permet d'extraire les hémicelluloses, les tannins solubles en milieu acide (présents en très faible quantité), la lignine soluble en milieu acide (présente en très faible quantité), les protéines solubles au détergent acide et certaines substances minérales. Cette solution de détergent acide est composée de bromure de triméthyl-cétyl-ammonium et de H_2SO_4 1 N et agit pendant 1 h à 100°C. La fraction extraite est séparée des fibres insolubles au détergent acide (ADF) par

filtration. La fraction ADF est constituée de cellulose, de lignine insoluble en milieu acide, de tannins insolubles en milieu acide, des protéines insolubles au détergent acide et de certaines substances minérales. La différence entre les NDF et les ADF (en corrigeant par la teneur en protéines et en substances minérales) correspond à la quantité d'hémicelluloses, de lignine soluble en milieu acide et de tannins solubles en milieu acide.

La cellulose et les protéines insolubles au détergent acide sont extraites en traitant la fraction ADF au H₂SO₄ 72% pendant 3 h à 20-23°C. La fraction extraite est séparée du résidu insoluble par filtration. La quantité de cellulose correspond à la perte de masse insoluble de la fraction ADF (en corrigeant par la teneur en protéines) durant cette hydrolyse. Le résidu insoluble est composé de lignine insoluble en milieu acide, de tannins insolubles en milieu acide et de certaines substances minérales.

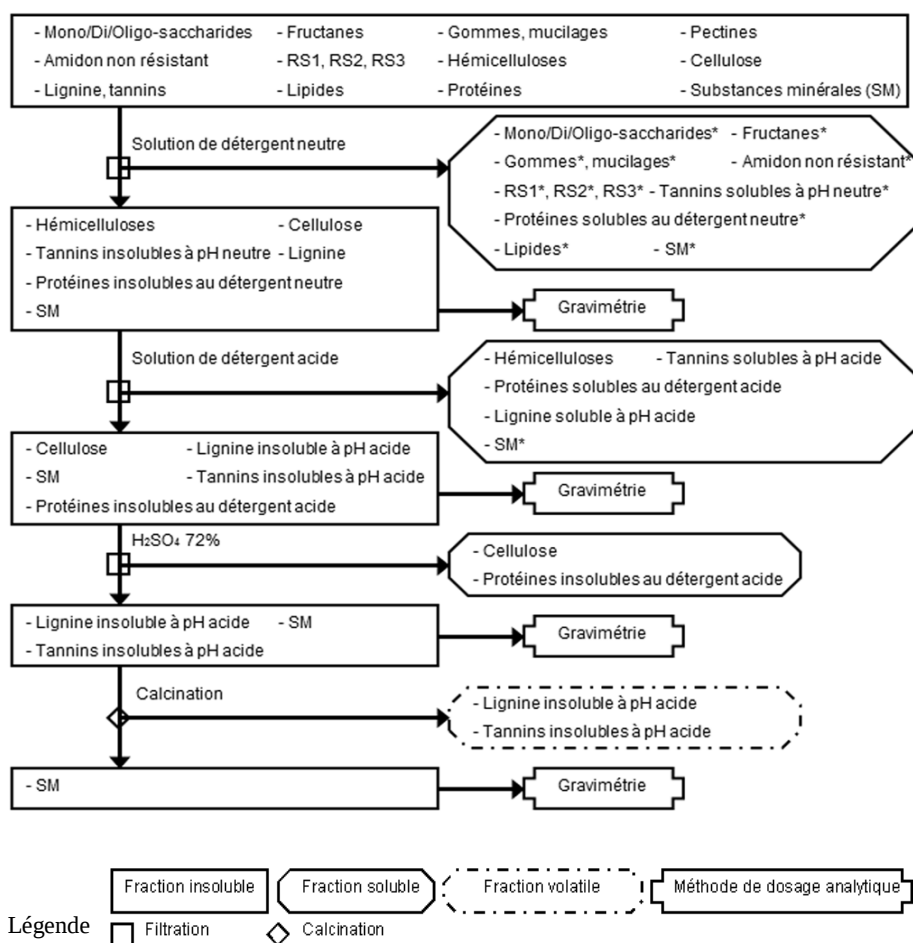
La lignine insoluble en milieu acide et les tannins insolubles en milieu acide (présents en très faible quantité) sont volatilisés par calcination. Le résidu insoluble obtenu après calcination est constitué de substances minérales. La lignine insoluble en milieu acide avec les tannins insolubles en milieu acide sont quantifiés par la perte de masse durant la calcination.

Afin de limiter l'incertitude sur le dosage des résidus insolubles, les valeurs gravimétriques obtenues pour tous les résidus insolubles obtenus doivent être corrigées par la teneur en protéines et en substances minérales. Les protéines sont quantifiées par un micro-Kjeldahl ou une analyse élémentaire sur base de l'azote en appliquant un facteur de conversion $N(g_N) \times 6,25 (g_{\text{protéines}}/g_N)$ (AOAC, 1990). Les substances minérales sont dosées par calcination à 550°C (Van Soest et al., 1985). Les quantités de cellulose et d'hémicelluloses peuvent être respectivement surestimées et sous-estimées dans le cas d'une contamination des ADF par des hémicelluloses. Cette contamination peut atteindre la valeur de 15,4% des polysaccharides structuraux des ADF (Morrison, 1980 ; Jung, 1997). Les quantités de cellulose et d'hémicelluloses des biomasses végétales possédant une teneur importante en protéines sont surestimées si la valeur respectivement des NDF et des ADF n'est pas corrigée par leurs teneurs en protéines (Jung, 1997). La quantité d'hémicelluloses des biomasses végétales possédant une teneur importante en lignine soluble à pH acide est surestimée car cette lignine soluble est contenue dans les NDF mais elle n'est pas contenue dans les ADF (Jung, 1997). Les ADF n'ayant

pas subi de traitement au détergent neutre contiennent certaines pectines qui ne sont pas contenues dans les ADF ayant subi un traitement préalable au détergent neutre. Les hémicelluloses des ADF n'ayant pas subi de traitement au détergent neutre sont sous-estimées si la biomasse végétale possède une teneur importante en pectines (Ampuero, 2008).

La méthode de Van Soest ne s'applique qu'à des échantillons dont les teneurs en amidon, en protéines et en lipides sont respectivement inférieures à 10, à 30 et à 10% (p:p) de la matière sèche. Les NDF sont surestimées lorsque l'échantillon contient trop d'amidon et de protéines. S'il contient trop de lipides, le détergent neutre ou acide s'associe préférentiellement à la phase lipidique et perd de son efficacité, donnant des valeurs biaisées pour les NDF et les ADF (Van Soest et al., 1985 ; Van Soest et al., 1991 ; Giger-Reverdin, 1995). Dans le cas d'un excès de lipides, il suffit d'extraire préalablement les lipides de l'échantillon pour pouvoir appliquer la méthode de Van Soest. Dans le cas d'un excès d'amidon et de protéines, des α -amylases et des protéases sont respectivement utilisées (Giger-Reverdin, 1995). Différentes autres variantes de la méthode aux détergents neutre et acide de Van Soest ont été développées :

- Ajout d' α -amylases thermotolérantes au détergent neutre pour hydrolyser l'amidon (Mertens 2002) ;
- Ajout de protéases préalablement à l'attaque au détergent neutre pour hydrolyser les protéines (Dorleans et al., 1996) ;
- Utilisation de quantités plus faibles de détergent neutre pour utiliser un moindre excès de détergent neutre (Chai et al., 1998).



*, Substance non quantifiée

SM, Substances minérales ; RS1, Amidon résistant 1; RS2, Amidon résistant 2 ;

RS3, Amidon résistant 3

Figure 2. Schéma du fractionnement et des substances dosées dans la méthode de Van Soest

2.2. Méthode des fibres alimentaires de Prosky

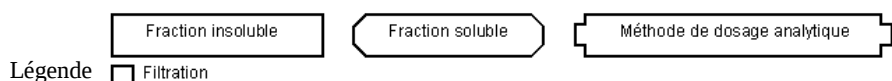
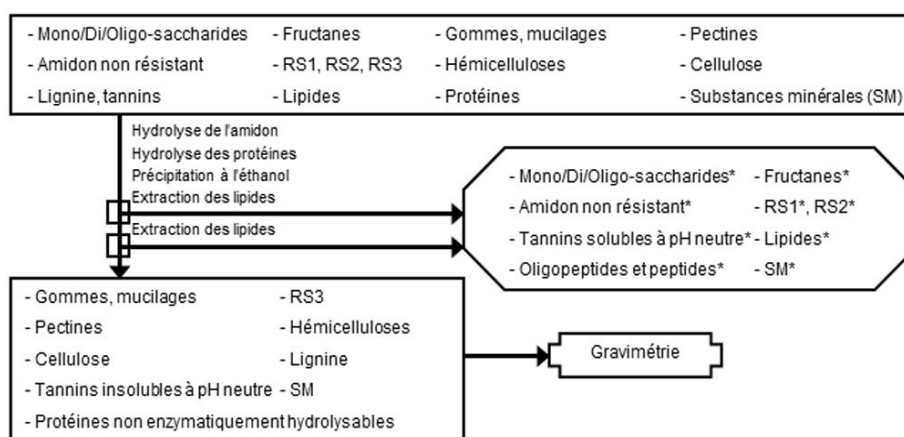
La méthode des fibres alimentaires de Prosky (Prosky et al., 1985 ; Prosky et al., 1992) (Figure 3, Tableaux 1 et 2) est basée sur des hydrolyses enzymatiques successives de la biomasse végétale afin d'extraire les molécules qui ne font pas partie des fibres alimentaires. Les fibres alimentaires sont quantifiées par gravimétrie.

La méthode de Prosky (Prosky et al., 1985 ; Prosky et al., 1992 ; Asp, 1995 ; Englyst et al., 1996 ; McCleary et al., 2002 ; FAO, 2007) commence par une extraction des lipides, si l'échantillon en contient plus de 10% (p:p). Cette méthode permet d'extraire ou d'hydrolyser les mono/di/oligo-saccharides, les fructanes, les gommes, les mucilages, l'amidon non résistant (accessible et non résistant à l'hydrolyse par l' α -amylase pancréatique), l'amidon résistant 1 (RS1) (amidon inaccessible physiquement à l' α -amylase pancréatique), l'amidon résistant 2 (RS2) (amidon non gélatinisé et fortement résistant à l'hydrolyse par l' α -amylase pancréatique), les tannins solubles à pH neutre, les protéines enzymatiquement hydrolysables et certaines substances minérales à l'aide de, successivement, une α -amylase thermotolérante à 100°C pendant 30 min, une protéase à 60°C pendant 30 min et une amyloglycosidase à 60°C pendant 60 min. Les fibres alimentaires totales sont isolées par une précipitation à l'éthanol aqueux 78% (v:v) suivie d'une filtration sur diatomite. Les fibres alimentaires totales insolubles sont ensuite rincées deux fois à l'éthanol aqueux 95% (v:v) et deux fois à l'acétone. Les étapes de précipitation à l'éthanol, de rinçage à l'éthanol et à l'acétone extraient les lipides. Les fibres alimentaires totales sont composées de cellulose, d'hémicelluloses, de l'amidon résistant 3 (RS3) (amidon gélatinisé et fortement résistant à l'hydrolyse par l' α -amylase), des pectines (sauf celles qui sont hydrosolubles), des gommes (sauf celles qui sont hydrosolubles), des mucilages (sauf ceux qui sont hydrosolubles), de la lignine, des tannins insolubles à pH neutre, des protéines non enzymatiquement hydrolysables et de certaines substances minérales.

Afin de limiter l'incertitude sur le résultat des fibres alimentaires totales, chaque analyse est effectuée en double. Sur l'une des répétitions, l'azote est dosé par un micro-Kjeldahl ou une analyse élémentaire pour corriger le contenu en protéines dans la fraction insoluble, en appliquant un facteur de conversion $N (g_N) \times 6,25$

($g_{\text{protéines}}/g_N$) (AOAC, 1990). Sur l'autre répétition, les substances minérales sont quantifiées par calcination à 550°C dans la fraction insoluble. Le même protocole est appliqué en parallèle sur deux témoins blancs (exempt d'échantillon) pour déterminer les contributions gravimétriques des différentes solutions utilisées (Prosky et al., 1985 ; Prosky et al., 1992).

Dans une autre variante de la méthode de Prosky, les fibres alimentaires totales sont séparées en fibres alimentaires insolubles et solubles dans l'eau à pH neutre. Au lieu de réaliser l'étape de précipitation à l'éthanol aqueux 78% (v:v), la solution est directement filtrée sur diatomite afin de récupérer les fibres alimentaires solubles dans le filtrat et les fibres alimentaires insolubles dans le résidu insoluble (Prosky et al., 1992). Dans une autre variante de la méthode de Prosky, le temps d'analyse est réduit en diminuant le volume total de filtration par l'utilisation de volumes de réactifs plus faibles et en n'ajustant pas le pH lors de l'utilisation de la protéase (Lee et al., 1992).



*, Substance non quantifiée

SM, Substances minérales ; RS1, Amidon résistant 1; RS2, Amidon résistant 2 ; RS3, Amidon résistant 3

Figure 3. Schéma du fractionnement et des substances dosées dans la méthode de Prosky

2.3. Méthode de dosage des polysaccharides non amylacés (NSP) d'Englyst

La méthode de dosage des polysaccharides non amylacés d'Englyst et al. (1994) (Figure 4, Tableaux 1 et 2) extrait séquentiellement par voie enzymatique et chimique différentes molécules de la biomasse végétale qui ne font pas partie des polysaccharides non amylacés. Les polysaccharides non amylacés sont quantifiés par chromatographie et avec ou sans spectrophotométrie après hydrolyse acide.

La méthode des polysaccharides non amylacés (Englyst et al., 1994 ; Asp, 1995 ; Englyst et al., 1996) commence par une extraction des lipides, si l'échantillon en contient plus de 10% (p:p). Cette méthode permet d'extraire ou d'hydrolyser les mono/di/oligo-saccharides, les fructanes, l'amidon non résistant, l'amidon résistant 1 (RS1), l'amidon résistant 2 (RS2), l'amidon résistant 3 (RS3), les tannins solubles à pH neutre, les protéines enzymatiquement hydrolysables et certaines substances minérales à l'aide, de successivement, du diméthylsulfoxyde (DMSO) pendant 30 min à 100°C, une α -amylase thermotolérante à 100°C pendant 10 min et un mélange de pancréatine et de pullulanase pendant 30 min à 50°C. Les polysaccharides non amylacés totaux sont isolés par une précipitation à l'éthanol aqueux 80% (v:v) à pH 2 suivie d'une centrifugation. Les polysaccharides non amylacés totaux insolubles sont ensuite rincés une fois à l'éthanol aqueux 85% (v:v) acidifié, une fois à l'éthanol aqueux 99,5% (v:v) et une fois à l'acétone. Les étapes de précipitation à l'éthanol, de rinçage à l'éthanol et à l'acétone extraient les lipides. Les polysaccharides non amylacés totaux sont composés de cellulose, d'hémicelluloses, des pectines (sauf celles qui sont hydrosolubles), des gommes (sauf celles qui sont hydrosolubles), des mucilages (sauf ceux qui sont hydrosolubles), de la lignine, des tannins insolubles à pH neutre, des protéines non enzymatiquement hydrolysables et de substances minérales.

Les polysaccharides non amylacés obtenus sont hydrolysés en monosaccharides à l'aide de H_2SO_4 12 M pendant 30 min à 35°C. De l'eau est ensuite ajoutée afin de diluer le H_2SO_4 jusqu'à 2 M et de poursuivre l'hydrolyse des polysaccharides non amylacés en monosaccharides pendant 1 h à 100°C. Les monosaccharides sont quantifiés soit par chromatographie liquide, soit par chromatographie gazeuse pour

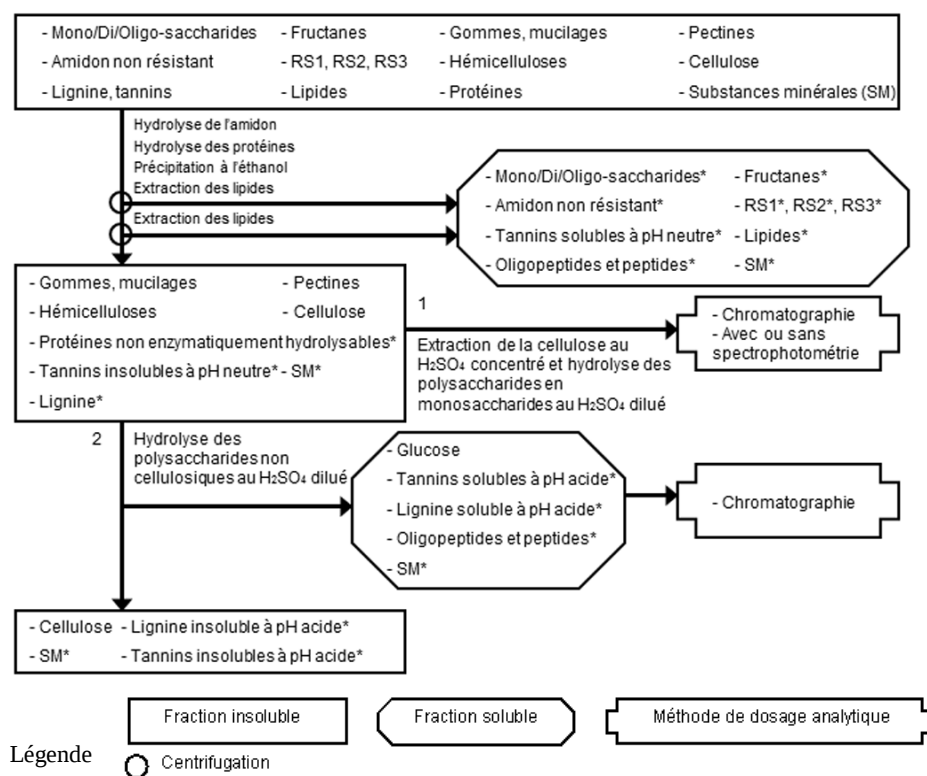
les monosaccharides neutres en les dérivatisant en acétate d'alditol et par spectrophotométrie visible pour les monosaccharides acides (acides uronique) en les transformant en acide 5-formyl-2-furoïque. Cet acide est dosé après réaction avec du 3,5-diméthylphénol en faisant la différence entre l'absorbance à 450 nm et à 400 nm. La somme de tous les monosaccharides déterminés après hydrolyse correspond aux polysaccharides non amylacés (Englyst et al., 1994).

La cellulose peut aussi être quantifiée en effectuant le même protocole en double. Afin d'hydrolyser les polysaccharides non cellulosiques, pour l'une des deux analyses, le culot correspondant aux polysaccharides non amylacés totaux est soumis à une étape d'hydrolyse au H_2SO_4 2 M pendant 60 min à 100°C. Le glucose libéré lors de cette étape est analysé par chromatographie gazeuse ou liquide. La quantité de cellulose correspond à la différence du glucose entre l'échantillon « normal » (glucose venant des polysaccharides non amylacés totaux) et l'échantillon ayant subi le traitement alternatif (glucose venant des polysaccharides non cellulosiques) (Englyst et al., 1994).

La dégradation des monosaccharides libérés pendant l'hydrolyse acide des polysaccharides en monosaccharides analysés par chromatographie gazeuse, la dégradation des monosaccharides libérés pendant l'hydrolyse acide des polysaccharides en monosaccharides analysés par chromatographie liquide et le rendement de dérivatisation des monosaccharides neutres analysés par chromatographie gazeuse sont déterminés en utilisant comme référence un mélange de standards de monosaccharides dans du H_2SO_4 2 M. Ce mélange de standards est traité en parallèle avec les échantillons issus de l'étape de dilution du H_2SO_4 concentré. Un standard interne est ajouté après l'hydrolyse au H_2SO_4 dilué (Englyst et al., 1994). Le dosage des polysaccharides non amylacés prend également en compte le facteur de conversion des polysaccharides en monosaccharides (gain d'une molécule d'eau par l'hydrolyse), à savoir 89% pour les monosaccharides neutres et 91% pour les monosaccharides acides (Englyst et al., 1994).

Dans une variante de la méthode de dosage des polysaccharides non amylacés, les polysaccharides non amylacés totaux sont séparés en polysaccharides non amylacés insolubles et solubles dans l'eau à pH neutre. Au lieu de réaliser l'étape de précipitation à l'éthanol aqueux 80% (v:v) à pH 2, la solution est directement centrifugée afin de récupérer les polysaccharides non amylacés solubles

dans le filtrat et les polysaccharides non amylacés insolubles dans le résidu insoluble (Englyst et al., 1994).



*, Substance non quantifiée

SM, Substances minérales ; RS1, Amidon résistant 1; RS2, Amidon résistant 2 ;

RS3, Amidon résistant 3

Figure 4. Schéma du fractionnement et des substances dosées dans la méthode des polysaccharides non amylacés

2.4. Méthode des fibres alimentaires d'Uppsala

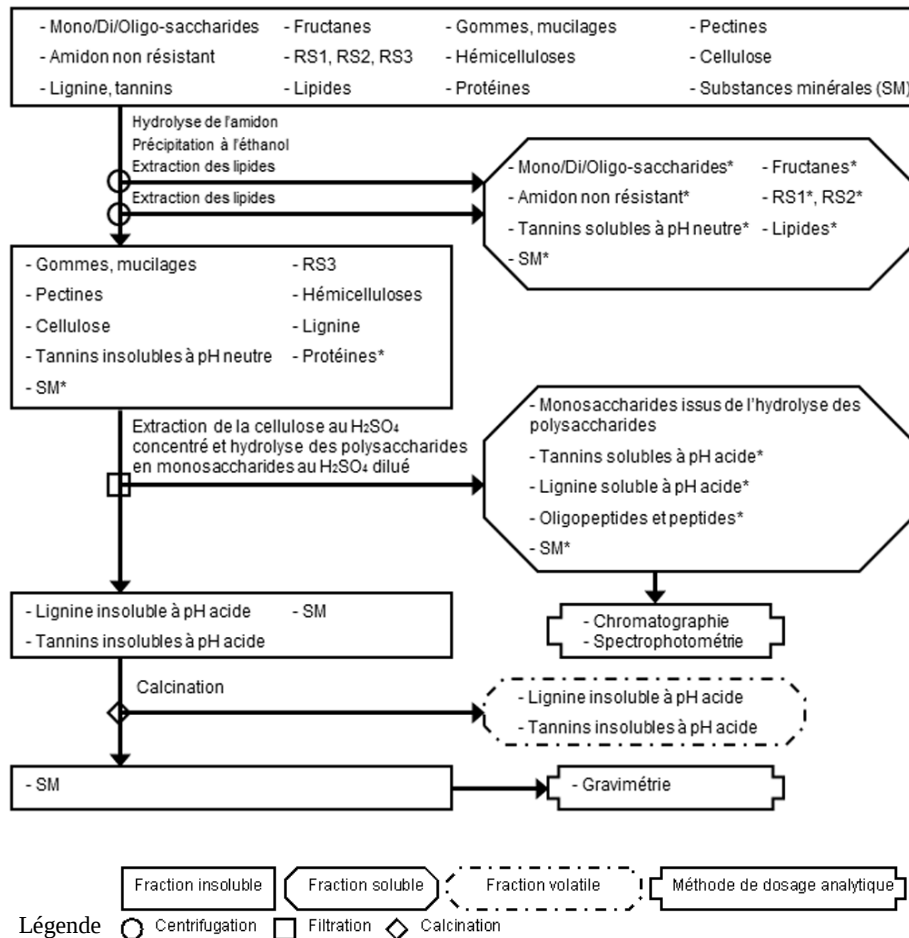
La méthode des fibres alimentaires d'Uppsala (Theander et al., 1995) (Figure 5, Tableaux 1 et 2) extrait séquentiellement par voie enzymatique et chimique différentes molécules de la biomasse végétale qui ne font pas partie des fibres alimentaires. Les fibres alimentaires sont quantifiées par chromatographie, spectrophotométrie et gravimétrie après hydrolyse acide.

La méthode des fibres alimentaires d'Uppsala (Theander et al., 1995 ; Asp, 1995 ; Englyst et al., 1996 ; FAO, 2007) commence par une extraction des lipides, si l'échantillon en contient plus de 5% (p:p). Cette méthode permet d'extraire ou d'hydrolyser les mono/di/oligo-saccharides, les fructanes, l'amidon non résistant, l'amidon résistant 1 (RS1), l'amidon résistant 2 (RS2), les tannins solubles à pH neutre et certaines substances minérales à l'aide, de successivement, une α -amylase thermotolérante à 100°C pendant 60 min et une amyloglycosidase à 60°C pendant 6 h. Les fibres alimentaires totales sont isolées par une précipitation à l'éthanol aqueux 80% (v:v) suivie d'une centrifugation. Les fibres alimentaires totales insolubles sont ensuite rincées une fois à l'éthanol aqueux 99,5% (v:v) et deux fois à l'acétone. Les étapes de précipitation à l'éthanol, de rinçage à l'éthanol et à l'acétone extraient les lipides. Les fibres alimentaires totales sont composées de cellulose, d'hémicelluloses, de l'amidon résistant 3 (RS3), des pectines (sauf celles qui sont hydrosolubles), des gommes (sauf celles qui sont hydrosolubles), des mucilages (sauf ceux qui sont hydrosolubles), de la lignine, des tannins insolubles à pH neutre, des protéines et des substances minérales.

Les fibres alimentaires obtenues sont hydrolysées en monosaccharides à l'aide de H_2SO_4 12 M pendant 60 min à 30°C. De l'eau est ensuite ajoutée afin de diluer le H_2SO_4 jusqu'à 0,47 M et de poursuivre l'hydrolyse des fibres alimentaires en monosaccharides pendant 1 h à 125°C. La solution est filtrée afin de récupérer les monosaccharides dans le filtrat. Les monosaccharides du filtrat sont quantifiés par chromatographie gazeuse en les dérivatisant en acétate d'alditol. Par contre, les monosaccharides uroniques (acides uroniques) sont quantifiés par spectrophotométrie visible selon le même protocole que dans la méthode des polysaccharides non amylacés. Le résidu insoluble de filtration permet de quantifier par gravimétrie la lignine insoluble à pH acide avec les tannins insolubles à pH acide (présents en très

faible quantité), qui forment ensemble la « lignine de Klason ». La lignine insoluble à pH acide et les tannins insolubles à pH acide sont volatilisés par calcination. Le résidu insoluble obtenu après calcination est constitué de substances minérales. La lignine insoluble en milieu acide et les tannins insolubles en milieu acide sont quantifiés par la perte de masse durant la calcination à 500°C. La somme de tous les monosaccharides déterminés après hydrolyse et de la lignine de Klason correspond aux fibres alimentaires (Theander et al., 1995).

La dégradation des monosaccharides libérés pendant l'hydrolyse acide des polysaccharides en monosaccharides analysés par chromatographie gazeuse et le rendement de dérivation des monosaccharides neutres analysés par chromatographie gazeuse sont déterminés en utilisant comme référence un mélange de standards des monosaccharides dans du H₂SO₄ 0,47 M. Ce mélange de standards est traité en parallèle avec les échantillons issus de l'étape de dilution du H₂SO₄ concentré. Un standard interne est ajouté à l'étape d'hydrolyse au H₂SO₄ dilué. Le dosage des polysaccharides non amylacés prend également en compte le facteur de conversion des polysaccharides en monosaccharides (gain d'une molécule d'eau par l'hydrolyse), à savoir 91% pour les monosaccharides acides, 88% pour les pentoses et les déoxyhexoses, et 90% pour les autres hexoses (Theander et al., 1995). Afin de limiter l'incertitude sur le dosage de la lignine de Klason, la valeur gravimétrique du résidu insoluble obtenu après l'hydrolyse acide doit être corrigée par la teneur en protéines résiduelles contenues dans ce résidu. Les protéines sont quantifiées par un micro-Kjeldahl ou une analyse élémentaire sur base de l'azote en appliquant un facteur de conversion N (g_N) x 6,25 (g_{protéines}/g_N) (Hatfield et al., 1994).



*, Substance non quantifiée

SM, Substances minérales ; RS1, Amidon résistant 1; RS2, Amidon résistant 2 ; RS3, Amidon résistant 3

Figure 5. Schéma du fractionnement et des substances dosées dans la méthode d'Uppsala

2.5. Méthode alcaline de Selvendran

La méthode alcaline de Selvendran et al. (1985) (Figure 6, Tableaux 1 et 2) extrait séquentiellement par voie chimique différentes fractions spécifiques de la biomasse végétale. Les polysaccharides structuraux sont quantifiés par chromatographie et par spectrophotométrie visible après hydrolyse acide. Cette méthode se démarque de celles décrites ci-dessus du fait qu'elle permet un fractionnement sélectif des polysaccharides structuraux (plus de deux polysaccharides structuraux) en fonction de leur nature.

Les protéines de l'échantillon sont d'abord éliminées par un traitement au déoxycholate de sodium (SDC) aqueux à 1% (v:v) ou au dodécyl sulphate de sodium (SDS) aqueux à 1,5%, contenant 5 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (pour limiter la formation de produits d'oxydation des polyphénols) pendant 5 min. La solution est filtrée et cette étape est répétée sur le résidu insoluble. Ce résidu insoluble est broyé à une taille inférieure à 3 mm dans du déoxycholate de sodium (SDC) aqueux à 0,5% (v:v) ou du dodécyl sulphate de sodium (SDS) aqueux à 0,5%, contenant 3 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ pendant 5 min. La solution est centrifugée et cette étape est répétée sur le résidu insoluble. Les filtrats et les surnageants obtenus jusqu'à cette étape contiennent des protéines, des pectines hydrosolubles, certaines substances minérales, des composés intracellulaires comme les mono/di/oligo-saccharides. Les protéines résiduelles, les lipides, les pigments et une partie de l'amidon sont extraits du résidu insoluble par deux traitements avec une solution phénol/acide acétique/eau (2:1:1 ; p/v/v). La solution est centrifugée et cette étape est répétée sur le résidu insoluble. L'amidon est extrait du résidu insoluble par du DMSO aqueux à 90% (v/v) à 20°C pendant 16 h. Le résidu insoluble est centrifugé et lavé six fois à l'eau afin d'obtenir les composants pariétaux purifiés (Selvendran et al., 1985).

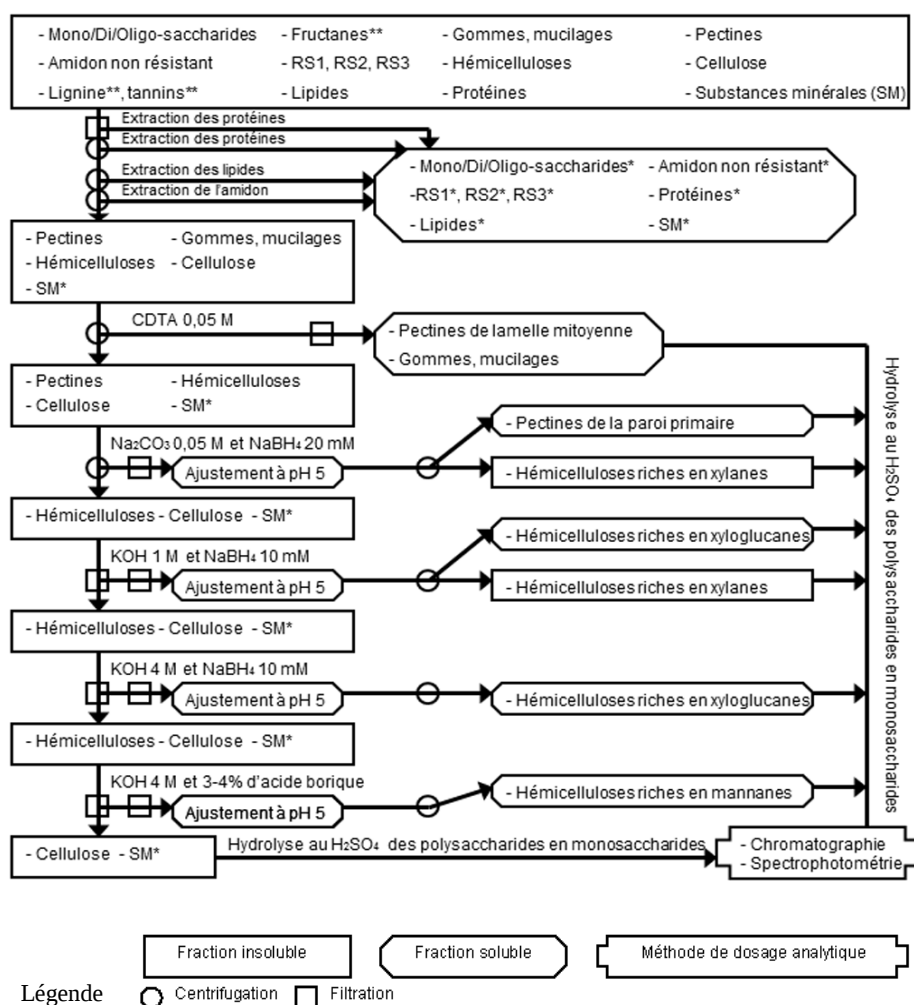
Les pectines et les hémicelluloses riches en xylanes sont extraites du résidu insoluble. Premièrement, ce dernier est traité au N,N,N',N'-tétraacétate cyclohexanediamine (CDTA) de sodium 0,05 M à 21°C et à pH 6,5 pendant 6 h. Le CDTA de sodium est un agent chélatant qui extrait principalement les substances pectiques de la lamelle mitoyenne et qui, à une température de 20°C, est aussi efficace que des agents chélatants conventionnels à haute température. La solution est centrifugée et cette étape est répétée sur le résidu insoluble mais la durée à

appliquer est de 2 h. Les deux surnageants contenant des pectines de la lamelle mitoyenne sont filtrés, dialysés et concentrés. Deuxièmement, le résidu insoluble est soumis au Na_2CO_3 0,05 M et au NaBH_4 20 mM (pour protéger les polysaccharides de la β -élimination) pendant 16 h à 1°C. La solution est centrifugée et extraite une deuxième fois au Na_2CO_3 0,05 M et au NaBH_4 20 mM pendant 3 h à 1°C. Le résidu insoluble correspond aux composants pariétaux purifiés et dépectinés. Les deux surnageants contenant des pectines de la paroi primaire et d'hémicelluloses riches en xylanes sont filtrés. Le pH de ces filtrats est ajusté à pH 5 par de l'acide acétique afin de précipiter les hémicelluloses riches en xylanes. Après centrifugation, les surnageants de pectines sont dialysés et concentrés (Selvendran et al., 1985 ; Southgate, 1995).

Les hémicelluloses (xylane résiduel, xyloglucane, β -glucane, et mannane) et la cellulose sont isolées du résidu insoluble des composants pariétaux purifiés et dépectinés. Dans un premier temps, le résidu insoluble est soumis au KOH 1 M désoxygéné et au NaBH_4 10 mM pendant 2 h à 1°C. La solution est filtrée. Le résidu insoluble est extrait une deuxième fois au KOH 1 M désoxygéné et au NaBH_4 10 mM pendant 2 h à 21°C sous azote ou argon et cette solution est filtrée. Le pH des deux filtrats contenant les hémicelluloses extraites est ajusté à pH 5 par de l'acide acétique afin de précipiter les hémicelluloses riches en xylanes. Ces solutions sont centrifugées afin d'obtenir les hémicelluloses riches en xylanes dans le culot et les hémicelluloses riches en xyloglucanes dans le surnageant. Le surnageant avec les hémicelluloses riches en xyloglucanes est dialysé et concentré. Dans un deuxième temps, le résidu insoluble obtenu après deux traitement au KOH 1 M est soumis au KOH 4 M désoxygéné et au NaBH_4 10 mM pendant 2 h à 21°C sous argon ou azote. La solution est filtrée et le résidu insoluble est soumis une deuxième fois au KOH 4 M désoxygéné et au NaBH_4 10 mM pendant 2 h à 21°C sous azote ou argon avec de l'acide borique 3-4%. Les deux filtrats contenant des hémicelluloses sont filtrés. Le pH des filtrats est ajusté à pH 5 par de l'acide acétique. Ces nouveaux filtrats sont dialysés et concentrés. Le premier filtrat est composé d'hémicelluloses riches en xyloglucanes. Par contre, le deuxième filtrat est constitué d'hémicelluloses riches en mannanes. Le résidu insoluble obtenu est essentiellement composé de cellulose, de lignine et de substances minérales (Selvendran et al., 1985 ; Southgate, 1995). Après les étapes de dépectination de l'échantillon, il peut être délignifié pour rendre

le réseau de cellulose et d'hémicelluloses plus accessible à l'extraction alcaline (Genestie, 2006). La délignification a lieu à 70°C par du NaClO_2 et de l'acide minéral ou organique pour une durée entre 1 et 4 h selon le degré de lignification de l'échantillon. Cette étape de délignification a plusieurs effets sur l'échantillon analysé. Premièrement, elle n'est que partielle. Elle est de 60% si cette étape dure 2 h. Deuxièmement, elle extrait de faibles quantités, aux environs 5 à 10%, des polysaccharides de l'échantillon. Troisièmement, elle extrait partiellement les protéines pariétales (Selvendran et al., 1985).

Les polysaccharides de toutes les fractions obtenues et neutralisées sont déterminés en suivant le même protocole que dans la méthode d'Uppsala, c'est-à-dire à partir de l'hydrolyse acide au H_2SO_4 12 M (Selvendran et al., 1985 ; Eriksson et al., 1997).



*, Substance non quantifiée

**, Fractionnement inconnue de la molécule

CDTA ; N,N,N',N'-tétraacétate cyclohexanediamine ; SM, Substances minérales ; RS1, Amidon résistant 1 ; RS2, Amidon résistant 2 ; RS3, Amidon résistant 3

Figure 6. Schéma du fractionnement et des substances dosées dans la méthode de Selvendran

2.6. Méthodes sélectives d'un ou de deux polysaccharides structuraux

De nombreuses méthodes d'analyse sélective d'un ou de deux polysaccharides structuraux des biomasses végétales existent dans la littérature. Certaines de ces méthodes d'analyse sont décrites ci-dessous pour la cellulose (Sun et al., 1995), les xyloglucanes (Cutillas-Iturralde et al., 1998), les xylanes (Izydorczyk et al., 1998a ; Izydorczyk et al., 1998b ; Genestie, 2006), les β -glucanes (Izydorczyk et al., 1998a ; Izydorczyk et al., 1998b), les mannanes (Selvendran et al., 1985) et les pectines (Selvendran et al., 1985 ; Le Goff et al., 2001).

Cellulose

La méthode de Sun et al. (1995) isole à partir de paille de froment la cellulose en plusieurs étapes d'extraction chimique. Deux des étapes intermédiaires permettent d'isoler une fraction riche en pectines et une fraction riche en hémicelluloses.

Les composées intracellulaires, les hydrates de carbone non structuraux et une partie de lignine, des hémicelluloses, des pectines et des protéines sont extraits par une étape de prétraitement de l'échantillon au NaOH 1,5% pendant 144 h à 20°C. Les pectines résiduelles dans l'échantillon sont extraites par un agent chélatant, l'oxalate d'ammonium à 0,25% pendant 4 h à 85°C. La lignine résiduelle est éliminée par une extraction au NaClO₂ et à l'acide acétique (pH entre 4,2 et 4,7) pendant 24 h à 75°C (Sun et al., 1995). D'autres agents de délignification existent comme l'acide peracétique qui est sélectif de la lignine (Teixeira et al., 1999), le H₂O₂ en milieu alcalin (Fang et al., 1999) et le KMnO₄ utilisé par Van Soest et al. (1985). Le KMnO₄ est un agent d'oxydation plus fort que le NaClO₂ (Collings et al., 1978). Afin d'obtenir un résidu insoluble de cellulose purifiée contenant encore des substances minérales, les hémicelluloses résiduelles sont extraites au KOH 24% et à l'acide borique 2% pendant 2 h et à 20°C (Sun et al., 1995).

Xylane et xyloglucane

Les méthodes de Cutillas-Iturralde et al. (1998) et de Genestie (2006) purifient à partir de respectivement des parois de kaki et des sons de céréale les xylanes et les xyloglucanes par voie chimique et chromatographique.

L'échantillon est soumis à la délignification au NaClO_2 40% et au H_2SO_4 0,3% pendant 2 h à 70°C. Les xylanes et les xyloglucanes du culot obtenu après centrifugation sont extraits au KOH 1 M, au NaBH_4 20 mM et sous atmosphère d'azote pendant 2 h à 60°C. Cette suspension est centrifugée afin de récupérer les xylanes dans le surnageant et les xyloglucanes dans le culot. Les xyloglucanes du culot sont extraits par quatre traitements au KOH 4 M et au NaBH_4 20 mM sous atmosphère d'azote pendant 24 h à 20°C. La suspension résultante est centrifugée. Les quatre surnageants sont combinés pour obtenir la fraction des xyloglucanes. Les fractions de xylanes et de xyloglucanes sont purifiées par l'hydrolyse de l'amidon et des protéines par respectivement des glycohydrolases (α -amylase et pullulanase) et des protéases. Les enzymes sont désactivées et la solution est dialysée et centrifugée pour récupérer le surnageant. Les xylanes ou les xyloglucanes sont séparés des pectines par une chromatographie préparative d'échange d'anions sur une colonne de DEAE-Trisacryl (Cutillas-Iturralde et al., 1998 ; Genestie, 2006).

β -glucane et xylane

La méthode d'Izydorczyk et al. (1998a et 1998b) extrait par voie enzymatique à partir de grains d'orge une fraction de β -glucanes et de xylanes. Les β -glucanes sont ensuite séparés des xylanes par une précipitation sélective au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

L'échantillon est traité dans de l'eau à 40°C pendant 30 min. Il est soumis à deux centrifugations.

Premièrement, les protéines du mélange des deux surnageants contenant les β -glucanes et les xylanes hydrosolubles sont dénaturées en chauffant la solution à 95°C. L'élimination des protéines du mélange des deux surnageants est effectuée par filtration sur de la diatomite suivie par adsorption des protéines du filtrat sur de l'argile. Un nouveau surnageant est obtenu par centrifugation de la suspension. Ce

urnageant est soumis à l'hydrolyse de l'amidon par de l' α -amylase pancréatique. Afin d'obtenir les β -glucanes et les xylanes hydrosolubles à purifier, la solution est dialysée pour en éliminer les hydrates de carbone non structuraux, chauffée à 95°C pour en désactiver les enzymes ajoutées et centrifugées.

Deuxièmement, les β -glucanes et les xylanes non hydrosolubles contenus dans le culot initial sont extraits par voie alcaline par une solution saturée en Ba(OH)_2 contenant 1% (p/v) de NaBH_4 . Les β -glucanes et les xylanes sont séparés du résidu insoluble par deux centrifugations. Les deux surnageants sont combinés et neutralisés par de l'acide acétique. Cette solution contenant les β -glucanes et les xylanes non hydrosolubles est soumise à l'hydrolyse de l'amidon et des protéines par respectivement de l' α -amylase pancréatique et de la pronase. Afin d'obtenir les β -glucanes et les xylanes non hydrosolubles purifiés, cette solution est dialysée pour en éliminer les hydrates de carbone non structuraux et les protéines hydrolysées, chauffée à 95°C pour en désactiver les enzymes et centrifugée.

Les extraits de β -glucanes et de xylanes hydrosolubles et non hydrosolubles isolés et à purifier subissent ensuite le même processus. Les extraits sec sont dissous dans un tampon phosphate à pH 7 et du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ est lentement ajouté jusqu'à 28% de saturation. Après avoir laissé cette solution agir pendant une nuit à 5°C, elle est centrifugée afin d'isoler le précipité. Le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ résiduel du surnageant est dialysé. Une fois le surnageant lyophilisé, le même procédé est répété mais en atteignant à chaque fois un pourcentage supérieur au précédent en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et cela jusqu'à saturation. Si le pourcentage de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par rapport à la saturation est inférieur à 45%, alors seuls les β -glucanes sont précipités. Au-delà de 45%, les xylanes précipitent également et cela augmente avec le pourcentage de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par rapport à la saturation (Izydorczyk et al., 1998a ; Izydorczyk et al., 1998b).

Mannane

Pour des extraits d'hémicelluloses hydrosolubles ou extraites par voie alcaline venant de bois de gymnospermes et purifiés des pectines par une chromatographie préparative d'échange d'anions, les mannanes peuvent être précipités sélectivement par rapport aux autres polysaccharides structuraux par voie chimique.

Les mannanes sont extraits dans l'eau ou à la NaOH diluée. La précipitation des mannanes est ensuite réalisée par du Ba(OH)_2 0,03 M. Le précipité est récupéré par

centrifugation et est purifié par la même étape de précipitation que celle décrite ci-dessus. Le nouveau précipité de mannanes obtenus par centrifugation est extrait à l'acide acétique 2 M et reprécipité à l'éthanol (Selvendran et al., 1985).

Pectines

La méthode de Le Goff et al. (2001) fractionne les pectines de gousse de pois en trois catégories : solubles en milieu alcalin, solubles en milieu acide et solubles en milieu neutre.

Les pectines sont déestérifiées en milieu alcalin par un traitement au NaOH 1 M pendant 2 h à 4°C. Ce traitement permet également d'extraire la fraction des substances, dont les pectines, solubles en milieu alcalin. Afin de faire descendre le pH à 5, de l'acide acétique glacial est ajouté à la solution. La suspension résultante est ensuite filtrée afin d'obtenir la fraction des substances, dont les pectines, extraites en milieu alcalin dans le filtrat. La fraction des substances, dont les pectines, solubles en milieu acide est extraite du résidu insoluble au HCl 1 M pendant 24 h à 80°C. La suspension résultante est ensuite centrifugée afin d'obtenir dans le surnageant la fraction des substances, dont les pectines, solubles en milieu acide. La fraction des substances, dont les pectines, solubles en milieu neutre est extraite du résidu insoluble en ramenant le pH à 7. Cette fraction est centrifugée afin d'isoler les substances, dont les pectines, solubles en milieu neutre dans le surnageant. Les trois fractions de pectines extraites sont purifiées des autres substances extraites comme les polysaccharides neutres par une chromatographie préparative d'échange d'anions sur une colonne de DEAE-Sepharose CL-6B (Le Goff et al. 2001).

Les polysaccharides acides (les pectines acides et les glucuronoxylanes) peuvent être précipités par rapport aux polysaccharides neutres par une concentration en Ba(OH)₂ de 0,15 M (Selvendran et al., 1985).

3. Comparaison des méthodes globales d'analyse des polysaccharides structuraux

Les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses végétales décrites ci-dessus sont basées sur un ou des objectifs précis à atteindre, qui sont propres à chaque méthode. Chaque méthode est fondée sur une ou plusieurs hypothèses et néglige des facteurs qui n'ont pas d'intérêts dans le domaine d'application pour lequel elle a été optimisée.

Les méthodes globales comme celle de Van Soest, de Prosky, des polysaccharides non amylacés et d'Uppsala permettent le dosage de fractions insolubles. Ces fractions insolubles peuvent contenir un ou plusieurs types de polysaccharides structuraux des biomasses végétales dont la nature est connue. Ces méthodes globales ne renseignent pas sur la quantité relative d'un type de polysaccharide structural par rapport aux autres types de polysaccharides structuraux contenus dans la même fraction. Les méthodes quantifiant les polysaccharides structuraux par gravimétrie (méthode de Van Soest et de Prosky) (Tableau 1) ne donnent aucune information sur la composition en monosaccharides des polysaccharides structuraux. Ces deux méthodes se limitent simplement à déterminer la quantité de fibres alimentaires en y intégrant la lignine et les tannins insolubles à pH neutre. Les fractions isolées contiennent également des protéines insolubles au détergent neutre, des protéines insolubles au détergent acide ou non enzymatiquement hydrolysables, des pertes de diatomite (dans la méthode de Prosky) et des substances minérales (Prosky et al. 1985 ; Van Soest et al., 1985 ; Van Soest et al., 1991 ; Prosky et al. 1992), que l'analyse prend en compte par des dosages séparés. Pour les méthodes de dosage chromatographique et spectrophotométrique visible (méthode des polysaccharides non amylacés, d'Uppsala et de Selvendran) (Tableau 1), les valeurs obtenues pour les polysaccharides structuraux sont corrigées par les facteurs de dégradation des monosaccharides libérés pendant l'hydrolyse acide des polysaccharides en monosaccharides et les facteurs de conversion des polysaccharides en monosaccharides (Englyst et al., 1994 ; Theander et al., 1995). En plus de donner la nature des monosaccharides constituant les polysaccharides

structuraux par chromatographie et spectrophotométrie visible, la méthode de Selvendran fractionne sélectivement les polysaccharides structuraux en fonction de leur nature, c'est-à-dire les pectines de la lamelle mitoyenne, les pectines de la paroi primaire, les xylanes, les xyloglucanes, les mannanes et la cellulose (Selvendran et al., 1985). Les méthodes de Van Soest et des polysaccharides non amylacés permettent également de quantifier la cellulose (Van Soest et al., 1991 ; Englyst et al., 1994).

Tableau 1. Etapes des méthodes globales permettant de déterminer les polysaccharides structuraux des biomasses végétales (Prosky et al., 1985 ¹ ; Selvendran et al., 1985 ² ; Van Soest et al., 1985 ³ ; Prosky et al., 1992 ⁴ ; Englyst et al., 1994 ⁵ ; Asp, 1995 ⁶ ; Giger-Reverdin, 1995 ⁷ ; Theander et al., 1995 ⁸ ; Eriksson et al., 1997 ⁹)

Etapes	Van Soest ^{*,3,7}	Prosky ^{1,4,6}
Extraction et/ou hydrolyse de l'amidon	- 2-éthoxyéthanol	- α-amylase thermotolérante - Amyloglucosidase
Extraction et/ou hydrolyse des protéines	- Sulfite de sodium - Lauryle sulfate de sodium	- Protéase
Extraction des lipides	- Lauryle sulfate de sodium	- Ethanol - Acétone
Extraction des polysaccharides structuraux	- Extraction au détergent neutre et acide	- Précipitation à l'éthanol
Paramètres mesurés	- Hémicelluloses - Cellulose - Lignine	- Fibres totales - Fibres solubles - Fibres insolubles
Mesures	- Gravimétrique	
Corrections	- Protéines - Substances minérales	

Tableau 1 (Suite). Etapes des méthodes globales permettant de déterminer les polysaccharides structuraux des biomasses végétales (Prosky et al., 1985 ¹ ; Selvendran et al., 1985 ² ; Van Soest et al., 1985 ³ ; Prosky et al., 1992 ⁴ ; Englyst et al., 1994 ⁵ ; Asp, 1995 ⁶ ; Giger-Reverdin, 1995 ⁷ ; Theander et al., 1995 ⁸ ; Eriksson et al., 1997 ⁹)

Etapes	Polysaccharides non amylacés ^{5,6}	Uppsala ^{6,8}	Selvendran ^{2,9}
Extraction et/ou hydrolyse de l'amidon	- DMSO - α-amylase thermotolérante - Pancréatine et pullulanase	- α-amylase thermotolérante - Amyloglucosidase	- Phénol/Acide acétique/Eau - DMSO
Extraction et/ou hydrolyse des protéines	- Pancréatine		- SDS ou SDC - Phénol/Acide acétique/Eau
Extraction des lipides	- Ethanol - Acétone	- Ethanol - Acétone	- Phénol/Acide acétique/Eau
Extraction des polysaccharides structuraux	- Précipitation à l'éthanol - Hydrolyse acide des fractions isolées	- Précipitation à l'éthanol - Hydrolyse acide des fractions isolées	- CDTA - Extraction alcaline de force croissante - Hydrolyse acide des fractions isolées
Paramètres mesurés	- Fibres totales - Polysaccharides non amylacés solubles - Polysaccharides non amylacés insolubles - Cellulose	- Fibres totales - Lignine	- Fractions de pectines-mucilages-gommes - Fractions d'hémicelluloses - Cellulose
Mesures	- Chromatographique (gazeuse ou liquide) pour les monosaccharides avec ou sans spectrophotométrie pour les monosaccharides acides - Gravimétrie pour la lignine dans la méthode d'Uppsala		
Corrections	- Dégradation des monosaccharides libérés pendant l'hydrolyse acide des polysaccharides en monosaccharides - Facteurs de conversion des polysaccharides en monosaccharides - Substances minérales pour la lignine dans la méthode d'Uppsala		

Légende. CDTA : N,N,N',N'-tétraacétate cyclohexanediamine ; DMSO : Diméthylsulfoxyde ; SDC : Déoxycholate de sodium ; SDS : Dodécyl sulphate de sodium

Selon la méthode globale choisie, les polysaccharides structuraux isolés sont différents pour une biomasse végétale donnée (Tableau 2).

Tableau 2. Aptitude des méthodes à l'analyse de différents constituants des biomasses végétales et plus spécialement les hydrates de carbone (Prosky et al., 1985 ¹ ; Selvendran et al., 1985 ² ; Van Soest et al., 1985 ³ ; Prosky et al., 1992 ⁴ ; Englyst et al., 1994 ⁵ ; Asp, 1995 ⁶ ; Giger-Reverdin, 1995 ⁷ ; Theander et al., 1995 ⁸ ; Eriksson et al., 1997 ⁹)

Méthode	Hydrates de carbone				Protéines	Polyphénols
	Monosaccharides	Disaccharides	Oligosaccharides	Polysaccharides		
	Glucose Fructose	Saccharose	Fructooligosaccharides α-Galactooligosaccharides	Polyfructanes Pectines Mucilages et gommes Amidon non résistant Amidon résistant 1 (RS1) et 2 (RS2) Amidon résistant 3 (RS3) Hémicelluloses Cellulose	Protéines insolubles au détergent neutre ou non enzymatiquement hydrolysables	Tannins Lignine
Van Soest ^{*,3,7}	—			d d	b a	c c
Prosky ^{1,4,6}				b b	b b	c c
Polysaccharides non amylacés ^{5,6}				b b	b a	
Uppsala ^{7,8}				b b	b b	a
Selvendran ^{2,9}				b b	a a	

Légende a, Composé entièrement isolé de façon sélective et dosé par cette méthode
b, Composé entièrement isolé de façon non sélective et compris dans le dosage des fibres alimentaires (pour les méthode de Van Soest, de Prosky et d'Uppsala), des polysaccharides non amylacés (pour la méthode des polysaccharides non amylacés)

ou des fractions de pectines-mucilages-gommes (pour la méthode de Selvendran) par cette méthode

c, Composé partiellement isolé de façon non sélective et compris dans le dosage des fibres alimentaires par cette méthode

d, Composé non dosé par la méthode dont le fractionnement sélectif est cependant réalisé et dont le dosage est possible en adaptant la méthode

La méthode de Van Soest ne prend pas en compte les pectines, les gommes et les mucilages dans les fibres alimentaires sauf si les ADF n'ont pas subi de traitement au détergent neutre. Dans ce cas, certaines pectines sont comprises dans le dosage des ADF (Van Soest et al., 1991 ; Ampuero, 2008). Dans le cas des méthodes de Prosky, des polysaccharides non amylacés et d'Uppsala, les pectines, les gommes et les mucilages font partie des fibres alimentaires. Les fibres alimentaires peuvent être séparées en fibres solubles et fibres insolubles dans l'eau mais sans que les polysaccharides constituant chaque fraction soient isolés les uns des autres. Les pectines, les mucilages et les gommes hydrosolubles ne sont pas précipités par l'éthanol et ne font donc pas partie des fibres alimentaires (Asp, 1995). Dans la méthode de Selvendran, les pectines sont extraites sélectivement en pectines de la lamelle mitoyenne et en pectines de la paroi primaire. Les mucilages et les gommes hydrosolubles ont une solubilité dans l'eau similaire aux pectines. Si ces mucilages et ces gommes sont présents dans un échantillon, alors ils se retrouveront dans les fractions pectiques. Les mucilages et les gommes neutres peuvent être séparés des pectines par chromatographie d'échange d'anions. S'ils sont acides, leur séparation par rapport aux pectines dépend de leur teneur en acides uroniques.

L'amidon, polysaccharide non structural, est considéré de différentes manières selon les méthodes. Les méthodes de Van Soest, des polysaccharides non amylacés et de Selvendran éliminent tout l'amidon. Par contre, celles de Prosky et d'Uppsala hydrolysent l'amidon non résistant, l'amidon résistant 1 (RS1) et l'amidon résistant 2 (RS2) mais pas l'amidon résistant 3 (RS3) qui est donc compris dans les fibres alimentaires (Van Soest et al., 1985 ; Van Soest et al., 1991 ; Asp, 1995 ; Englyst et al.1996 ; FAO, 2007)

Les méthodes globales peuvent être résumées de la manière suivante :

- La méthode de Van Soest (Figure 2) ne prend pas en compte les pectines, les gommes et les mucilages, ne donne pas d'information sur la nature des hémicelluloses contenues dans les NDF et fournit des données comme la quantité de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine avec des tannins insolubles à pH acide. Les fractions de NDF et d'ADF ne contiennent pas de polysaccharides non structuraux. Cette méthode est utilisée dans le cadre du dosage des fibres alimentaires pour les ruminants, ainsi que pour les non-ruminants si l'aliment ne contient pas trop d'amidon. Dans le cas contraire, la variante de Mertens (2002) de la méthode de Van Soest est employée (voir le point 2.1 pour plus de détails).
- La méthode de Prosky (Figure 3) extrait des fractions qui contiennent des polysaccharides structuraux, des polysaccharides non structuraux (mucilages, gommes et amidon résistant 3) et d'autres composés comme de la lignine, des tannins, des protéines et des substances minérales. Elle ne donne aucune information sur la structure (cellulose, hémicelluloses et pectines) et la composition en monosaccharides des polysaccharides structuraux isolés des fibres alimentaires. La seule information disponible par cette méthode est le caractère soluble ou insoluble des fibres alimentaires dans l'eau à pH neutre. Cette méthode est utilisée dans le domaine du dosage des fibres alimentaires en alimentation humaine.
- La méthode des polysaccharides non amylacés (Figure 4) extrait des fractions qui contiennent des polysaccharides structuraux, dose la cellulose, quantifie les monosaccharides constituant les polysaccharides structuraux isolés et sépare les polysaccharides non amylacés solubles et insolubles dans l'eau à pH neutre. Elle ne permet pas de différencier les hémicelluloses, les pectines, les gommes et les mucilages dans les fractions extraites. Cette méthode est employée afin de doser les polysaccharides non amylacés sans ambiguïté.
- La méthode d'Uppsala (Figure 5) isole des fractions formées des mêmes constituants que celle de Prosky. La méthode d'Uppsala quantifie les monosaccharides constituant les polysaccharides isolés. Dans la fraction insoluble, cette méthode dose la lignine de Klason. Elle ne permet pas de différencier la cellulose, les hémicelluloses, les pectines, les gommes et les mucilages dans les fractions extraites. Cette méthode est utilisée dans le contexte

des fibres alimentaires en alimentation humaine.

- La méthode de Selvendran (Figure 6) extrait sélectivement les pectines avec les mucilages et les gommés, les xylanes, les xyloglucanes, les mannanes et la cellulose. Les polysaccharides neutres peuvent être séparés des polysaccharides acides par une chromatographie d'échange d'anions. Elle permet de quantifier les monosaccharides constituant les polysaccharides structuraux isolés. Cette méthode extrait sélectivement les principaux types de polysaccharides structuraux et en détermine la composition. Du fait du nombre important d'étapes d'extraction, l'analyse d'un échantillon est de longue durée mais apporte une quantité d'information importante concernant les polysaccharides structuraux.

Le classement des méthodes en ordre croissant des données qu'elles apportent sur la nature des polysaccharides structuraux est le suivant : la méthode de Prosky, d'Uppsala, des polysaccharides non amylacés, de Van Soest et de Selvendran. Le classement des méthodes en ordre croissant du temps d'analyse pour l'analyse des polysaccharides structuraux est le suivant : la méthode de Prosky, des polysaccharides non amylacés, d'Uppsala, de Van Soest et de Selvendran. La méthode de Van Soest présente à notre avis le meilleur compromis entre l'analyse des polysaccharides structuraux constituant la biomasse végétale et le temps d'analyse pour parvenir à obtenir cette information. Elle permet d'isoler en un minimum de temps des fractions dont trois qui sont majoritairement composées respectivement des pectines-mucilages-gommés, des hémicelluloses et de cellulose. La fraction contenant les pectines-mucilages-gommés n'est pas quantifiée par cette méthode. Les pectines de cette fraction pourraient être séparées des mucilages et des gommés neutres par chromatographie d'échange d'anions. Si les gommés et les mucilages sont acides, leur séparation par rapport aux pectines dépend de leur teneur en acides uroniques. L'acide galacturonique, un acide uronique constituant majoritaire des pectines, pourrait être quantifié dans la fraction de pectines purifiées en appliquant le protocole de dosage des acides uroniques par chromatographie liquide de la méthode des polysaccharides non amylacés. Pour apporter des données sur la composition en monosaccharides des polysaccharides structuraux des biomasses végétales, la méthode de Van Soest pourrait être mise en œuvre pour préparer les différentes fractions qui pourraient ensuite être hydrolysées en vue d'un

dosage des monosaccharides par chromatographie analytique (comme dans la méthode des polysaccharides non amylacés et d'Uppsala). La méthode de Van Soest pourrait aussi apporter des données sur les hydrates de carbone non structuraux (mono/di/oligo-saccharides, amidon et fructanes) si ceux-ci sont isolés préalablement à l'extraction au détergent neutre. Afin de réaliser cette extraction des hydrates de carbone non structuraux, le protocole de Hoebregs (1997) ou celui de McCleary (2004) pourraient être adaptés et appliqués. Ces méthodes permettent d'extraire les mono/di/oligo-saccharides, les fructanes et l'amidon à l'aide d'eau à pH neutre à 85°C pendant 10 min selon le protocole de Hoebregs ou à 80°C pendant 15 min selon le protocole de McCleary.

4. Conclusions

Vu la diversité et la complexité des polysaccharides structuraux contenus dans les biomasses végétales, la détermination de leur structure et de leur composition en monosaccharides est à effectuer par une méthode éliminant les hydrates de carbone non structuraux ainsi que la lignine. Cette détermination doit également permettre de déterminer sélectivement les polysaccharides structuraux dont les fractions isolées sont hydrolysées puis analysées par chromatographie analytique. Les fractions extraites peuvent éventuellement être purifiées par chromatographie préparative d'échange d'anions. Cela permet de séparer les polysaccharides neutres des polysaccharides acides. Pour les échantillons fortement lignifiés, afin de rendre le réseau de cellulose et des hémicelluloses plus accessible à l'extraction des polysaccharides structuraux, il est préférable d'intégrer une étape de délignification dans la méthode de fractionnement.

La méthode de Van Soest est la méthode présentant à notre avis le meilleur compromis entre les données obtenues sur la nature des polysaccharides structuraux constituant les biomasses végétales et le temps d'analyse pour parvenir à obtenir cette information. En adaptant cette méthode, elle pourrait contribuer à apporter des données sur la quantité de pectines (exprimée en acide galacturonique), sur la composition en monosaccharides des polysaccharides structuraux et sur les hydrates de carbone non structuraux.

Actuellement, il n'existe pas assez de données pertinentes dans la littérature

comparant l'utilisation des méthodes globales présentées sur un même échantillon ou sur des échantillons semblables de biomasse végétale.

Bibliographie

- Ampuero S., 2008.** *Détermination de la teneur en fibres dans les aliments pour animaux à ALP*. Posieux, France : ALP Posieux.
- AOAC, 1990.** *Official Methods of Analysis*, 15th edition. Washington D.C., USA : Association of Official Analytical Chemist.
- Asp N.-G., 1995.** Dietary fibre analysis - an overview. *Eur. J. of Clin. Nutr.*, **49**(Suppl. 3), S42-S47.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall. In: Buchanan B., Gruissem W. & Jones R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA : American Society of Plant Physiologists, 52-108.
- Chai W. & Udén P., 1998.** An alternative oven method combined with different strengths in the analysis of neutral detergent fibre. *Animal Feed Sci. and Technol.*, **74**, 281-288.
- Collings G., Yokoyama M. & Bergen W., 1978.** Lignin as Determined by Oxidation with Sodium Chlorite and a Comparison with Permanganate Lignin. *J. Dairy Sci.*, **61**, 1156-1160.
- Cutillas-Iturralde A., Peña M., Zarra I. & Lorences E., 1998.** Xyloglucan from persimmon fruit cell walls. *Phytochemistry*, **48**(4), 607-610.
- Dorleans M., Mandran N. & Sauvant D., 1996.** Study of the use of a protease with the Van Soest procedure. *Animal Feed Sci. Technol.*, **61**, 129-136.
- Ebringerová A. Hromádková Z. & Heinze T., 2005.** Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.*, **186**, 1-67.
- Englyst H., Quigley M. & Hudson G., 1994.** Determination of Dietary Fibre as Non-starch Polysaccharides With Gas-Liquid Chromatographic, High-performance Liquid Chromatographic or Spectrophotometric Measurement of Constituent Sugars. *Analyst*, **119**, 1497-1509.
- Englyst H. & Hudson G., 1996.** The classification and measurement of dietary carbohydrates. *Food Chem.*, **57**(1), 15-21.
- Eriksson I., Andersson R. & Aman P., 1997.** Extraction of pectic substances form

dehulled rapeseed. *Carbohydr. Resarch*, **301**, 177-185.

Fang J., Sun R., Salisbury D., Fowler P. & Tomkinson J., 1999. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polymer Degradation and Stability*, **66**, 423-432.

FAO, 2007. *Directives concernant l'utilisation des allégations relatives à la nutrition : Projet de tableau des conditions applicables à la teneur en éléments nutritifs (Partie B : Fibres alimentaires) à l'étape 6.* Roma, Italie : FAO.

Genestie B., 2006. Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales : Approches méthodologiques. Thèse de doctorat : Université de Limoges (France).

Giger-Reverdin S., 1995. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **55**, 295-334.

Grabber J., 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability ? *Crop Sci.*, **45**, 820-831.

Hatfield R., Jung H.-J., Ralph J., Buxton D. & Weimer P., 1994. A Comparison of the Insoluble Residues Produced by the Klason Lignin and Acid Detergent Lignin Procedures. *J. Sci. Food Agric.*, **65**, 51-58.

Hoebregs H., 1997. Fructans in Foods and Food Products, Ion-Exchange Chromatographic Method: Collaborative Study. *AOAC International J.*, **80**(5), 1029-1037.

Izydorczyk M., Macri L. & MacGregor A., 1998a. Structure and physiochemical properties of barley non-starch polysaccharides - I. Water-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydr. Polymers*, **35**, 249-258.

Izydorczyk M., Macri L. & MacGregor A., 1998b. Structure and physiochemical properties of barley non-starch polysaccharides - II. Alkali-extractable β -glucans and arabinoxylans. *Carbohydr. Polymers*, **35**, 259-269.

Jung H.-J., 1997. Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. *The J. of Nutr.*, **127**(5), 810S-813S.

Le Goff A., Renard C., Bonnin E. & Thibault J.-F., 2001. Extraction, purification and chemical characterisation xylogalacturonans from pea hulls. *Carbohydr. Polymers*, **45**, 325-334.

Lee S., Prosky L. & De Vries J., 1992. Determination of Total, Soluble, and Insolubles Dietary Fiber in Foods-Enzymatic-Gravimetric Method, MES-TRIS

Buffer: Collaborative Study. *AOAC International J.*, **75**(3), 395-416.

McCleary B. & Monaghan D., 2002. Measurement of Resistant Starch. *AOAC International J.*, **85**(2), 665-675.

McCleary B. & Rossiter P., 2004. Measurement of Novel Dietary Fibers. *AOAC International J.*, **87**(4), 707-717.

Morrison I., 1980. Hemicellulosic Contamination of Acid Detergent Residues and Their Replacement by Cellulose Residues in Cell Wall Analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 639-645.

Mertens D., 2002. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. *AOAC International J.*, **85**(6), 1217-1240.

Prosky L., Asp N.-G., Furda I., De Vries J., Schweizer T. & Harland B., 1985. Determination of Total Dietary Fiber in Foods and Food Products : Collaborative Study. *AOAC J.*, **68**(4), 677-679.

Prosky L., Asp N.-G., Schweizer T., De Vries J. & Furda I., 1992. Determination of Insoluble and Soluble Dietary Fiber in Foods and Food Products : Collaborative Study. *AOAC International J.*, **75**(2), 360-367.

Selvendran R. & O'Neill M., 1985. Isolation and Analysis of Cell Walls from Plant Material. In: Glick D., eds. *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 32. New York : Wiley, 25-153.

Southgate D., 1995. *Dietary fibre analysis*, Cambridge, UK : The Royal Society of Chemistry.

Sun R., Lawther M. & Banks W., 1995. Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Industrial Crops and Prod.*, **4**, 127-145.

Teixeira L., Linden J. & Schroeder A., 1999. Alkaline and Peracetic Acid Pretreatments of Biomass for Ethanol Production. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, **77-79**, 19-34.

Theander O., Aman P., Westerlund E., Andersson R. & Pettersson D., 1995. Total Dietary Fiber Determined as Neutral Sugar Residues Uronic Acid Residues, and Klason Lignin (The Uppsala Method): Collaborative Study. *AOAC International J.*, **78**(4), 1030-1044.

Van Soest P. & Robertson J., 1985. *Analysis of forages and fibrous foods*. Ithaca, USA : Department of Animal Science, Cornell University.

Van Soest P., Robertson J. & Lewis B., 1991. Methods for Dietary Fiber, Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3583-3597.

Zhang Y.-H., 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 367–375.

Partie 1

Chapitre 4

Hydrolyse acide analytique de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses végétales et dosage des monosaccharides libérés par LC-CAD

Mots-clés. Cellulose, Hémicelluloses, Monosaccharides, Hydrolyse analytique à l'acide, Chromatographie liquide

1. Hydrolyse acide analytique de la cellulose et des hémicelluloses

La biomasse végétale est essentiellement constituée de polysaccharides structuraux, la cellulose, les hémicelluloses (xylane, xyloglucane, β -glucane et mannane) et les pectines (homogalacturonane, xylogalacturonane, rhamnogalacturonane type I et type II). Ces constituants sont liés à la lignine et aux protéines pariétales pour former la paroi cellulaire des plantes. La cellulose est uniquement composée de β -D-glucose (Carpita et al., 2000). Par contre, les hémicelluloses et les pectines ont des compositions monosaccharidiques variables (Carpita et al., 2000) en :

- Hexoses (β -D-glucose, α -D-galactose, β -D-mannose) ;
- Pentoses (β -D-xyloses, α -L-arabinose) ;
- Acide uroniques (acide α -D-galacturonique, acide β -D-glucuronique, acide α -D-4-O-glucuronique) ;
- Faibles quantités de déoxyhexoses (α -L-rhamnose, α -L-fucose).

Ces monosaccharides sont liés entre eux par des liaisons covalentes osidiques. La chaîne principale des hémicelluloses est composée (Carpita et al., 2000) soit de :

- β -D-glucose dans les xyloglucanes ;
- β -D-xylose dans les xylanes
- β -D-mannose dans les galactomannanes ;
- β -D-mannose et β -D-glucose dans les galactoglucomannanes.

Par contre, la chaîne principale des pectines est uniquement composée d'acide D-galacturonique, sauf dans les rhamnogalacturonanes où la chaîne principale est formée d'une succession de dimères constitués d'une unité d'acide D-galacturonique liée à une unité de L-rhamnose (Carpita et al., 2000).

Pour le dosage de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses végétales, l'objectif des méthodes d'hydrolyse acide analytique est de rompre les liaisons

osidiques de ces polysaccharides afin de les dépolymériser en monosaccharides (Willför et al., 2009). Ainsi, les monosaccharides libérés peuvent être dosés par chromatographie gazeuse (GC), par chromatographie liquide (LC) ou par électrophorèse capillaire (Willför et al., 2009). Il existe des barrières physiques et chimiques à l'hydrolyse acide. La barrière physique est due à la présence de la lignine et à la cristallinité de la cellulose (De Ruiter et al., 1992 ; Hoebler et al., 1989). Un broyage fin (particules d'une taille inférieure à 1 mm) de la biomasse permet de surpasser cet obstacle sans dégrader les polysaccharides structuraux en (De Ruiter et al., 1992 ; Hoebler et al., 1989):

- Diminuant la cristallinité de la cellulose ;
- Diminuant les liaisons entre la lignine et les polysaccharides structuraux ;
- Diminuant la taille des particules ;
- Augmentant la surface spécifique.

La barrière chimique est due à la nature des liaisons osidiques qui n'ont pas toutes la même sensibilité à l'hydrolyse en milieu acide. Les liaisons osidiques entre les acides uroniques sont plus résistantes à l'hydrolyse acide que les liaisons osidiques entre d'autres monosaccharides (De Ruiter et al., 1992 ; Willför et al. 2009). Un monosaccharide a une résistance à la dégradation (déshydratation) en milieu acide qui dépend de sa nature. Les pentoses sont les monosaccharides les moins résistants à la dégradation en milieu acide (Willför et al. 2009). En milieu acide, les hexoses se dégradent en hydroxyméthylfurfural et les pentoses se dégradent en furfural (Willför et al. 2009). L'objectif poursuivi par une méthode d'hydrolyse acide analytique de la cellulose et des hémicelluloses est de trouver le meilleur compromis entre la dépolymérisation totale de la cellulose et des hémicelluloses en monosaccharides, et une dégradation minimale des monosaccharides libérés. Ce compromis est caractérisé par les paramètres du milieu réactionnel comme le type d'acide, de la concentration d'acide, de la durée et de la température d'hydrolyse (Hoebler et al., 1989 ; De Ruiter et al., 1992). Les méthodes d'hydrolyse acide analytique les plus utilisées sont celles à l'acide sulfurique (Hoebler et al., 1989 ; Selvendran et al., 1979 ; Englyst et al., 1992 ; Quigley et al., 1994 ; Theander et al., 1995 ; Sluiter et al., 2008 ; Willför et al., 2009), à l'acide trifluoroacétique (Barton et al., 1982 ; De Ruiter et al., 1992) et de méthanolyse dans l'acide chlorhydrique (De Ruiter et al., 1992 ; Willför et al., 2009). Une méthode d'hydrolyse enzymatique analytique existe

également mais elle nécessite une biomasse délignifiée (Willför et al., 2009).

Préalablement à l'hydrolyse acide analytique de la cellulose et des hémicelluloses, il est nécessaire d'éliminer les substances contenues dans la biomasse pouvant biaiser et interférer avec l'hydrolyse acide analytique. La teneur en matière sèche de l'échantillon doit être supérieure à 90% afin de ne pas diluer l'acide (Sluiter et al., 2005). La teneur en substances minérales de l'échantillon doit être inférieure à 10% afin que la matière minérale de l'échantillon n'interfère pas avec l'acide et ne catalyse pas des réactions parallèles (Sluiter et al., 2005). Les substances hydrosolubles (hydrates de carbone non structuraux, substances inorganiques hydrosolubles, substances organiques hydrosolubles, protéines hydrosolubles) doivent être extraites à l'eau afin de ne pas biaiser l'hydrolyse acide et le dosage des monosaccharides venant de la cellulose et des hémicelluloses (Englyst et al., 1992 ; Sluiter et al., 2005). Les substances liposolubles (chlorophylles et lipides) doivent être extraites par des solvants organiques comme l'acétone ou l'éther de pétrole afin de ne pas biaiser l'hydrolyse acide de la cellulose et des hémicelluloses (Englyst et al., 1992 ; Sluiter et al., 2005).

Les différentes méthodes d'hydrolyse acide analytique des de cellulose et des hémicelluloses sont souvent citées dans la littérature mais elles sont rarement comparées. L'objectif de la première partie de cette revue est de déterminer, sur base bibliographique, la méthode d'hydrolyse acide analytique de la cellulose et des hémicelluloses présentant le meilleur compromis entre la dépolymérisation totale de ces polysaccharides structuraux en monosaccharides et une dégradation minimale des monosaccharides libérés.

1.1. Méthodes d'hydrolyse acide analytique

Méthode à l'acide sulfurique

La méthode d'hydrolyse analytique à l'acide sulfurique de la cellulose et des hémicelluloses est constituée de deux étapes. Une première étape de solubilisation de la cellulose par de l'acide sulfurique concentré à basse température (Tableau 1). Une deuxième étape d'hydrolyse de ces polysaccharides structuraux en monosaccharides par de l'acide sulfurique dilué à haute température (Tableau 1). Si

la première étape n'est pas effectuée seules les hémicelluloses sont hydrolysées en monosaccharides. Le dosage des monosaccharides libérés est effectué par chromatographie liquide (LC) ou par chromatographie gazeuse (GC) après une dérivatisation des monosaccharides, par exemple, en acétate d'alditol (Southgate et al., 1995 ; Willför et al., 2009). Cette hydrolyse analytique à l'acide sulfurique de la cellulose et des hémicelluloses peut être effectuée de différentes manières.

Le premier mode opératoire qui a été mis au point est celui de Saeman. La première et la deuxième étape sont réalisées, respectivement, par de l'acide sulfurique 24,4 N à 20°C pendant 3 h et par de l'acide sulfurique 2 N à 100°C pendant 2 h (Variante 1) (Selvendran et al., 1979). Ce mode opératoire a été optimisé pour le dosage des hexoses issus de biomasses venant d'essences forestières. Ce protocole engendre une importante dégradation des pentoses libérés lors de la deuxième étape (Hoebler et al., 1989).

Dans le mode opératoire de Hoebler (1989) (Variante 2), la première et la deuxième étape sont réalisées, respectivement, par de l'acide sulfurique 24,4 N à 25°C pendant 30 min et par de l'acide sulfurique 2 N à 100°C pendant 2 h. Si la température de la première étape est de 30°C au lieu de 25°C, les teneurs en monosaccharides sont légèrement plus faibles. Si la durée de la première étape est de 1 h à 25°C au lieu de 30 min à 25°C, les teneurs en monosaccharides restent semblables.

Dans le mode opératoire d'Englyst (1992) (Variante 3), la première et la deuxième étape sont effectuées, respectivement, par de l'acide sulfurique 24 N à 35°C pendant 1 h et par de l'acide sulfurique 4 N à 100°C pendant 1 h. Si la durée de la première étape est de 30 min à 35°C au lieu de 1 h à 35°C, les teneurs en monosaccharides sont légèrement plus faibles.

Dans le mode opératoire de Theander (1995) (Variante 4), la première et la deuxième étape sont réalisées, respectivement, par de l'acide sulfurique 24 N à 30°C pendant 1 h et par de l'acide sulfurique 0,83 N à 125°C pendant 1 h.

Dans le mode opératoire de Sluiter (2008) (Variante 5), la première et la deuxième étape sont effectuées, respectivement, par de l'acide sulfurique 24,4 N à 30°C pendant 1 h et par de l'acide sulfurique 0,84 N à 121°C pendant 1 h.

Dans le mode opératoire de Quigley (1994) (Variante 6), la première et la deuxième étape sont effectuées, respectivement, à l'acide sulfurique 24 N à 35°C pendant 30 min et à l'acide sulfurique 4 N à 100°C pendant 3 h. Ce mode opératoire a été

optimisé pour la détermination des monosaccharides issus des pectines de biomasses végétales. Il permet de maximiser la quantité d'acide D-galacturonique libéré tout en minimisant sa dégradation. Néanmoins la dégradation de l'acide D-galacturonique libéré y est importante.

Les modes opératoires de Hoebler (1989), d'Englyst (1992), de Theander (1995) et de Sluiter (2008) ont été optimisés pour le dosage des monosaccharides issus de la cellulose, des hémicelluloses et des pectines (seulement les hexoses et les pentoses) de diverses biomasses. Ils permettent de maximiser la quantité d'hexoses et de pentoses libérés en minimisant leurs dégradations en, respectivement, hydroxyméthylfurfural et furfural, lors de la deuxième étape. Ils minimisent la quantité d'hexoses et de pentoses restant sous la forme d'ester sulfurique de glucose produits lors de la première étape. Si l'hydrolyse par de l'acide sulfurique de la deuxième étape est trop douce (température trop basse et/ou durée trop courte de la deuxième étape), une partie des hexoses et pentoses reste sous la forme d'esters sulfurique de monosaccharide (Hoebler et al., 1989 ; Englyst et al., 1992). Pour doser la cellulose et le glucane hémicellulosique par les méthodes citées ci-dessus, il est nécessaire de réaliser l'analyse en (Englyst et al., 1994) :

- Deux étapes comme décrites ci-dessus afin de doser le glucane total venant de la cellulose et des hémicelluloses ;
- Une seule étape (uniquement la deuxième étape sans la solubilisation de la cellulose) afin de doser le glucane hémicellulosique venant des hémicelluloses.

La cellulose est ensuite déterminée en faisant la différence entre le glucane total et le glucane hémicellulosique (Englyst et al., 1994).

Méthode à l'acide trifluoroacétique

La méthode d'hydrolyse analytique à l'acide trifluoroacétique de la cellulose et des hémicelluloses consiste en une étape d'hydrolyse de ces polysaccharides structuraux en monosaccharides par de l'acide trifluoroacétique dilué à haute température, 121°C (Tableau 1). Dans le mode opératoire de Barton (1982), l'hydrolyse acide est réalisée par de l'acide trifluoroacétique 4 N à 121°C pendant 1 h (Variante 7). Le dosage des monosaccharides libérés est effectué par chromatographie liquide (LC) ou par chromatographie gazeuse (GC) avec une

dérivatisation des monosaccharides, par exemple, en acétate d'alditol (Barton et al., 1982 ; De Ruiter et al., 1992).

Le mode opératoire de Barton a été optimisé pour la détermination des monosaccharides issus des hémicelluloses de biomasses. Il permet de maximiser la quantité d'hexoses et de pentoses libérés en minimisant leurs dégradations (Barton et al., 1982 ; De Ruiter et al., 1992).

Méthode de méthanolyse dans l'acide chlorhydrique

La méthode de méthanolyse analytique dans l'acide chlorhydrique de la cellulose et des hémicelluloses est constituée de deux étapes. Une première étape d'hydrolyse de ces polysaccharides structuraux en oligosaccharides et monosaccharides par de l'acide chlorhydrique dilué anhydre méthanolique à haute température (Tableau 1). Une deuxième étape d'hydrolyse des oligosaccharides en monosaccharides et de déméthylation des méthylglucosides, formés lors de la première étape, en monosaccharide par de l'acide trifluoroacétique dilué à haute température (Tableau 1). Dans le mode opératoire de De Ruiter (1992), la première et la deuxième étape sont réalisées, respectivement, par de l'acide chlorhydrique 4 N anhydre méthanolique à 80°C pendant 16h et à l'acide trifluoroacétique 2 N à 121°C pendant 1 h (Variante 8). Le dosage des monosaccharides libérés est effectué par chromatographie liquide (LC) ou par chromatographie gazeuse (GC) avec une dérivatisation des monosaccharides, par exemple, en acétate d'alditol (De Ruiter et al., 1992).

Le mode opératoire de De Ruiter (1992) a été optimisé pour la détermination des monosaccharides issus des hémicelluloses et des pectines de biomasses. Il permet de maximiser la quantité d'hexoses et de pentoses libérés en minimisant leurs dégradations et en minimisant la quantité d'hexoses et de pentoses restant sous la forme de méthylglucosides produits lors de la première étape (De Ruiter et al., 1992 ; Willför et al., 2009).

Tableau 1. Méthodes d'hydrolyse acide analytique des polysaccharides structuraux (Selvendran et al., 1979 ¹ ; Hoebler et al., 1989 ² ; Englyst et al., 1992 ³ ; Theander et al., 1995 ⁴ ; Sluiter et al., 2008 ⁵ ; Quigley et al., 1994 ⁶ ; Barton et al., 1982 ⁷ ; De Ruiter et al., 1992 ⁸)

Méthode analytique	Première étape	Deuxième étape	Paramètres mesurés
Variante 1 (Saeman ¹)	H ₂ SO ₄ 24,4 N 20°C 3 h	H ₂ SO ₄ 0,84 N 100°C 2 h	- Cellulose - Hémicelluloses (hexoses) - Pectines (hexoses)
Variante 2 (Hoebler ²)	H ₂ SO ₄ 24,4 N 25°C 30 min	H ₂ SO ₄ 2 N 100°C 2 h	- Cellulose - Hémicelluloses (hexoses et pentoses) - Pectines (hexoses et pentoses)
Variante 3 (Englyst ³)	H ₂ SO ₄ 24 N 35°C 1 h	H ₂ SO ₄ 4 N 100°C 1 h	- Cellulose - Hémicelluloses (hexoses et pentoses) - Pectines (hexoses et pentoses)
Variante 4 (Theander ⁴)	H ₂ SO ₄ 24 N 30°C 1 h	H ₂ SO ₄ 0,83 N 125°C 1 h	- Cellulose - Hémicelluloses (hexoses et pentose) - Pectines (hexoses et pentoses)
Variante 5 (Sluiter ⁵)	H ₂ SO ₄ 24,4 N 30°C 1 h	H ₂ SO ₄ 0,84 N 121°C 1 h	- Cellulose - Hémicelluloses (hexoses et pentose) - Pectines (hexoses et pentoses)
Variante 6 (Quigley ⁶)	H ₂ SO ₄ 24 N 35°C 30 min	H ₂ SO ₄ 4 N 100°C 3 h	- Pectines (D-acide galacturonique)
Variante 7 (Barton ⁷)	Acide trifluoroacétique 4 N 121°C 1 h		- Hémicelluloses (hexoses et pentoses) - Pectines (hexoses et pentoses)
Variante 8 (De Ruiter ⁸)	HCl 4 N anhydre méthanolique 80°C 16 h	Acide trifluoroacétique 4 N 121°C 1 h	- Hémicelluloses (hexoses, pentose et acides uroniques) - Pectines (D-acide galacturonique, hexoses et pentoses)

1.2. Comparaison des méthodes d'hydrolyse acide analytique

Les trois types de méthodes d'hydrolyse acide analytique permettent un dosage des monosaccharides libérés (hexoses, pentoses, acide D-galacturonique) par chromatographie gazeuse (GC) ou liquide (LC).

La méthode d'hydrolyse analytique à l'acide sulfurique (Tableau 1) de Hoebler, d'Englyst, de Theander et de Sluiter permet d'atteindre pour la cellulose et les hémicelluloses un compromis optimal entre l'hydrolyse totale de ces polysaccharides structuraux en monosaccharides et une dégradation minimale des monosaccharides libérés. L'augmentation de la température d'hydrolyse de la deuxième étape de cette méthode d'hydrolyse permet d'en raccourcir la durée. Cette réduction de cette durée respect ce compromis optimal si la concentration d'acide sulfurique de cette étape est réduite (Willför et al. 2009).

Les autres méthodes de type hydrolyse analytique à l'acide sulfurique permettent d'atteindre partiellement ce compromis. La méthode de Saeman (Tableau 1) est optimale pour le dosage de la cellulose et des hexoses venant des hémicelluloses et des pectines (Hoebler et al., 1989 ; Willför et al. 2009). Néanmoins, elle n'est pas optimale pour le dosage des pentoses venant des hémicelluloses (Hoebler et al., 1989 ; Willför et al. 2009). La méthode de Quigley (Tableau 1) est uniquement optimale pour le dosage de l'acide D-galacturonique venant des pectines (Englyst et al., 1992 ; Quigley et al., 1994). Toutefois, elle n'est pas optimale pour le dosage de la celluloses et des hémicelluloses (Englyst et al., 1992 ; Quigley et al., 1994). De plus, la dégradation de l'acide D-galacturonique y est importante.

La méthode de type hydrolyse analytique à l'acide trifluoroacétique (Tableau 1) est optimale uniquement pour le dosage des hexoses et des pentoses venant des hémicelluloses et des pectines (Barton et al., 1982). Elle ne permet pas de doser la cellulose (Barton et al., 1982).

La méthode de type méthanolyse dans l'acide chlorhydrique (Tableau 1) est optimale uniquement pour le dosage des hexoses, des pentoses et des acides uroniques venant des hémicelluloses et des pectines (De Ruiter et al., 1992 ; Willför

et al. 2009). Elle ne permet pas le dosage de la cellulose (De Ruiter et al., 1992 ; Willför et al. 2009).

Pour prendre en compte la dégradation des monosaccharides venant des de cellulose et des hémicelluloses, il est nécessaire de traiter en parallèle aux échantillons analysés un mélange de référence standard de monosaccharides. Il serait préférable d'utiliser des oligosaccharides ou de la cellulose et des hémicelluloses comme standards au lieu des monosaccharides standards. Cela n'est pas réalisable car ils n'en existent aucun de techniquement adéquat et commercialement disponible (Willför et al., 2009).

2. Dosage des monosaccharides libérés par hydrolyse à l'acide sulfurique par LC-CAD

Les principaux monosaccharides (D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose) libérés par hydrolyse à l'acide sulfurique de la cellulose et des hémicelluloses de biomasses sont habituellement séparés par chromatographie gazeuse (GC) ou chromatographie liquide (LC) (Englyst et al., 1994). L'inconvénient majeur de la chromatographie gazeuse est qu'elle nécessite la dérivation chimique des monosaccharides pour les transformer en des composés volatils (Englyst et al., 1994). De nombreuses colonnes LC de différentes natures existent afin de séparer ces monosaccharides par chromatographie liquide. Ces colonnes sont principalement la :

- Colonne de silice greffée par des groupements aminopropyles (McGinnis et al., 1988) ;
- Colonne polymérique greffée par des groupements aminopropyles (Agblevor et al., 2004) ;
- Colonne polymérique échangeuse forte d'anions (Englyst et al., 1994) ;
- Colonne polymérique sulfonée greffée par du plomb (McGinnis et al., 1988).

Les détecteurs utilisés afin de doser ces monosaccharides suite à leur séparation par chromatographie liquide sont généralement le détecteur à :

- Indice de réfraction (RI) (Sluiter et al., 2008) ;
- Ampérométrie pulsé (PAD) (Englyst et al., 1994) ;
- Diffusion de la lumière après évaporation (ELSD) (Agblevor et al., 2004).

Le détecteur d'aérosol chargé (CAD) est un nouveau type de détecteur permettant le dosage des monosaccharides séparés par chromatographie liquide (Gamache et al., 2005 ; ESA Biosciences, 2011).

L'objectif de la deuxième partie de cette revue est de présenter les différentes colonnes LC permettant de séparer les principaux monosaccharides (D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose) libérés par hydrolyse à l'acide sulfurique de la cellulose et des hémicelluloses. L'intérêt de cette partie est de déterminer les colonnes les plus optimales à cet effet. Le but de la deuxième partie de cette synthèse est également d'exposer le fonctionnement du CAD et de comparer les caractéristiques de ce détecteur aux autres détecteurs LC.

2.1. Séparation par chromatographie liquide des monosaccharides

Colonne LC de silice greffée par des groupements aminopropyles

La colonne LC en silice greffée est formée de particules de 5 μm avec des groupements aminopropyles. Elle est utilisée à température ambiante avec comme phase mobile un mélange d'eau déionisée/acétonitrile 15:85 (v:v). Cette séparation se réalise grâce aux interactions polaires entre les groupements hydroxyles des monosaccharides, les groupements aminopropyles de la phase stationnaire et la phase mobile (McGinnis et al., 1988 ; Slimestad et al., 2006). Cette colonne permet de choisir différents ratios d'eau déionisée/acétonitrile pour la phase mobile et d'en effectuer des gradients (McGinnis et al., 1988 ; Slimestad et al., 2006). Elle supporte une pression allant jusqu'à 27,6 MPa. L'inconvénient majeur de cette colonne LC est que, dans ces conditions, elle relargue graduellement ses groupements aminopropyles. De ce fait, un bruit excessif est engendré au niveau de détecteurs ayant une étape de nébulisation comme le CAD, l'ELSD et le spectromètre de masse (MS) (McGinnis et al., 1988 ; Slimestad et al., 2006). Cette colonne LC est compatible avec des systèmes de détection comme le RI et l'UV (McGinnis et al., 1988). D'autres inconvénients de cette colonne sont que sa base de silice ne supporte pas les pH alcalins (McGinnis et al., 1988 ; Slimestad et al., 2006). Son utilisation engendre une consommation importante d'acétonitrile, un solvant organique pour

lequel il y a déjà eu une pénurie mondiale dans le passé.

Colonne LC polymérique greffée par des groupements aminopropyles

La colonne LC polymérique (polystyrène-divinylbenzène) est formée de particules de 5 μm avec des groupements aminopropyles comme, par exemple, la Prevail Carbohydrate ES de Grace Davison. Elle est utilisée à température ambiante avec comme phase mobile un mélange d'eau déionisée/acétonitrile 15:85 (v:v). Cette séparation des monosaccharides se réalise grâce au même principe que décrit pour la colonne LC de silice greffée par des groupements aminopropyles (Agblevor et al., 2004 ; Slimestad et al., 2006). Cette colonne permet de choisir différents ratios d'eau déionisée/acétonitrile dans la phase mobile et d'en effectuer des gradients (Agblevor et al., 2004 ; Slimestad et al., 2006). Les avantages de cette colonne sont qu'elle possède des greffons stables (Grace Davison, 2006) et supporte les pH extrêmes (Grace Davison, 2006). Elle est également compatible avec des systèmes de détection ayant une étape de nébulisation comme le CAD, l'ELSD et le MS (Grace Davison, 2006 ; ESA Biosciences, 2011). Notre expérience de l'analyse d'hydrolysats obtenus par hydrolyse à l'acide sulfurique de la cellulose et des hémicelluloses avec cette colonne montre que la séparation entre le L-arabinose et le D-xylose n'est pas acceptable (recouvrement de l'aire du pic du L-arabinose par le pic de D-xylose). Cela s'explique par le temps d'élution du D-xylose et du L-arabinose qui sont forts proches et qu'il y a respectivement des quantités importantes de D-xylose et faibles de L-arabinose dans ces hydrolysats. La même observation a été réalisée pour le D-glucose et le D-galactose qui, dans ces hydrolysats, ils sont présents, respectivement, en d'importantes et de faibles quantités (données non publiées). D'autres inconvénients de cette colonne sont que son utilisation engendre une consommation importante d'acétonitrile et qu'elle ne supporte pas une pression supérieure à 15,2 MPa (Grace Davison, 2006).

Colonne LC polymérique échangeuse forte d'anions

La colonne LC polymérique (polystyrène-divinylbenzène) échangeuse forte d'anions est formée de particules de 10 μm avec des groupements d'amines quaternaires comme, par exemple, la CarboPac PA1 de Dionex. Elle est utilisée à température ambiante avec comme phase mobile un gradient de NaOH de 0,2 N à

0,5 N (Englyst et al., 1994 ; Dionex Corporation, 2000). La concentration élevée en NaOH de la phase mobile est nécessaire pour ioniser les groupements hydroxyles des monosaccharides sous forme d'anions afin qu'ils soient efficacement séparés par cette colonne échangeuse forte d'anions. Pour ce faire, le pH de la phase mobile doit être supérieur à 12 (McGinnis et al., 1988 ; Dionex Corporation, 2000). Les avantages de cette colonne sont qu'elle supporte des pH extrêmes (Dionex Corporation, 2000) et une pression allant jusqu'à 27,6 MPa (Dionex Corporation, 2000). Un inconvénient important lié à l'utilisation de cette colonne est que la concentration importante de sodium dans la phase mobile engendre un bruit excessif au niveau de détecteurs ayant une étape de nébulisation comme le CAD, l'ELSD et le MS (Grace Davison, 2006 ; ESA Biosciences, 2011). Cette colonne est principalement utilisée avec des systèmes de détection PAD (Dionex Corporation, 2000). Un autre inconvénient de cette colonne est qu'elle peut uniquement être utilisée avec un système de chromatographie liquide spécifique appelé chromatographie liquide à échange d'anions à haute performance (HPAEC). Le système HPAEC est conçu en résine qui peut être utilisée avec une phase mobile à pH extrêmement élevé. Ce n'est pas le cas d'un système de chromatographie liquide classique (Dionex Corporation, 2000).

Colonne LC polymérique sulfonée greffée par du plomb

La colonne LC polymérique (polystyrène-divinylbenzène) sulfonée est formée de particules de 7 µm avec des groupements de plomb comme, par exemple, la CARBOSep CHO-682 de Transgenomic. Elle est utilisée à 80°C avec comme phase mobile de l'eau déionisée. La séparation optimale des monosaccharides se réalise grâce à deux types d'interaction. L'interaction primaire est l'exclusion selon la taille moléculaire qui permet de séparer les monosaccharides des autres molécules. L'interaction secondaire est l'interaction polaire entre les greffons de plomb et les groupements hydroxyles des monosaccharides qui permet de séparer ces derniers (Transgenomic, 2008). Les avantages de cette colonne sont la simplicité de la phase mobile et la stabilité des greffons (Bio-Rad, 2010). Elle est également compatible avec des systèmes de détection ayant une étape de nébulisation comme le CAD, l'ELSD et le MS (Grace Davison, 2006 ; ESA Biosciences, 2011). Les principaux inconvénients de cette colonne sont qu'elle ne

fonctionne qu'avec des pH entre 5 et 9 (Bio-Rad, 2010) et ne supporte pas une pression supérieure à 8,3 MPa (Transgenomic, 2008). Elle ne supporte que de faibles concentrations d'acétonitrile dans la phase mobile et donc des faibles gradients (Transgenomic, 2008). Elle doit être utilisée à température d'au moins 70°C sinon les pics de monosaccharides se dédoublent en leurs deux anomères (Slimestad et al., 2006). Notons que l'augmentation de la taille des particules de cette colonne engendre un recouvrement important entre le pic de L-arabinose et de D-mannose (Transgenomic, 2008). Il est également à remarquer que la substitution des greffons plomb par des greffons d'une autre nature comme le calcium ou un proton engendre une coélution d'une partie des monosaccharides (Transgenomic, 2008).

Comparaison des colonnes LC permettant la séparation des monosaccharides des hydrolysats de biomasses

Les colonnes LC permettant la séparation des monosaccharides des hydrolysats de biomasses sont comparées sur base des descriptions faite ci-dessus. Les deux colonnes LC avec la meilleure séparation des principaux monosaccharides sont la colonne polymérique échangeuse forte d'anions et la colonne polymérique sulfonée greffée par du plomb. La colonne polymérique échangeuse forte d'anions est plus robuste que l'autre colonne qui :

- Ne fonctionne qu'avec des pH entre 5 et 9 ;
- Ne supporte pas une pression supérieure à 8,3 MPa ;
- Ne supporte que de faibles concentration d'acétonitrile dans la phase mobile et donc des faibles gradients.

Néanmoins, par rapport à la colonne polymérique sulfonée greffée par du plomb, la colonne polymérique échangeuse forte d'anions n'est pas compatible avec l'utilisation de détecteur basé sur une étape de nébulisation comme le CAD. Cela s'explique par l'utilisation de phases mobiles salines engendrant un bruit excessif pour ce type de détecteur. La colonne polymérique sulfonée greffée par du plomb est donc la mieux adaptée à la séparation des monosaccharides libérés par hydrolyse acide pour les doser par le CAD.

Les deux colonnes LC les moins adaptées pour la séparation des principaux monosaccharides des hydrolysats sont la colonne de silice greffée par des

groupements aminopropyles et la colonne polymérique greffée par des groupements aminopropyles. L'inconvénient majeur de la colonne de silice greffée par des groupements aminopropyles est le relargage graduel des groupements aminopropyles engendrant un bruit excessif au niveau de détecteurs ayant une étape de nébulisation. L'inconvénient majeur de la colonne polymérique greffée par des groupements aminopropyles est le manque de résolution, d'une part, des pics de L-arabinose et de D-xylose et, d'autres part, des pics de D-glucose et de D-galactose venant d'hydrolysats.

2.2. Dosage des monosaccharides par le CAD

Fonctionnement du CAD

Le CAD nébulise tout d'abord à température ambiante l'éluant venant de la colonne LC avec de l'azote. Durant cette étape, le solvant forme des gouttelettes qui s'évaporent et produisent ainsi des particules d'aérosol. En parallèle, un second flux d'azote se charge positivement en traversant un fil de platine corona sous haute tension. Cette charge est transférée aux particules sèches d'analytes non volatils. La charge de ces particules est ensuite transférée à un collecteur de charge où la charge est mesurée par un électromètre à haute sensibilité (Figure 1) (Gamache et al., 2005 ; ESA Biosciences, 2011).

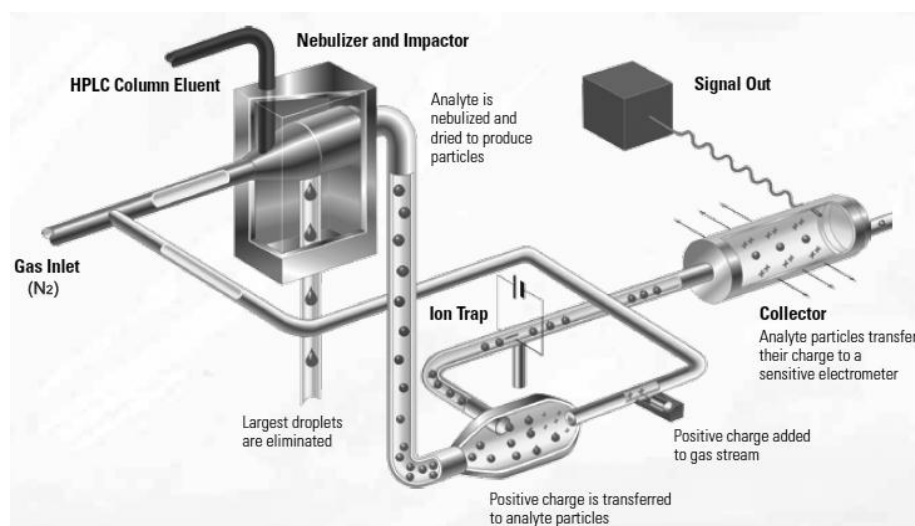


Figure 1. Diagramme du fonctionnement du CAD (ESA Biosciences, 2011)

Le signal du CAD ne dépend

- Ni des propriétés physicochimiques de l'analyte ;
- Ni de la structure chimique (comme la présence de chromophore) de l'analyte ;
- Ni de l'aptitude de l'analyte à s'ioniser en phase gazeuse (Hutchinson et al., 2010 ; Vehovec et al., 2010).

Le signal de détecteurs basés sur la nébulisation, comme le CAD et l'ELSD, augmente avec une puissance de la masse d'analyte injecté (Hutchinson et al., 2010 ; Vehovec et al., 2010) :

$$y = ax^b \quad \text{Equation 1.}$$

y, aire de pic donnée par le détecteur

x, masse d'analyte injecté

a, constante représentant l'intensité de la fonction de réponse

b, constante représentant la forme de la fonction de réponse

Cette relation peut être linéarisée par la transformation logarithmique de l'Equation 1 (Hutchinson et al., 2010 ; Vehovec et al., 2010) :

$$\log y = b \log x + \log a \quad \text{Equation 2.}$$

Pour les détecteurs basés sur la nébulisation, la constante a est liée à la sensibilité de la fonction de réponse. Elle dépend de nombreux facteurs comme la (Dixon et al., 2002 ; Ramos et al, 2008) :

- Densité de l'analyte;
- Volatilité de l'analyte;
- Forme des particules d'aérosol de l'analyte.

La valeur de la constante b est proche de 1 pour le CAD. De fait, ce détecteur possède presque une relation linéaire entre le signal du CAD et la quantité d'analyte injectée (Ramos et al, 2008). Pour l'ELSD, la valeur de la constante b dépend de la diffusion de la lumière qui varie en fonction de la taille des particules (Ramos et al, 2008).

Le CAD peut être considéré comme un détecteur universel si les analytes sont non volatils et si la phase mobile est utilisée en mode isocratique. Dans ce cas, la plupart des analytes donnent des facteurs de réponse similaires (Gamache et al., 2005 ; Hutchinson et al., 2010). Ces facteurs de réponse sont modifiés par la proportion de phase mobile organique présente dans l'éluant. Cette proportion

modifie le déroulement de l'étape de nébulisation. Au plus la proportion de phase organique est grande, au plus le nombre de particules produites lors de la nébulisation et le signal du CAD sont grands (Gamache et al., 2005 ; Hutchinson et al., 2010).

Comparaison des caractéristiques du CAD aux autres détecteurs LC

Les différentes caractéristiques de différents détecteurs LC sont exposées et comparées dans le Tableau 2. Il s'agit du CAD, l'ELSD, le RI, l'UV, le PAD et le MS.

Tableau 2. Caractéristiques du CAD, de l'ELSD, du RI, l'UV, du PAD et du MS (Gamache et al., 2005 ; Hutchinson et al., 2010 ; Vehovec et al., 2010 ; ESA Biosciences, 2011).

Caractéristiques	CAD	ELSD	RI
Sensibilité (LOD)	5-25 ng	50-200 ng	Quelques mg
Reproductibilité	Bonne	Médiocre	Bonne
Plage dynamique	10^4	10^2	10^2 à 10^3
Spécificité moléculaire	Molécules non volatiles	Molécules non volatiles	Non
Phase mobile avec un sel non volatile	Incompatible	Incompatible	Compatible
Gradient de phase mobile	Compatible	Compatible	Incompatible
Destructif	Oui	Oui	Non
Utilisation du détecteur	Facile	Complexe	Facile
Réponse aux monosaccharides	Bonne	Bonne	Moyenne

Légende. LOD : Limite de détection ; CAD : Détecteur d'aérosol chargé ; ELSD : Détecteur de diffusion de la lumière après évaporation ; RI : Détecteur à indice de réfraction

Tableau 2 (Suite). Caractéristiques du CAD, de l'ELSD, du RI, l'UV, du PAD et du MS (Gamache et al., 2005 ; Hutchinson et al., 2010 ; Vehovec et al., 2010 ; ESA Biosciences, 2011).

Caractéristiques	UV	PAD	MS
Sensibilité (LOD)	mg voir pg (Dépend de la structure moléculaire)	Quelques ng	ng voir pg (Dépend de la structure moléculaire)
Reproductibilité	Bonne	Bonne	Bonne
Plage dynamique	10^3 à 10^4	10^2 à 10^3	10^3 à 10^4
Spécificité moléculaire	Dépend de la structure moléculaire	Réaction électrochimique	Dépend de la structure moléculaire
Phase mobile avec un sel non volatil	Compatible	Compatible	Incompatible
Gradient de phase mobile	Compatible	Compatible	Compatible
Destructif	Non	Oui	Oui
Utilisation du détecteur	Facile	Complexe	Complexe
Réponse aux monosaccharides	Mauvaise	Bonne	Bonne

Légende. LOD : Limite de détection ; UV : Détecteur ultraviolet ; PAD : Détecteur ampérométrique pulsé ; MS : Spectromètre de masse

Du Tableau 2, il ressort que les détecteurs les plus optimaux pour le dosage des monosaccharides sont tout d'abord le CAD, le PAD et le MS. Leurs points forts par rapport aux autres détecteurs sont leur :

- Sensibilité (Limite de détection) ;
- Reproductibilité ;
- Plage dynamique ;
- Réponse aux monosaccharides.

De plus, le CAD et le PAD possèdent l'avantage d'être des détecteurs bien moins onéreux comparés au MS. Ils possèdent un rapport performance sur prix du détecteur bien plus élevée que le MS. En terme de performances, ces trois détecteurs sont suivis par l'ELSD et le RI. Les inconvénients majeurs de l'ELSD sont sa sensibilité (LOD), sa reproductibilité et sa plage dynamique. Les inconvénients du RI sont sa réponse aux monosaccharides et sa sensibilité (LOD). L'UV est le détecteur le moins optimal pour le dosage des monosaccharides car les monosaccharides ne possèdent pas une longueur d'onde spécifique d'absorption assez élevée. De ce fait, ce détecteur ne permet que le dosage de quantités

importantes (mg) de monosaccharides. Ce dosage avec ce détecteur un risque d'être biaisé par des composés absorbant fortement à la même longueur d'onde (McGinnis et al., 1988).

3. Conclusion

La méthode d'hydrolyse analytique à l'acide sulfurique de Hoebler, d'Englyst, de Theander et de Sluiter correspond au meilleur type d'hydrolyse acide pour doser la cellulose et les hémicelluloses des biomasses. Ce type d'hydrolyse permet d'atteindre un compromis optimal entre l'hydrolyse totale de ces polysaccharides structuraux en monosaccharides et une dégradation minimale des monosaccharides libérés. Actuellement, il n'existe pas assez de données pertinentes dans la littérature comparant l'utilisation des méthodes d'hydrolyse acide analytique présentées sur un même échantillon ou sur des échantillons similaires de biomasses.

En se basant sur la présente revue bibliographique, la colonne LC la plus optimale et la plus adaptée au dosage par un CAD des monosaccharides des hydrolysats de biomasses est la colonne polymérique sulfonée greffée par du plomb. Le CAD est nouveau type de détecteur permettant un dosage optimal d'analytes séparés par chromatographie liquide. Il est basé sur le principe de nébulisation de l'éluant et la mesure de la charge positive des particules d'aérosols. Ces particules chargées sont obtenues par le transfert d'un flux d'azote chargé positivement aux particules nébulisées.

Bibliographie

Agblevor F., Murden A. & Hames B., 2004. Improved method of analysis of biomass sugars using high-performance liquid chromatography. *Biotechnol. Letters*, **26**, 1207–1210.

Barton F., Windham W. & Himmelsbach D., 1982. Analysis of Neutral Sugar Hydrolysates of Forage cell walls by High-pressure Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1119-1123.

Bio-Rad, 2010. *Guidelines for Use and Care of Aminex Resin-Based Columns : Instruction Manual*. Nazareth, Belgium : Bio-Rad.

Carpita N. & McCann M., 2000. The cell wall. In: Buchanan B., Gruissem W. &

Jones R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA : American Society of Plant Physiologists, 52-108.

De Ruiter G., Schols H., Voragen A. & Rombouts F., 1992. Carbohydrate Analysis of Water-Soluble Uronic Acid-Containing Polysaccharides With High-Performance Anion-Exchange Chromatography Using Methanolysis Combined with TFA Hydrolysis Is Superior to Four Other Methods. *Anal. Biochem.*, **207**, 176-185.

Dionex Corporation, 2000. Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). Sunnyvale, CA, USA: Dionex Corporation.

Dixon R. & Peterson D., 2002. Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging. *Anal. Chem.*, **74**, 2930-2937.

Englyst H., Quigley M. & Hudson G., 1994. Determination of Dietary Fibre as Non-starch Polysaccharides With Gas-Liquid Chromatographic, High-performance Liquid Chromatographic or Spectrophotometric Measurement of Constituent Sugars. *Analyst*, **119**, 1497-1509.

Englyst H., Quigley M., Hudson G. & Cummings J., 1992. Determination of Dietary Fibre as Non-starch Polysaccharides by Gas-Liquid Chromatography. *Analyst*, **117**, 1707-1714.

ESA Biosciences, 2011. *Corona CAD: The dawn of a new era in HPLC detection*. Chelmsford, MA, USA : ESA Biosciences.

Gamache P., McCarthy R., Freeto S., Asa D., Woodcock M., Laws K. & Cole R., 2005. HPLC Analysis of Nonvolatile Analytes Using Charged Aerosol Detection. *LCGC North America*, **23**, 150-161.

Grabber J., 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability ? *Crop Sci.*, **45**, 820-831.

Grace Davison, 2006. Prevail HPLC Columns. Izegem, Belgium : Grace Construction Products NV.

Hoebler C., Barry J., David A. & Delort-Laval J., 1989. Rapid Acid Hydrolysis of Plant Cell Wall Polysaccharides and Simplified Quantitative Determination of Their Neutral Monosaccharides by Gas-Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 360-367.

- Hutchinson J., Li J., Farrell W., Groeber E., Szucs R., Dicoski G. & Haddad P., 2010.** Universal response model for a corona charged aerosol detector. *J. of Chromatogr. A*, **1217**, 7418–7427.
- McGinnis G., Laver M. & Biermann C., 1988.** High-performance liquid chromatography (HPLC) of carbohydrates. In : Biermann C. & McGinnis G., eds. *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. Boston, USA : CRC Press, 19-26.
- Pistorino M. & Pfeifer B., 2008.** Polyketide analysis using mass spectrometry, evaporative light scattering, and charged aerosol detector systems. *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1189-1193.
- Quigley M. & Englyst H., 1994.** Determination of the Uronic Acid Constituents of Non-starch Polysaccharides by High-performance Liquid Chromatography With Pulsed Amperometric Detection. *Analyst*, **119**, 1511-1518.
- Ramos R., Libong D., Rakotomanga M., Gaudin K., Loiseau P. & Chaminade P., 2008.** Comparison between charged aerosol detection and light scattering detection for the analysis of Leishmania membrane phospholipids. *J. of Chromatogr. A*, **1209**, 88–94.
- Saeed A., Fatehi P., Ni Y. & van Heininggen A., 2011.** Impact on the sugar analysis of prehydrolysis liquor of Kraft-based dissolving pulp production process using HPAEC technique. *Bioresources*, **6**(2), 1707-1718.
- Selvendran R., March J. & Ring S., 1979.** Determination of Aldoses and Uronic Acid Content of Vegetable Fiber. *Anal. Biochem.*, **96**, 282-292.
- Slimestad R. & Vagen I., 2006.** Thermal stability of glucose and other sugar aldoses in normal phase high performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr. A*, **1118**, 281–284.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. & Crocker D., 2008.** Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Golden, Colorado, USA : National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter A., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J. & Templeton D., 2005.** Determination of Extractives in Biomass. Golden, Colorado, USA : National Renewable Energy Laboratory.
- Southgate D., 1995.** *Dietary fibre analysis*, Cambridge, UK : The Royal Society of Chemistry.

Theander O., Aman P., Westerlund E., Andersson R. & Pettersson D., 1995. Total Dietary Fiber Determined as Neutral Sugar Residues Uronic Acid Residues, and Klason Lignin (The Uppsala Method): Collaborative Study. *AOAC International J.*, **78**(4), 1030-1044.

Transgenomic, 2008. *Chromatography Application Notes : Carbohydrate Analysis HPLC Columns*. Omaha, NE, USA : Transgenomic.

Vehovec T. & Obreza A., 2010. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. *J. of Chromatogr. A*, **1217**, 1549–1556.

Willför S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J., Laine C., Suurnäkki A., Saake B., Uotila K., Simolin H., Hemming J. & Holmboma B., 2009. Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Product*, **29**, 571-580.

Partie 2

Chapitre 5

Dosage de la cellulose et des hémicelluloses par la méthode NDE-SAH-LC-CAD

Adapté de la publication :

Godin B., Agneessens R., Gerin P. A., Delcarte J., 2011. Composition of structural carbohydrates in biomass: Precision of a method using a neutral detergent extraction and a charged aerosol detector. *Talanta*, **85**, 2014-2026.

Comme, dans le domaine des biomasses végétales à vocation énergétique, une bonne connaissance des teneurs en cellulose et en hémicelluloses est nécessaire, il faut les mesurer avec un degré élevé d'exactitude (Partie 1 - Chapitres 3 et 4). Pour ce faire, ces deux polymères doivent être mesurés d'après leurs monomères, c'est-à-dire leurs monosaccharides (Partie 1 - Chapitres 3 et 4). L'analyse de la littérature nous a permis de comparer l'intérêt et les limitations de diverses méthodes dosant la cellulose et les hémicelluloses dans des domaines d'applications connexes (Partie 1 - Chapitres 2 à 4). En combinant les avantages respectifs de ces méthodes, nous avons défini notre propre méthode (NDE-SAH-LC-CAD), en visant en outre à répondre à des contraintes supplémentaires au niveau de l'instrument analytique à mettre en œuvre. Cette méthode se base sur une extraction au détergent neutre des constituants interférant venant de la biomasse (NDE), sur l'hydrolyse à l'acide sulfurique (SAH) de la cellulose et des hémicelluloses, et sur l'analyse des monosaccharides libérés par chromatographie liquide (LC) couplée à un détecteur d'aérosol chargé (CAD). Cette méthode s'avère appropriée pour le dosage de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses végétales en vue de les valoriser en énergie. Elle permet de quantifier ces deux polymères avec un degré élevé d'exactitude. Au niveau de sa précision, pour les niveaux de concentration élevée (teneur $\geq 0,010$ kg/kg MS), le coefficient de variation intra-laboratoire est situé entre 1,3% et 4,3%, sauf pour le D-galactose dont la quantification est moins précise (le coefficient de variation intra-laboratoire est de 5,5%). Pour les niveaux de concentration basse (teneur $< 0,010$ kg/kg MS), le coefficient de variation intra-laboratoire pour sa précision est situé entre 5,6% et 7,4%. La précision de la méthode NDE-SAH-LC-CAD est donc meilleure pour des niveaux de concentration élevée par rapport aux niveaux de concentration basse. La méthode NDE-SAH-LC-CAD offre l'avantage d'une meilleure spécificité pour le dosage de la cellulose et des hémicelluloses, par rapport aux méthodes de la NREL et d'Uppsala.

Keywords. Precision, Analytical sulfuric acid hydrolysis, Vegetal biomass, Cellulose, Hemicelluloses

1. Introduction

The most abundant compounds in vegetal biomasses such as crops, agricultural residues or wood are two types of structural polysaccharides: cellulose and hemicelluloses. Cellulose is a linear homogeneous polysaccharide made of β -1,4-linked D-glucose units, which is mainly in the form of crystalline microfibrils (Carpita et al., 2000). It represents 25-40 % DM of vegetal biomasses (reviewed by Godin et al., 2010). Hemicelluloses are ramified heterogeneous polysaccharides mainly made of linked D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose and D-glucose units (Carpita et al., 2000). They represent 10-30 % DM of vegetal biomasses (reviewed by Godin et al., 2010). Vegetal biomasses also contain other minor compounds such as lignin (phenolic polymer), pectins (structural polysaccharide), proteins and inorganic compounds (Carpita et al., 2000). Cellulose and hemicelluloses represent the largest pool in nature of organic carbon coming from the photosynthetically collected and stored solar energy (Chandel et al., 2010). They represent therefore a huge amount of renewable resource for a sustainable bio-based economy. They can be used in feedstock based biorefineries for the production of biofuels and chemicals as an alternative to products issued from fossil oil refineries (Kamm et al., 2004). In order to optimize the production of value added products in biorefineries, it is necessary to refine our knowledge of the composition of feedstocks, especially the amount of cellulose and hemicelluloses and the monosaccharide composition of the hemicelluloses fraction (Chandel et al., 2010).

Cellulose and hemicelluloses are insoluble in water (Theander et al., 1995 ; Sluiter et al. 2008a). Hemicelluloses can be hydrolyzed into their constitutive monosaccharides by diluted sulphuric acid, usually 4% (w/w) at 121°C, but cellulose needs to be first solubilized by concentrated sulphuric acid, usually 72% (w/w) at 30°C, in order to be subsequently hydrolyzed by the diluted sulphuric acid hydrolysis step (Theander et al., 1995 ; Sluiter et al. 2008a). The history of the various developed SAH methods has been reviewed by Sluiter et al. (2010). Prior to

the determination of the cellulosic and hemicellulosic content of biomasses, it is necessary to remove all compounds that can interfere with the sulphuric acid hydrolysis: nitrogen compounds, inorganic compounds, chlorophyll, waxes and other minor compounds (e.g. organic acids) (Theander et al., 1995 ; Sluiter et al. 2008b). Non-structural carbohydrates and pectins must also be removed before the sulphuric acid hydrolysis as their monosaccharidic constituents could lead to overestimation of the monosaccharides derived from cellulose (which equates to glucan) and hemicelluloses (Schadel et al., 2010 ; Godin et al., 2011). Cellulosic and hemicellulosic monosaccharides obtained after the sulfuric acid hydrolysis are usually separated by gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC) (Englyst et al., 1994). The need for chemical derivatization of the monosaccharides to volatile compounds is the major drawback of GC (Englyst et al., 1994). Over the last 20 years, refractive index detectors (RI) (Sluiter et al. 2008), pulsed amperometric detectors (PAD) (Englyst et al., 1994) or evaporating light scattering detectors (ELSD) (ESA 2011) have usually been used after LC separation to quantify monosaccharides (Englyst et al., 1994; Sluiter et al., 2010). The charged aerosol detector (CAD) is an innovative type of detector to quantify monosaccharides with LC (ESA 2011). The CAD first nebulizes the LC column eluent with nitrogen; the LC solvent evaporates from the droplets and leaves the non-volatile analytes as aerosol particles. The latter are charged by a positively charged nitrogen stream that has passed through a high-voltage platinum corona wire. This positive charge is then measured by a highly sensitive electrometer (ESA 2011). The CAD is a nebulization detector where no optimization of the settings is necessary (ESA 2011). The signal of a detector based on a nebulization step like the CAD depends on the total amount of the analyte. The CAD signal increases with the power of the injected analyte mass. This relationship can be linearized by a log transformation to have a linear calibration (Vervoort et al., 2008 ; Vehovec et al., 2010). The advantages of the CAD are its better sensitivity compared to an ELSD (Hutchinson et al., 2010 ; Vehovec et al., 2010) and a RI (Hutchinson et al., 2010 ; Vehovec et al., 2010), its reproducibility and dynamic range as compared to an ELSD (Vehovec et al., 2010), its compatibility with gradient elution (Inagaki et al., 2007) and with crude, non derivitized monosaccharides (Inagaki et al., 2007) and its ease of use (Inagaki et al., 2007). The drawbacks of CAD are its incompatibility

with eluents that are not volatile, its inability to quantify volatile compounds and the destruction of the sample in the detector (Inagaki et al., 2007).

The Van Soest (VS) method is a routine gravimetric method used to predict the animal feed quality of forage crops based on the cell wall characteristics. The VS method determines the structural compounds (cellulose, hemicelluloses and lignin) of vegetal biomasses by the sequential extraction and separation of three cell wall fractions (Van Soest et al., 1967 ; Van Soest et al., 1973): the neutral detergent fiber residue (NDF), the acid detergent fiber residue (ADF) and the acid detergent lignin (ADL) (Van Soest et al., 1985). The NDF is considered as the cell wall fraction of biomasses (Van Soest et al., 1985). The VS method determines cellulose as ADF-ADL and hemicelluloses as NDF-ADF (Van Soest et al., 1985).

We developed a new and innovating method to analyze the structural carbohydrates, cellulose and hemicelluloses, in vegetal biomasses. This new method is based on the VS method (Van Soest et al., 1967), the Uppsala (Theander et al., 1995), and the National Renewable Energy Laboratory (NREL) methods (Sluiter et al., 2008). In our method, we use a modified Van Soest neutral detergent extraction to remove all compounds interfering with the subsequent sulphuric acid hydrolysis (nitrogen compounds, inorganic compounds, chlorophyll, waxes and other minor compounds such as organic acids) (Theander et al., 1995 ; Sluiter et al. 2008b) or with the subsequent chromatographic quantification of the cellulosic and hemicellulosic monosaccharides (non-structural carbohydrates and pectins that can lead to overestimation of the monosaccharides derived from cellulose and hemicelluloses) (Van Soest et al., 1985 ; Schadel et al., 2010, Godin et al., 2011). The structural carbohydrates are then submitted to analytical sulfuric acid hydrolysis and the released monosaccharides are analyzed by LC-CAD. The total glucan, xylan, arabinan, galactan and mannan contents are then determined by a two stage sulfuric acid hydrolysis method (SAH). The first stage solubilizes the structural carbohydrates by 72% w/w sulfuric acid at an incubation temperature between 20 and 40°C for an incubation time between 15 and 75 min and the second stage hydrolyzes these solubilized structural carbohydrates by sulfuric acid at a concentration between 0.80 and 1.00 N at 121°C for an incubation time between 30 and 150 min. The released monosaccharides are separated and quantified by liquid chromatography (LC). The content of hemicellulosic glucan is determined by the

same method except that the cellulose solubilization step (incubation with 72% w/w sulfuric acid) is omitted. The content of cellulose (cellulosic glucan ; ie D-glucose of cellulose under its polymeric form) is calculated as the difference between the total glucan and the hemicellulosic glucan contents (Englyst et al., 1994). The monosaccharidic components (D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-mannose and D-galactose) of hemicelluloses are expressed under their polymeric form (xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, mannan and galactan). In our method, the hemicelluloses content is considered as the sum of the xylan, arabinan, mannan, galactan hemicellulosic glucan contents. To correct the results for any underestimation of the monosaccharides concentrations due to acidic degradation, a standard mixture of monosaccharides is treated with sulfuric acid in parallel with the samples (Theander et al., 1995 ; Sluiter et al., 2008).

ISO 17025 (ISO, 2005) introduces new definitions to specify the variabilities of analytical results. According to ISO 17025 (ISO, 2005), the random variability of an analytical method is assessed by the *repeatability* (same analytical method, same operator, same instrument and same day) and *the intermediate precision* (same analytical method but different operators, different instruments and/or different days) (ISO, 2005 ; Feinberg et al., 2004). The repeatability and intermediate precision are calculated as standard deviation (SD) or relative standard deviation (RSD). The *uncertainty* of an analytical method represents an interval around the mean of the results where the unknown true value can be found with a confidence level of 68%, i.e. the standard deviation (ISO, 2005 ; Feinberg et al., 2004). This uncertainty depends on the repeatability, the intermediate precision and the variability of the mean's bias (ISO, 2005 ; Feinberg et al., 2004). The *expanded uncertainty* (U_x) represents an interval around the results where the unknown true value can be observed with a confidence level of 95% (ISO, 2005 ; Feinberg et al., 2004). The expanded uncertainty corresponds to the uncertainty multiplied by 2 (coverage factor) (ISO, 2005 ; Feinberg et al., 2004).

The aim of the present paper is to determine the precision (relative standard deviation of repeatability and intermediate precision tests, respectively, RSDr and RSDi) and the expanded uncertainty (ISO 17025) of our NDE-SAH-LC-CAD method and to compare it to the expanded uncertainty of the Van Soest (VS)

method. The latter was established by interlaboratory studies of the Bureau InterProfessionnel d'Etudes Analytiques (BIPEA) (BIPEA, 2009).

The goal of this paper is also to build the precision profile of our NDE-SAH-LC-CAD method according to the accuracy profile concept (ISO 17025) and the guidelines of the French Society of Pharmaceutical Sciences and Techniques (SFSTP) (Feinberg et al., 2004 ; Feinberg et al., 2006 ; Feinberg et al., 2009a ; Feinberg et al., 2009b ; Hubert et al., 2004 ; Hubert et al., 2007a ; Hubert et al., 2007b ; Hubert et al., 2007c; Rozet et al., 2007a; Rozet et al., 2007b). The precision profile is a decision tool that enables to interpret and compare adequately results obtained with routine analyses using the same method. The *β expectation at 95% tolerance limits* of the precision profile corresponds to the interval wherein at least 95% of the results of the analytical method are expected to fall. The *acceptance limits* of the precision profile are arbitrarily fixed values for each compound and concentration levels based on previous studies. The acceptance limit is the maximum accepted variability limit for the method. Therefore, they are expected to fall outside the *β expectation at 95% tolerance limits* (Feinberg et al. 2004, Hubert et al., 2004 ; Feinberg et al. 2009a ; Feinberg et al. 2009b ; Heuskin et al., 2010). The precision profile concept was already used for pharmaceutical (Chiap et al., 1999 ; Block et al., 2005 ; Marini et al., 2006 ; Strahm et al., 2008 ; Kpoviéssi et al., 2008 ; Mantanus et al., 2009) and food products (Feinberg, 2006 ; Brasseur et al., 2007). The *precision* (random variability) of an analytical method can be combined with the *trueness* (systematic variability; bias) of the method to define the accuracy profile. However, the trueness of our NDE-SAH-LC-CAD could not be measured because there are no pure oligosaccharides available for this kind of analysis (Wilför et al., 2009). The NIST materials certified for the NREL and Uppsala methods cannot be used as reference for our method, as their non-structural carbohydrate and pectin contents have not been standardized. The same issue appeared with a similar approach of Theander et al. (1995). As a result, we were able to determine the precision of the method but not the trueness. This paper presents the first use of the innovating precision profile approach for a LC-CAD based analytical method in the field of vegetal biomasses.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and biomass material

All chemicals were of analytical grade or equivalent and were purchased from VWR (Heverlee, Belgium) and Chem-Lab (Zedelgem, Belgium). The samples of fiber sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.), fiber hemp (*Cannabis sativa* L.), miscanthus (*Miscanthus x giganteus* J.M. Greef & Deuter ex Hodk. & Renvoize) and jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. ; aerial part) came from crop trials performed in 2009 at Libramont (Altitude of 522 m ; 49°55'N, 05°24'E ; Belgium) and harvested in October 2009, except miscanthus which was harvested in March 2010. For each biomass sample, a plot of 10 m² of the whole above ground biomass was harvested and chopped. Two representative subsamples of 750 g of each biomass were then directly dried after the harvest.

The biomass samples were dried at 60°C for 72 h in a Memmert UFP800 oven (VWR, Heverlee, Belgium). The DM content (drying at 60°C) for fiber sorghum, tall fescue, fiber hemp, miscanthus and jerusalem artichoke were respectively: 0.202, 0.147, 0.391, 0.834 and 0.336 g DM /g WM. After drying, they were first milled with a 4 mm screen hammer mill (BOA, Waterleau, Herent, Belgium) followed by a second milling step with a 1 mm screen cyclone mill (Cyclotec, FOSS Benelux N.V., Bruxelles, Belgium). The samples were stored in airtight bags at room temperature and protected from light in a dark box.

2.2. Structural polysaccharides analysis by the Van Soest method

The neutral detergent fiber residue (NDF) of the VS method was determined as described by Van Soest et al., 1967 (Van Soest et al., 1967). The acid detergent fiber residue (ADF) and acid detergent lignin (ADL) of the VS method were determined as described by Van Soest et al., 1973 (Van Soest et al., 1973). The cellulose content was calculated as ADF-ADL, with ADF the weight of the acid detergent fiber residue and ADL the weight of the acid detergent lignin residue. The

hemicelluloses content was calculated as NDF-ADF with NDF the weight of the neutral detergent fiber residue (Van Soest et al., 1967 ; Van Soest et al., 1973).

2.3. Structural polysaccharides analysis by the NDE-SAH-LC-CAD method

Neutral detergent extraction (NDE)

2 g of dried and milled biomass were weighted in a filtering crucible and were extracted on a reflux apparatus (Fibertec, FOSS Benelux N.V., Bruxelles, Belgium) for 15 min at 90°C with 100 ml of a 0,1 mM phosphate buffer at pH 7 containing 1000 U of an analytical thermostable α -amylase (Megazyme, Ireland). After the first extraction the sample crucible was vacuum filtered. The solid retentate was then extracted with 100 ml of Van Soest neutral detergent for 1 h at 100°C (Van Soest et al. 1967). The sample was vacuum filtered, rinsed with deionized water and the solid retentate was dried at 40°C for 72 h. The dried retentate was ground in a water-cooled laboratory grinder (A10, IKA, Staufen, Germany). Note that, based on the recommendation of the Van Soest method, the sample should be defatted before the phosphate buffer step if it contains more than 10 g of lipids per 100 DM (Van Soest et al., 1985).

Sulfuric acid hydrolysis (SAH)

200 mg of the dried and ground retentate was weighted in a 100 ml pressure tube (Simax 100 ml reagent bottle, part 2070 ; Kavalier, Prague, Czech Republic) and was dispersed in 3 ml of 72% (w/w) H_2SO_4 containing 0.1% (w/v) of phenol. After flushing the tube headspace with nitrogen, the tube was stoppered with a screw cap and incubated in a water bath for 1 h at 30°C. Then the H_2SO_4 was diluted to 4% (w/w) by adding 84 ml of deionized water. After flushing the tube headspace with nitrogen, the tube was stoppered with a screw cap and incubated in a forced air convection oven for 2 h at 121°C. Phenol and nitrogen flushing were used against oxidation.

The pressure tube was cooled to room temperature before removing the cap. The hydrolysis solution was filtered with a filtering crucible of pore size from 40 to

100 µm. The pressure tube and filtering crucible were rinsed with deionized water. The filtrate was collected in a 100 ml flask.

10 ml of the hydrolysis filtrate were transferred into a 50 ml centrifugation tube and neutralized to pH 7 with solid calcium carbonate. The tube was mixed and centrifuged for 5 min at 6000 g. 1.0 ml of the supernatant was transferred into a 1.5 ml centrifugation tube containing 0.5 ml of acetonitrile to precipitate the residual calcium sulfate. The tube was mixed and centrifuged for 5 min at 6000 g. The supernatant fraction was filtered through a 0.2 µm filter (Filter Service S.A., Eupen, Belgium) into a LC vial (Filter Service S.A., Eupen, Belgium) and its monosaccharidic content was quantified by LC-CAD.

To prevent any under-estimation of the monosaccharide concentration due to acidic degradation, a sugar recovery standard mixture (SRSM) of monosaccharides was used (Englyst et al., 1992 ; Englyst et al., 1994): a mixture of 60.0 mg/ml of D-glucose, 32.5 mg/ml of D-xylose, 2.5 mg/ml of L-arabinose, 3.1 mg/ml of D-mannose and 3.1 mg/ml of D-galactose was prepared into a 10 ml flask containing 72% (w/w) H₂SO₄ with 0.1% (w/v) of phenol. After flushing the tube headspace with nitrogen, the tube was stoppered with a screw cap and incubated in a water bath for 1 h at 30°C. The flask was cooled down to room temperature. 3 ml were transferred into a 100 ml pressure tube. The concentrated H₂SO₄ was diluted to 4% (w/w) by adding 84 ml of deionized water. The SRSM tube was then handled and diluted as described above for the retentate samples. The recovery factor RF was determined as the ratio of the amounts of monosaccharides detected by the LC-CAD relative to the corresponding amounts introduced in the SRSM.

Blank sample for SAH biomass were prepared as described above but without biomass.

LC-CAD analysis

The chromatographic run was carried out by injecting 35 µl of the prepared solutions into an Alliance 2695 Separation module LC (Waters S.A., Zellik, Belgium) using a Carbo Sep CHO-682 Pb analytical LC column (300 mm x 7.8 mm I.D. ; 7 µm particle size) (Interchrom, Montluçon, France) with a Carbo Sep CHO-682 Pb LC precolumn (20 mm x 4.0 mm I.D. ; 7 µm particle size) (Interchrom,

Montluçon, France). The samples were eluted with deionised water at 80°C for 30 min at 0.4 ml/min.

The charged aerosol detection was performed by an ESA Corona CAD detector (ESA Biosciences, Chelmsford, MA, USA). The CAD was set at a 50 pA maximum current and gas pressure of 246 kPa. Equipment control, data acquisition and integration were performed with Empower Pro 2.0 software (Waters S.A., Zellik, Belgium).

The resolution (R) between peaks was assessed by (Heuskin et al, 2010):

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \quad (1)$$

where t is the peak retention time in seconds with $t_2 > t_1$ and W is the baseline peak width in seconds.

Calculation of the cellulose and hemicelluloses content

The calculation of the total glucan, xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan contents of the sample were calculated as the total mass of, respectively, D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose and hemicellulosic D-glucose content determined by the NDE-SAH-LC-CAD method (with correction for the H₂O release upon polymerisation). The content (g/100 g DM) of an individual neutral polysaccharide (NP = total glucan, xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan) in a sample given as anhydrous-sugar was calculated the following way:

$$NP = \frac{MF \times CF \times ND \times 100}{RF \times MS \times DM} \quad (\text{g/100g DM}) \quad (2)$$

Where MF = mass of a given monosaccharide in the 100 ml flask after the sulfuric acid hydrolysis (in g), CF = mass conversion factor of the considered monosaccharide to a polysaccharide residue (0.90 for D-glucose, D-mannose and D-galactose ; 0.88 for D-xylose and L-arabinose), ND = ratio of the dry mass of the retentate after the neutral detergent extraction relative to the dry mass of the sample before this extraction (in g DM/g DM), MS = mass of the dried retentate used for the sulfuric acid hydrolysis (in g of WM), RF = sugar recovery factor of the considered

monosaccharide, DM = dry matter content determined at 103°C for 4 h of the sample used for the sulfuric acid hydrolysis (in g DM/g WM).

The hemicellulosic glucan content was also determined by the NDE-SAH-LC-CAD method except that the cellulose solubilization step (incubation with 72% w/w sulfuric acid) was omitted. The content of cellulose (cellulosic glucan ; ie D-glucose of cellulose under its polymeric form) of the NDE-SAH-LC-CAD method was calculated as the difference between the total glucan and the hemicellulosic glucan contents. The monosaccharidic components (D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-mannose and D-galactose) of hemicelluloses are expressed under their polymeric form (xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, mannan and galactan). The content of hemicelluloses of the NDE-SAH-LC-CAD method was calculated as the sum of the xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan content. The content of cellulose+hemicelluloses of the NDE-SAH-LC-CAD method was calculated as the sum of the cellulose and hemicelluloses contents of the NDE-SAH-LC-CAD method.

2.4. Calibration and quantification of LC-CAD results

Five stock solutions were prepared in deionized water/acetonitrile (2/1 v/v). Each solution contained a mixture of D-glucose, D- xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose. A new calibration curve was build with 5 concentration levels analyzed twice for each series (day) of hydrolysis and each monosaccharide. The CAD response follows the law: $\text{area} = a * (\text{mass injected})^b$. To be accurate, the calibration curve of each monosaccharide was build based on a simple linear regression model: $\log(\text{area}) = b * \log(\text{mass injected}) + \log(a)$ (Vervoort et al., 2008 ; Vehovec et al., 2010).

2.5. Optimization of the sulfuric acid hydrolysis

The responses of the cellulose (considered as glucan), xylan, arabinan, mannan, galactan, hemicelluloses and cellulose+hemicelluloses contents as a function of the type of biomass (tall fescue, fiber sorghum, fiber hemp, miscanthus and jerusalem artichoke) were optimized for SAH using a Box-Behnken experiments design approach. A second-order polynomial quadratic equation was fitted to assess the effect of each independent variable to the response resulting from

the Box-Behnken experimental design. The second-order polynomial quadratic equation is made of an intercept, a linear, a quadratic and an interaction component. The selected factors and levels used for the Box-Behnken design are shown in Table 1. The considered factors and ranges were based on preliminary experiments. The design of experiments was solved using JMP version 7.0.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). The significance of the factors was analyzed by an analysis of the variance (ANOVA) using JMP.

Table 1. Experimental factors and levels used for the Box-Behnken design

Level of the factors	-1	0	1
Incubation temperature (°C) of the first H ₂ SO ₄ step	20	30	40
Incubation time (min) of the first H ₂ SO ₄ step	15	45	75
H ₂ SO ₄ concentration (N) of the second H ₂ SO ₄ step	0,80	0,90	1,00
Incubation time (min) of the second H ₂ SO ₄ step	30	90	150

2.6. Statistical treatment of the results

Dispersion of the results

The procedure to determine the dispersion of the results for each compound can be summarized as follows (Feinberg et al. 2004 ; Hubert et al., 2004 ; Feinberg et al. 2009a ; Feinberg et al. 2009b ; Heuskin et al., 2010):

- Step 1, Select k concentration levels of the compound on which the dispersion study will be determined in order to have a large concentration range. In our case, there were no certified reference materials or pure oligosaccharides with a known composition available (Wilför et al., 2009). Then, we selected the following 3 biomass samples for their distinctive cellulose and hemicelluloses concentration levels: fiber hemp (dicotyledon), fiber sorghum (annual monocotyledon), tall fescue (perennial monocotyledon).
- Step 2, Define the experimental design for the determination of the dispersion study profile. It was characterized by the number of series ($p=5$), by the number of replicates ($n=3$) per series and concentration level and the number of concentration levels of the dispersion study ($k=3$).
- Step 3, Calculate for each k concentration level the mean content ($\bar{X}_k$), the repeatability SD (SDr), repeatability RSD (RSDr), the intermediate precision SD (SDi), the intermediate precision RSD (RSDi), the expansion factor of the

variability of the mean (k_s ; Eq. 9), the absolute uncertainty (ux), the absolute expanded uncertainty (with a coverage factor according to ISO 17025 (2005) ; $k_e = 2$) (Ux), the relative uncertainty, the relative expanded uncertainty (with a coverage factor according to ISO 17025 (2005) ; $k_e = 2$) (Feinberg et al. 2004, Hubert et al., 2004 ; Feinberg et al. 2009a ; ISO 17025 (2005)).

$$MSM = \frac{1}{p-1} \sum_{j=1}^p n_j (\bar{x}_j - \bar{x}_k)^2 \quad (3)$$

is the ANOVA mean square of the model of the series

$$MSE = \frac{1}{pn-p} \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 \quad (4)$$

is the ANOVA mean square error of the series

If $MSE < MSM$, then

$$\hat{\sigma}_w^2 = MSE \quad \text{is the variance within series (intra-series)} \quad (5)$$

$$\hat{\sigma}_B^2 = \frac{MSM - MSE}{n} \quad \text{is the variance between series (inter-series)} \quad (6)$$

Otherwise

$$\hat{\sigma}_w^2 = \frac{1}{pn-1} \sum_{j=1}^p \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_k)^2 \quad (7)$$

$$\hat{\sigma}_B^2 = 0 \quad (8)$$

$$SDr = \sqrt{\hat{\sigma}_w^2} \quad (9)$$

$$SDi = \sqrt{\hat{\sigma}_w^2 + \hat{\sigma}_B^2} \quad (10)$$

$$k_s = \sqrt{1 + \frac{1}{pnB^2}} \quad (9) \quad , \text{ with } B = \sqrt{\frac{A+1}{nA+1}} \quad (10) \quad \text{and } A = \frac{\hat{\sigma}_B^2}{\hat{\sigma}_w^2} \quad (11)$$

$$ux = k_s * SDi \quad (11)$$

$$Ux = k_e * ux \quad (12)$$

- Step 4, Interpretation and conclusion on the dispersion of the method.

Precision profile

The procedure to determine the precision profile for each compound can be summarized as follows (Feinberg et al. 2004, Hubert et al., 2004 ; Feinberg et al. 2009a ; Feinberg et al. 2009b ; Heuskin et al., 2010):

- Step 1, Arbitrarily define the acceptance limits (noted $\pm \lambda$) of each compound and concentration levels based on previous studies (Theander et al., 1995 ; Feinberg et al. 2004, Hubert et al., 2004 ; Feinberg et al. 2009a ; Feinberg et al. 2009b ; Heuskin et al., 2010). We fixed arbitrarily the acceptance limits shown in Table 2.
- Step 2, Same step as step 1 of the method dispersion study described above.
- Step 3, Same step as step 2 of the method dispersion study described above.
- Step 4, Calculate for each k concentration level the mean content, the absolute β expectation at 95% tolerance limits (TL), the absolute acceptance limits, the relative β expectation at 95% tolerance limits, the relative acceptance limits (Feinberg et al. 2004, Hubert et al., 2004 ; Feinberg et al. 2009a).

$$TL = \pm \bar{x}_k * ks * Qt * SDi \quad (13)$$

$$Qt\left(v; \frac{1+\beta}{2}\right) \quad (14)$$

is the β quantile of Student t distribution with v degrees of freedom

$$v = \frac{(A+1)^2}{(A + (1/n)^2 / (p-1) + (1 - (1/n)) / pn)} \quad (15)$$

- Step 5, Build the precision profile for each k concentration level with the observed values, the β expectation at 95% tolerance limits and the acceptance limits.
- Step 6, Same step as step 4 of the method dispersion study described above.

Uncertainty of the VS method

For the results obtained with the VS method, the reference values of the maximal tolerated NDF, ADF and ADL uncertainty (ux) values were based on the interlaboratory studies of the Bureau InterProfessionnel d'Etudes Analytiques (BIPEA) (BIPEA, 2009). The uncertainty (ux) values for NDF, ADF and ADL are 2.0 g/100 g DM, 1.5 g/100 g DM and 0.75 g/100 g DM respectively. The uncertainty

for the cellulose content determined by the VS method was calculated as follows (ISO 17025):

$$ux(cellulose) = \sqrt{ux(ADF)^2 + ux(ADL)^2} \quad (16)$$

The uncertainty for the hemicelluloses content determined by the VS method was calculated as follows (ISO 17025):

$$ux(hemicelluloses) = \sqrt{ux(NDF)^2 + ux(ADF)^2} \quad (17)$$

The coverage factor value used to calculate the expanded uncertainty based on the uncertainty of the value is equal to 2 (ISO 17025, 2005 ; Feinberg et al., 2004).

Table 2. Acceptance limits as arbitrarily fixed in this study on the basis of previous works (Theander et al., 1995 ; Feinberg et al. 2004, Hubert et al., 2004 ; Feinberg et al. 2009a ; Feinberg et al. 2009b ; Heuskin et al., 2010). X refers to the concentration level of cellulose, hemicelluloses, xylan, arabinan, mannan, galactan and cellulose+hemicelluloses

Concentration level = X	Acceptance limit (λ) (%)
X < 1 g/100 g DM	± 20
1 g/100 g DM $\leq$ X < 5 g/100 g DM	$\pm 15^*$
5 g/100 g DM $\leq$ X	± 10

* for galactan $\lambda = \pm 20\%$ for this concentration range
DM : Dry matter

3. Results and discussions

3.1. LC-CAD chromatograms and calibration curve

Fig. 1a illustrates a typical LC-CAD chromatogram obtained with a mixture of D-glucose, D-xylose, D-galactose, L-arabinose and D-mannose standards. The peaks of Fig. 1a show some fronting. This could be explained by the special nature of the stationary phase of the used LC column (Morrison et al., 2005). The selectivity of the chromatographic conditions depends on the resolution between two peaks. The lowest resolution was observed between L-arabinose and D-mannose, with $R=1.51$. This resolution is acceptable as it is above 1.50 (Heuskin et al, 2010). The selectivity of the chromatographic conditions also depends on interfering peaks. With SAH biomass blank samples, no interfering peaks coming from the chemicals

used by the NDE-SAH-LC-CAD method were observed at the retention times corresponding to D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose (Fig. 1b). In addition, according to the peak retention chart for the Carbo Sep CHO-682 Pb analytical LC column (Transgenomic 2008) and the components that can be present in the SAH solution of the NDE-SAH-LC-CAD method, no peaks is expected to coelute with the peaks of D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose. We thus concluded that no peak interferes with the peaks of D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose.

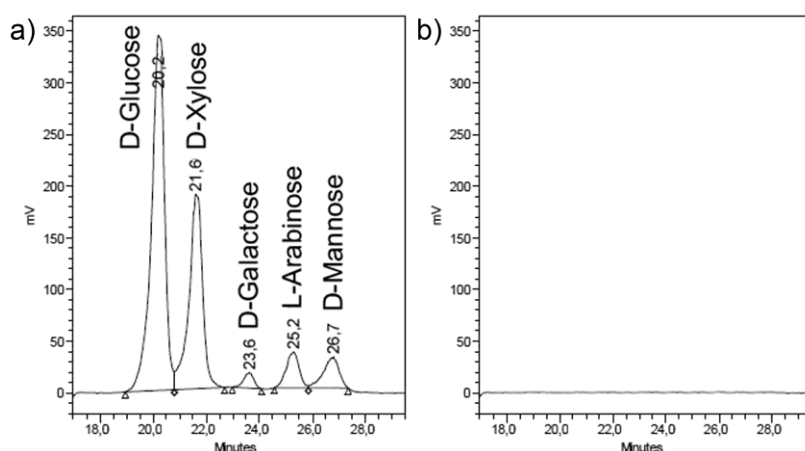
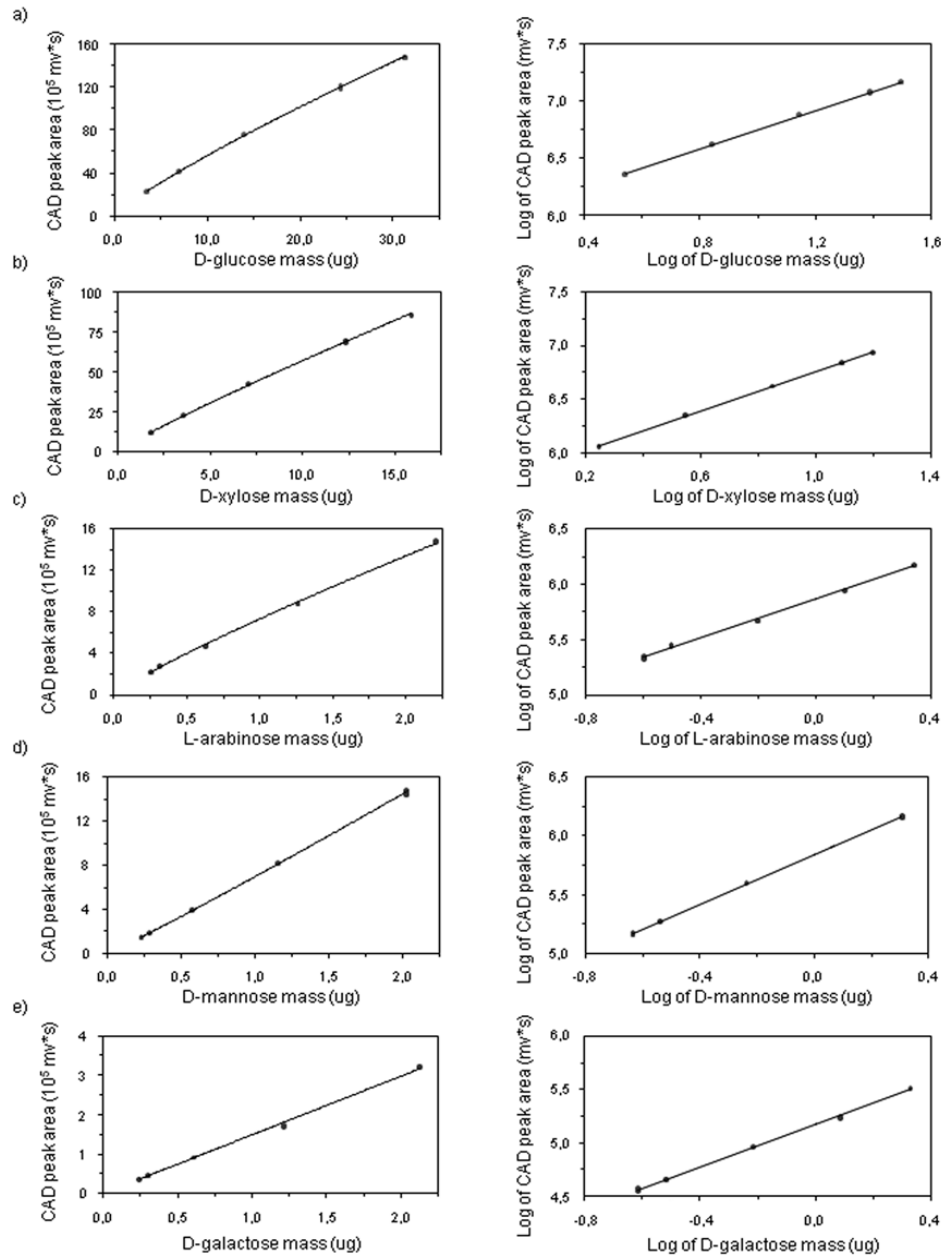


Fig 1. a) Chromatogram of D-glucose (24.4 µg), D-xylose (12.3 µg), D-galactose (2.13 µg), L-arabinose (2.20 µg) and D-mannose (2.03 µg) standards analyzed by LC-CAD. Numbers on top of each peak indicate the peak elution time. b) Chromatogram of SAH biomass blank samples

Fig. 2 illustrates a typical LC-CAD non linearized and log linearized calibration curve obtained for D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose). The equation terms ($\log(a)$ and b) that fit the calibration lines of D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose of the LC-CAD are presented in Table 3. $\log(a)$ represents the response intensity and b represents the response shape (Hutchinson et al., 2010). The main difference between these terms for the different analyzed monosaccharides is observed for the $\log(a)$ term (response intensity) of D-galactose which is lower compared to the $\log(a)$ term of D-glucose, D-xylose, L-arabinose and D-mannose. This difference could come from the nebulization step of the CAD (Dixon, 2002).



CAD: Charged aerosol dectector

Fig 2. LC-CAD non linearized (left) and log linearized (right) calibration lines of a) D-glucose, b) D-xylose, c) L-arabinose, d) D-mannose and e) D-galactose

Table 3. Equation terms ($\log(a)$: response intensity ; b : response shape) that fit the calibration lines of D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose, respectively, based on 5 independent measurements for each compound

	D-Glucose	D-Xylose	L-Arabinose	D-Mannose	D-Galactose
$\log(a)$	5.872 $\pm$ 0.018	5.825 $\pm$ 0.020	5.828 $\pm$ 0.036	5.824 $\pm$ 0.015	5.209 $\pm$ 0.041
b	0.859 $\pm$ 0.009	0.913 $\pm$ 0.006	0.875 $\pm$ 0.048	1.014 $\pm$ 0.048	1.020 $\pm$ 0.009

3.2. Optimization of the sulfuric acid hydrolysis

The optimal SAH conditions were identified using a Box-Behnken experimental design. As presented in Table 1, the response of the cellulose, hemicelluloses, xylan, arabinan, mannan, galactan and cellulose+hemicelluloses contents for 5 different biomasses (tall fescue, fiber sorghum, fiber hemp, miscanthus and jerusalem artichoke) were tested for the following parameters: the incubation temperature of the first H₂SO₄ step, the incubation time of the first H₂SO₄ step, the concentration of the second H₂SO₄ step and the incubation time of the second H₂SO₄ step. The ANOVA analysis determined that the incubation time of the second H₂SO₄ step was by far the most significant factor (P-value < 0,0001) of the sulfuric acid hydrolysis (excluding the type of biomass factor) for the cellulose+hemicelluloses content whereas the incubation time and temperature of the first H₂SO₄ step and the H₂SO₄ concentration of the second H₂SO₄ step had P-value of 0.714, 0.013 and 0.819 respectively. Fig. 3 illustrates the influence of these 4 factors on the response of the cellulose+hemicelluloses content for the 5 different vegetal biomasses tested, with the confidence interval (dotted line).

The optimal conditions for the SAH were similar for all compounds and all biomasses. Therefore, we decided to continue the study with only 3 of the 5 biomasses, i.e. one of the dicotyledons (fiber hemp), one of the perennial monocotyledons (tall fescue) and the annual monocotyledon (fiber sorghum), because of their distinctive botanical characteristics.

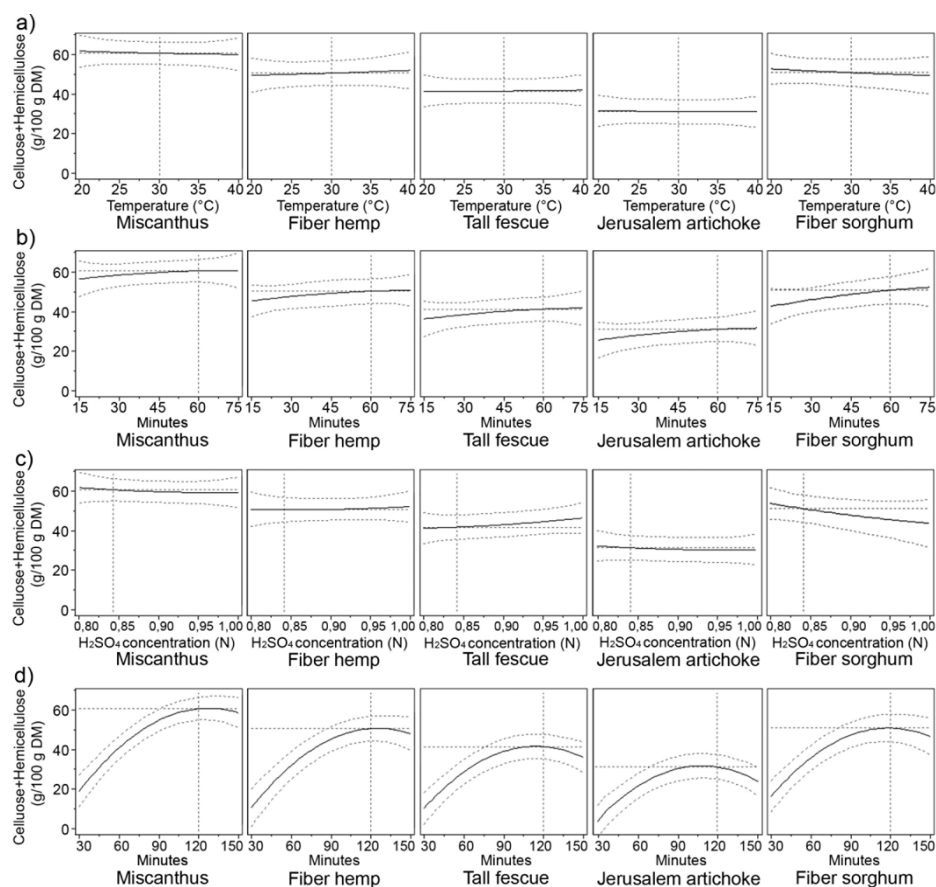


Fig 3. Cellulose+hemicelluloses content response for the different vegetal biomasses tested, as a function of a) the incubation temperature (°C) of the first H_2SO_4 step b) the incubation time (min) of the first H_2SO_4 step c) the H_2SO_4 concentration (N) of the second H_2SO_4 step d) the incubation time (min) of the second H_2SO_4 step. The dotted lines correspond to the 95% confidence interval

3.3. Comparison of structural carbohydrates determined by the NDE-SAH-LC-CAD and VS methods

The composition of the 3 selected biomasses (tall fescue, fiber sorghum, fiber hemp) was determined in more details by both the NDE-SAH-LC-CAD and the VS methods. The mean contents of cellulose, hemicelluloses and cellulose+hemicelluloses are shown in Table 4, as well as the xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan that can only be determined by the NDE-SAH-LC-CAD method. Both methods show similar significantly higher hemicelluloses and lower cellulose contents in the monocotyledons (fiber sorghum and tall fescue: about 19 g of hemicelluloses per 100 g DM and 27 g of cellulose per 100 g DM by the NDE-SAH-LC-CAD method) as compared to the dicotyledon (fiber hemp: about 16 g of hemicelluloses per 100 g DM and 42 g of cellulose per 100 g DM by the NDE-SAH-LC-CAD method). These differences are consistent with those previously reviewed by Godin et al. (Godin et al., 2010) and with the botanical differences between commeniloid monocotyledons and non commeniloid dicotyledons (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2010). The cellulose and hemicelluloses contents determined by the VS method are higher than those obtained by the NDE-SAH-LC-CAD method by $5\text{-}15\text{g}_{\text{cellulose}}/100\text{g}_{\text{DM}}$ and $3\text{-}6\text{g}_{\text{hemicelluloses}}/100\text{g}_{\text{DM}}$, respectively (excepted for fiber hemp hemicelluloses, that will be discussed below). These differences between the VS method and the SAH method are consistent with those previously observed by Wolfrum (Wolfrum et al., 2009). The NDE-SAH-LC-CAD method measures specifically the monosaccharide content of cellulose and hemicelluloses, while the cellulosic and hemicellulosic contents determined by the VS method are overestimated because the NDF fraction also contains some proteins and the ADL doesn't contain the acid soluble lignin (Jung, 1997). In the case of fiber hemp, the hemicellulosic content determined by the VS method was lower than with the NDE-SAH-LC-CAD. This can be explained by the presence of some pectins in the ADF fraction, as can be observed with pectin-rich dicotyledons (Jung, 1997 ; Ampuero, 2008).

The advantage of the NDE-SAH-LC-CAD chromatographic method, as compared to the VS gravimetric method, is that the NDE-SAH-LC-CAD method

also provides the composition of the hemicelluloses (xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan). Table 4 shows that the characterization of this composition is useful as there is a significant difference in the hemicellulosic composition of fiber sorghum and tall fescue (monocotyledons, richer in xylan and arabinan) on one hand and fiber hemp (dicotyledon, richer in mannan and galactan) on the other hand. These differences can be explained by the botanical differences of the biomasses, as explained above (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2010).

Table 4. Mean values of the results of the NDE-SAH-LC-CAD method for the analyzed polysaccharides and comparison with the mean values results of the VS method for the same biomass samples

Compound			Fiber sorghum	Tall fescue	Fiber hemp
Mean content by VS method:					
Cel.	g/100 g DM		33.4±1.7	33.5±1.7	56.3±1.7
Hem.	g/100 g DM		23.8±2.5	22.9±2.5	11.0±2.5
Cel.+Hem.	g/100 g DM		57.2±2.1	56.4±2.1	67.3±2.1
Mean content by NDE-SAH-LC-CAD method:					
Cel.	g/100 g DM		27.1±1.0	27.3±1.1	41.7±1.2
Hem.	g/100 g DM		20.3±0.5	18.9±0.4	16.4±0.2
Xylan	g/100 g DM		15.8±0.6	13.0±0.4	9.3±0.2
Arabinan	g/100 g DM		2.03±0.06	2.40±0.09	0.49±0.04
Mannan	g/100 g DM		0.35±0.02	0.34±0.02	2.67±0.12
Galactan	g/100 g DM		0.41±0.03	0.73±0.06	2.12±0.13
Hemicellulosic glucan	g/100 g DM		1.64±0.07	2.41±0.10	1.84±0.09
Cel.+Hem.	g/100 g DM		47.5±1.3	46.3±1.4	58.1±1.3

Cel.: Cellulose ; CAD: Charged aerosol detector ; Hem.: Hemicelluloses LC: Liquid chromatography ; NDE: Neutral detergent extraction ; SAH: Sulfuric acid hydrolysis; VS: Van Soest

3.4. Comparison of the dispersion of the results of the NDE-SAH-LC-CAD and VS methods

As only the first extraction step is shared between the NDE-SAH-LC-CAD and the VS method and each step can be responsible for some variability, we decided to compare the precision of both methods. The precision of a method corresponds to the random variability within one series of measurements performed on different subsamples of the same sample. The precision of the NDE-SAH-LC-CAD method was assessed at the 3 different polysaccharides concentration levels offered by the 3 analyzed vegetal biomasses. For polysaccharide concentrations above 5 g/100 g DM (i.e. cellulose, hemicelluloses, xylan and cellulose+hemicelluloses), the highest values seen of the RSDr and the RSDi were respectively 2.3% and 3.6% (Table 5). In the concentrations range 1 to 5 g/100 g DM (i.e. arabinan, mannan and galactan), the highest values seen of the RSDr and the RSDi were respectively 2.9% and 4.3% (Table 5), excepted for galactan whose RSDi was equal to 5.5%. This higher RSDi value can be explained by the lower galactose response intensity ($\log(a)$) (Table 3). For polysaccharide concentrations below 1 g/100 g DM (i.e. arabinan, mannan and galactan), the highest values seen of the RSDr and the RSDi were respectively 4.7% and 7.4% (Table 5). The RSDr and RSDi of the NDE-SAH-LC-CAD increase with decreasing polysaccharide concentrations, as also observed by the works of Horwitz (Boyer et al., 1985 ; Heuskin et al., 2010). The increase of the RSDi was higher than for the RSDr one. This can be explained by the fact that the intermediate precision variability (RSDi) depends on the variability within and between series whereas the variability of the repeatability (RSDr) only depends on the variability within series. The variability between series is usually higher than the variability within series. The RSDi of the cellulose, xylan, galactan and arabinan content of fiber sorghum, tall fescue and fiber hemp determined by our NDE-SAH-LC-CAD in this study are similar to the RSD of the cellulose, xylan, galactan and arabinan content of corn stover and sugarcane bagasse determined by the SAH method of Sluiter (Sluiter et al. 2008a) in the study of Templeton (Templeton et al., 2010).

The expanded uncertainty can be used to compare the dispersion of the NDE-SAH-LC-CAD method to the VS method (ISO 17025, 2005 ; Feinberg et al., 2004). Table 5 shows that the expanded uncertainties (U_x), i.e. the dispersion, for the cellulose and hemicelluloses contents were lower for the NDE-SAH-LC-CAD method than for the VS method. This difference can probably be explained by the fact that each result of the VS method depend on two measurements (ADF-ADL and NDF-ADF) while the NDE-SAH-LC-CAD method measure directly the desired value.

The precision profiles of the NDE-SAH-LC-CAD method are illustrated in Figs. 4 to 11. The β expectation at 95% tolerance limits of each precision profile are comprised within the acceptance limits that we fixed arbitrarily to values based on previous studies (Table 2). These results mean that at least 95% of the results of NDE-SAH-LC-CAD method are expected to fall within the acceptance limits. For the quantification of the cellulose, hemicelluloses, xylan, arabinan, mannan, galactan or cellulose+hemicelluloses, the precision of the NDE-SAH-LC-CAD method was better at concentration levels equal or above 1 g/100 g DM than at concentrations levels below 1 g/100 g DM except for galactan. For polysaccharide concentrations above 5 g/100 g DM (for cellulose, hemicelluloses, xylan and cellulose+hemicelluloses), all the expanded uncertainty values seen were not higher than 2.7 g/100 g DM for the NDE-SAH-LC-CAD method (Table 5). In the polysaccharide concentration range 1 to 5 g/100 g DM (for arabinan, mannan and galactan), all the expanded uncertainty values seen were not higher than 0.43 g/100 g DM for the NDE-SAH-LC-CAD method (Table 5). For polysaccharide concentrations below 1 g/100 g DM (for arabinan, mannan and galactan), all the expanded uncertainty values seen were not higher than 0.12 g/100 g DM for the NDE-SAH-LC-CAD method.

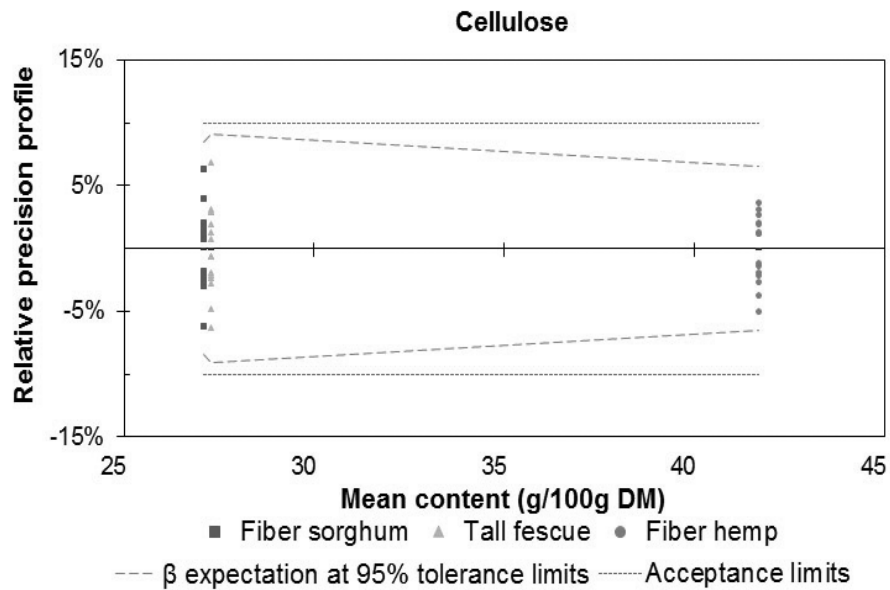


Fig 4. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for the cellulose, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

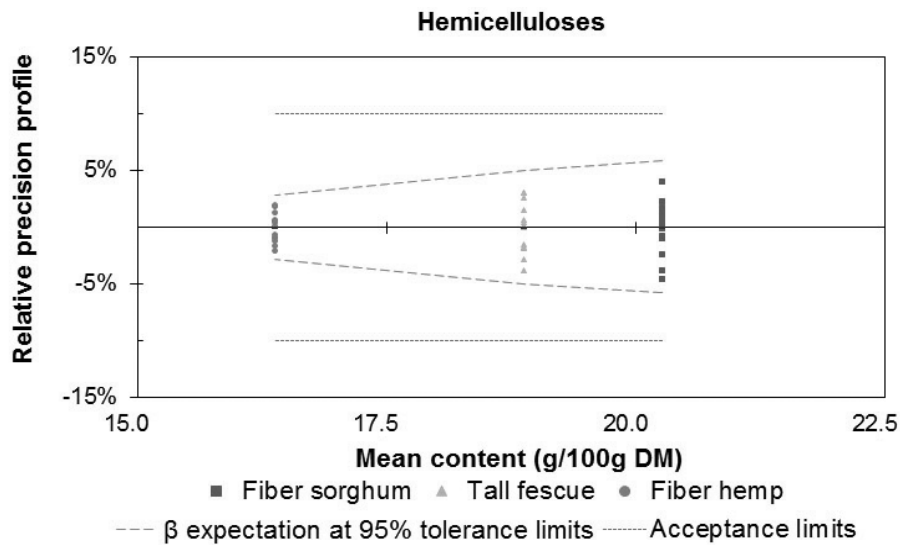


Fig 5. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for the hemicelluloses, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

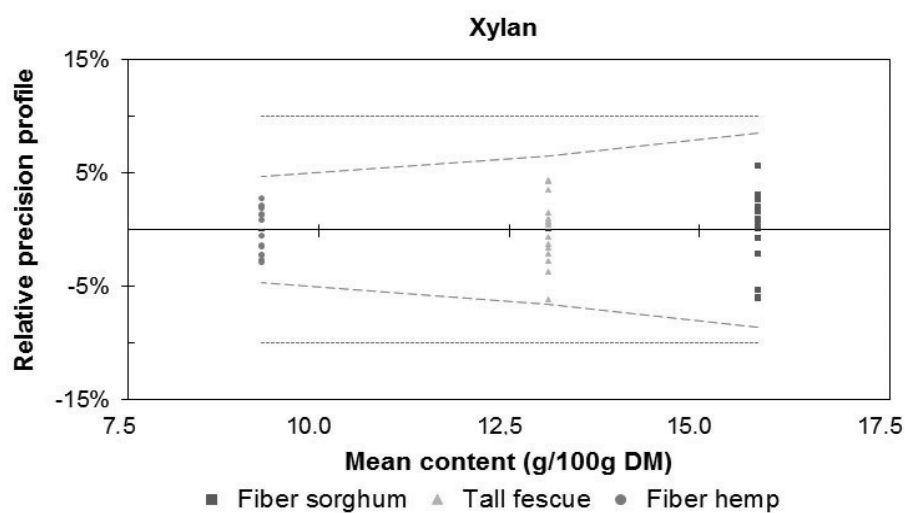


Fig 6. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for the xylan, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

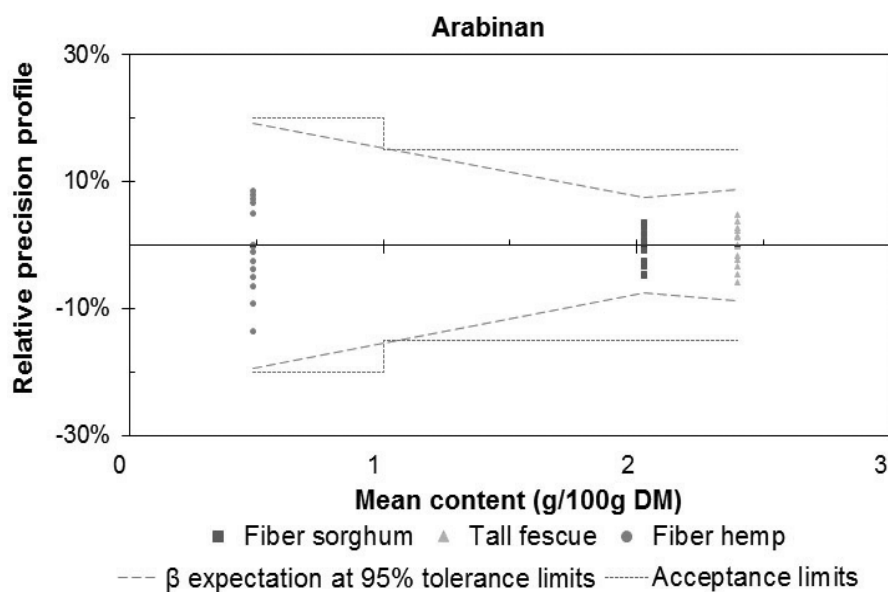


Fig 7. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for the arabinan, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

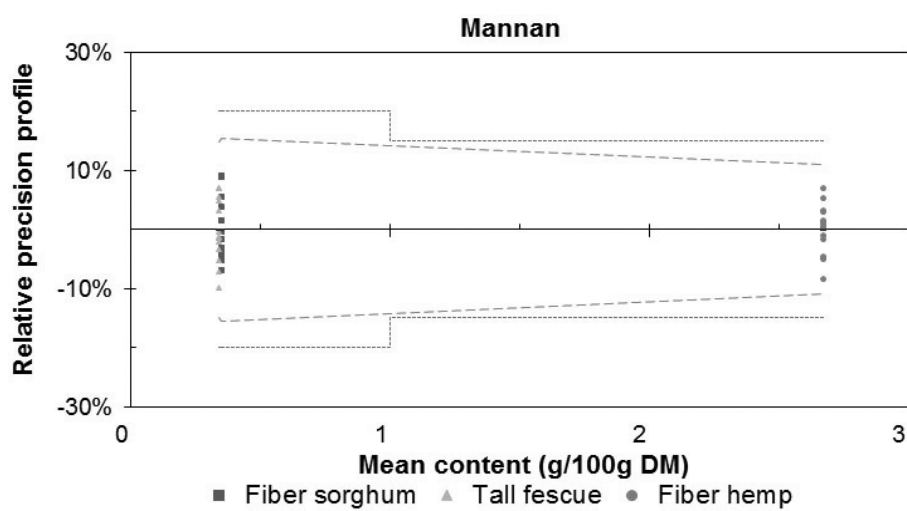


Fig 8. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for the mannan, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

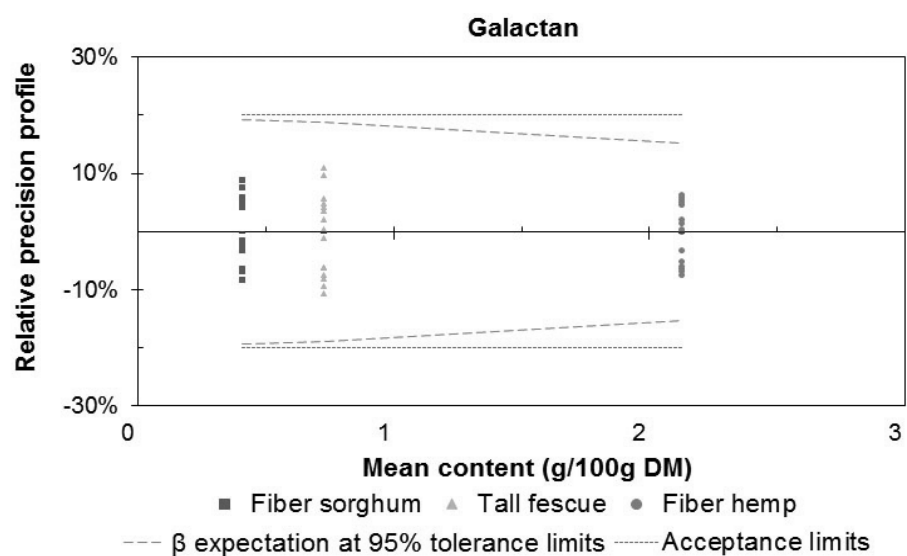


Fig 9. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for the galactan, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

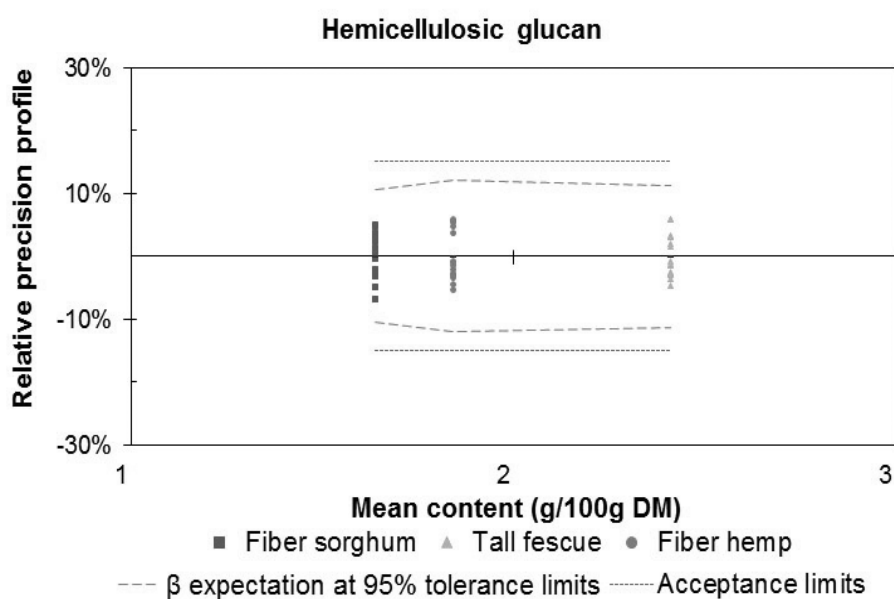


Fig 10. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for the hemicellulosic glucan, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

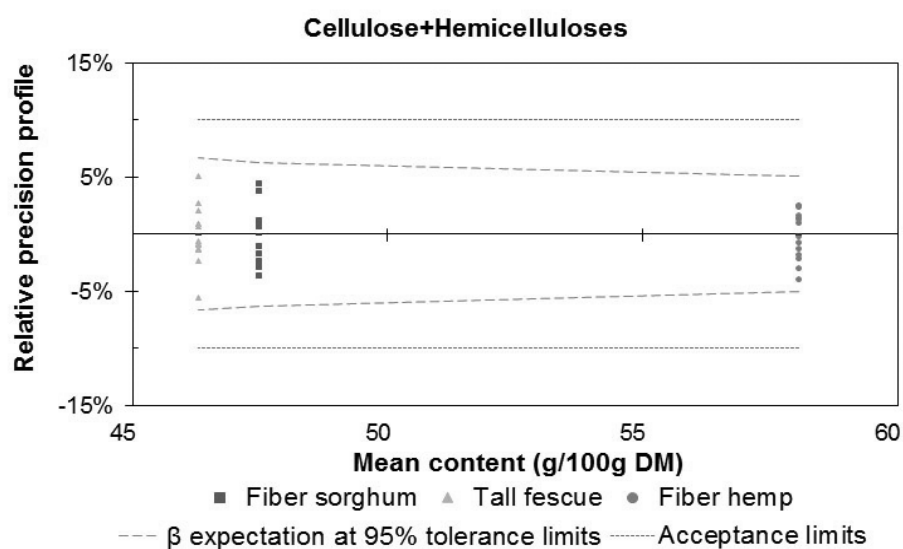


Fig 11. Relative precision profile of the NDE-SAH-LC-CAD method for cellulose+hemicelluloses, based on 45 experimental results (15 analyses * 3 biomasses)

Table 5. Dispersion values of the results of the NDE-SAH-LC-CAD method for the analyzed polysaccharides and comparison with the dispersion values of the VS method for the same biomass samples

Compound		Fiber sorghum	Tall fescue	Fiber hemp
Cel.	VS method:			
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	3.4	3.4	3.4
	NDE-SAH-LC-CAD method:			
	Repeatability RSD (RSDr), %	2.1	2.3	2.1
	Intermediate precision RSD (RSDi), %	3.4	3.6	2.7
	Uncertainty, %	3.6	3.9	2.9
Hem.	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	1.9	2.1	2.4
	VS method:			
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	5.0	5.0	5.0
	NDE-SAH-LC-CAD method:			
	Repeatability RSD (RSDr), %	1.7	2.2	1.3
	Intermediate precision RSD (RSDi), %	2.4	2.2	1.3
Xylan	Uncertainty, %	2.5	2.3	1.3
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	1.0	0.9	0.4
	NDE-SAH-LC-CAD method:			
	Repeatability RSD (RSDr), %	2.6	2.9	1.9
	Intermediate precision RSD (RSDi), %	3.5	2.9	2.1
	Uncertainty, %	3.7	3.0	2.2
Arabinan	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	1.2	0.8	0.4
	NDE-SAH-LC-CAD method:			
	Repeatability RSD (RSDr), %	1.7	2.4	2.9
	Intermediate precision RSD (RSDi), %	2.9	3.5	6.9
	Uncertainty (ux), %	3.1	3.7	7.5
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	0.12	0.18	0.07
Mannan	NDE-SAH-LC-CAD method:			
	Repeatability RSD (RSDr), %	2.8	2.8	2.9
	Intermediate precision RSD (RSDi), %	5.6	5.9	4.3
	Uncertainty, %	6.0	6.3	4.6
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	0.04	0.04	0.25
	NDE-SAH-LC-CAD method:			
Galactan	Repeatability RSD (RSDr), %	2.3	4.7	2.5
	Intermediate precision RSD (RSDi), %	6.4	7.4	5.5
	Uncertainty, %	6.9	8.0	5.9
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	0.06	0.12	0.25
	NDE-SAH-LC-CAD method:			
	Repeatability RSD (RSDr), %	1.9	1.1	2.1
Hemicellulosic glucan	Intermediate precision RSD (RSDi), %	3.8	3.7	4.3
	Uncertainty, %	4.1	4.1	4.7
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	0.20	0.39	0.43
	VS method:			
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	4.3	4.3	4.3
	NDE-SAH-LC-CAD method:			
Cel.+Hem.	Repeatability RSD (RSDr), %	1.6	2.1	1.8
	Intermediate precision RSD (RSDi), %	2.5	2.8	2.2
	Uncertainty, %	2.7	2.9	2.3
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	2.5	2.7	2.6
	VS method:			
	Expanded uncertainty (Ux), g/100 g DM	4.3	4.3	4.3

Cel.: Cellulose ; CAD: Charged aerosol detector ; DM: Dry matter ; Hem.: Hemicelluloses ; LC: Liquid chromatography ; NDE: Neutral detergent extraction ; RSD: Relative standard deviation ; SAH: Sulfuric acid hydrolysis; VS: Van Soest

4. Conclusions

The NDE-SAH-LC-CAD method that we developed for the quantification of the cellulose and hemicelluloses content of vegetal biomasses presents the advantage of providing information on the contents of xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan, that are not available with the reference VS method. The cellulose and hemicelluloses contents determined with the NDE-SAH-LC-CAD method are a bit lower than determined by the VS method. This can be explained by the presence of some other structural non-(hemi-)cellulosic compounds in the fractions that are considered as "cellulose" and "hemicelluloses" in the VS method. The precision of this new NDE-SAH-LC-CAD method is better as compared to that of the VS method. The precision of the NDE-SAH-LC-CAD method increased for polysaccharides contents above 1 g/100 g DM, but to a lesser extent for galactan. The precision profiles show that at least 95% of the results of the NDE-SAH-LC-CAD method are expected to fall within the selected acceptance limits. A wide range of structural polysaccharides concentration levels was covered with the 3 selected vegetal biomasses; nevertheless, future work could complete this range with intermediate compositions and extend it with biomasses such as gymnosperm wood that contains more cellulose, mannan and galactan (Carpita et al., 2000), and beet pulp that contains less cellulose, and more arabinan, mannan and pectins (Micard et al., 1996).

Acknowledgements

This research was funded by the Walloon Agricultural Research Center (CRA-W) with the support of the Belgian Science Policy. The authors are grateful to A. Bridoux for her technical support.

References

Ampuero S., 2008. *Détermination de la teneur en fibres dans les aliments pour animaux à ALP*. Posieux, France: ALP Posieux.

- Block S., Brkic D., Hubert Ph. & Quetin-Leclercq J., 2005.** A validated method for the quantification of pimarane and trachylobane diterpenes in the leaves of *Croton zambesicus* by capillary gas chromatography. *Phytochem. Anal.* **16**, 342-348.
- Boyer K., Horwitz W. & Albert R., 1985.** Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. *Anal. Chem.* **57**, 454-459.
- Brasseur C., Brose F., Pirlot A., Douny C., Eppe G., Maghuin-Rogister G. & Scippo M.-L., 2007.** Validation of the analytical procedure for the determination of polyaromatic hydrocarbons in smoke flavourings using high performance liquid chromatography coupled to an ultraviolet, diode array or fluorescence detector. *Accred. Qual. Assur.* **12**, 535-542.
- Bureau InterProfessionnel d'Etudes Analytiques (BIPEA), 2009.** *Interlaboratory comparison report: Natural meadow hay*. Gennevilliers, France : Bureau InterProfessionnel d'Etudes Analytiques.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall. In: Buchanan B., Gruissem W. & Jones R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists, 52-108.
- Chandel A., Singh O. & Rao L., 2010.** Biotechnological Applications of Hemicellulosic Derived Sugars: State-of-the-Art. In: Singh O. & Harvey S., eds., *Sustainable Biotechnology Sources of Renewable Energy*. New York, USA: Springer, 63-81.
- Chiap P., Hubert Ph. & Boulanger B., 1999.** Validation of an automated method for the liquid chromatographic determination of atenolol in plasma : application of a new validation strategy. *Anal. Chim. Acta* **391**, 227-238.
- Dixon R., 2002.** Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging. *Anal. Chem.* **4**, 2930-2937.
- Englyst H., Quigley M., Hudson G., & Cummings J., 1992.** Determination of Dietary Fibre as Non-starch Polysaccharides by Gas-Liquid Chromatography. *Analyst* **117**, 1707-1714.
- Englyst H., Quigley M. & Hudson G., 1994.** Determination of Dietary Fibre as Non-starch Polysaccharides With Gas-Liquid Chromatographic, High-performance Liquid Chromatographic or Spectrophotometric Measurement of Constituent Sugars. *Analyst* **119**, 1497-1509.

- ESA Biosciences, 2011.** *Corona CAD: The dawn of a new era in HPLC detection.* Chelmsford, MA, USA: ESA Biosciences.
- Feinberg M., Boulanger B., Dewé W. & Hubert P., 2004.** New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal. Bioanal. Chem.* **380**, 502-514.
- Feinberg M., 2006.** Approche globale et harmonisée de la validation. *Spect. Anal.* **249**, 16-23.
- Feinberg M., 2007.** Validation of analytical methods based on accuracy profiles. *J. of Chromatogr. A* **1158**, 174-183.
- Feinberg M., Sohier D. & David J.-F., 2009a.** Validation of an Alternative Method for Counting Enterobacteriaceae in Foods Based on Accuracy Profil. *J. of AOAC International* **92**, 527-537.
- Feinberg M., San-Redon J. & Assié A., 2009b.** Determination of complex polysaccharides by HPAE-PAD in foods: Validation using accuracy profile. *J. Chromatogr. B* **877**, 2388-2395.
- Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Schmit T., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Goffart J.-P., Gerin P., Stilmant D. & Delcarte J., 2010.** Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**, 549-560.
- Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P. & Delcarte J., 2011.** Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **15**, 165-182.
- Heuskin S., Rozet E., Lorge S., Farmakidis J., Hubert P., Verheggen F., Haubruge E., Wathelet J.-P. & Lognay G., 2010.** Validation of a fast gas chromatographic method for the study of semiochemical slow release formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 962-972.
- Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C. & Valat L., 2004.** Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—part I. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **36**, 579-586.

Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L. & Rozet E., 2007a. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal – Part II. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **45**, 70-81.

Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L. & Rozet E., 2007b. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–Part III. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **45**, 82.

Hubert Ph., Nguyen-Huu J.-J., Boulanger B., Chapuzet E., Cohen N., Compagnon P.-A., Dewé W., Feinberg M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Valat L. & Rozet E., 2007c. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal Part IV. Examples of application. *J. Pharma. Biomed. Anal.* **48**, 760-771.

Hutchinson P., Li J., Farrell W., Groeber E., Szucs R., Dicoski G. & Haddad P., 2010. Universal response model for a corona charged aerosol detector. *J. of Chromatogr. A* **1217**, 7418-7427.

Inagaki S., Min J. & Toyooka T., 2007. Direct detection method of oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection. *Biomed. Chromatogr.* **21**, 338-342.

ISO, 2005. *ISO 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.* Geneva, Switzerland: ISO.

Jung H.-J., 1997. Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. *The J. of Nutr.* **127**, 810S-813S.

Kamm B. & Kamm M., 2004. Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 137-145.

Kpoviéssi D., Gbaguidi F., Gbénou J., Accrombessi G., Moudachirou M., Rozet E., Hubert Ph. & Quetin-Leclercq J., 2008. Validation of a method for the determination of sterols and triterpenes in the aerial part of *Justicia anselliana* (Nees) T. Anders by capillary gas chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**, 1127-1135.

- Mantanus J., Ziémons E., Lebrun P., Rozet E., Klinkenberg R., Streel B., Evrard B. & Hubert Ph., 2009.** Moisture content determination of pharmaceutical pellets by near infrared spectroscopy: method development and validation. *Anal. Chim. Acta* **642**, 186-192.
- Marini R., Chiap P., Boulanger B., Rudaz S., Rozet E. & Hubert Ph., 2006.** LC method for the determination of R-timolol in S-timolol maleate: Validation of its ability to quantify and uncertainty assessment. *Talanta* **68**, 1166-1175.
- Micard V., Renard C. & Thibault J.-F., 1996.** Enzymatic saccharification of sugar-beet pulp. *Enzyme and Microbial Technol.* **19**, 162-170.
- Morrison R. & Dolan J., 2005.** *Peak Fronting, Column Life, and Column Conditioning*. Iselin, NJ, USA: LCGC North America.
- Pistorino M. & Pfeifer B., 2008.** Polyketide analysis using mass spectrometry, evaporative light scattering, and charged aerosol detector systems. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1189-1193.
- Rozet E., Ceccato A., Hubert C., Ziemons E., Oprean R., Rudaz S., Boulanger B. & Hubert Ph., 2007a.** Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J. of Chromatogr. A* **1158**, 111-125.
- Rozet E., Wascotte V., Lecouturier N., Préat V., Dewé W., Boulanger B. & Hubert Ph., 2007b.** Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts. *Analytica Chimica Acta* **591**, 239-247.
- Schadel C., Blochl A., Richter A. & Hoch G., 2010.** Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 1-8.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. & Crocker D., 2008a.** *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*. Golden, Colorado, USA: National Renewable Energy Laboratory.
- Sluiter A., Ruiz, C R., Scarlata, Sluiter J. & Templeton D., 2008b.** *Determination of Extractives in Biomass*. Golden, Colorado, USA: National Renewable Energy Laboratory.

- Sluiter J., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter A. & Templeton D., 2010.** Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043-9053.
- Strahm E., Rudaz S., Veuthey J.-L., Saugy M. & Saudan C., 2008.** Profiling of 19-norsteroid sulfoconjugates in human urine by liquid chromatography mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **613**, 228-237.
- Theander O., Aman P., Westerlund E., Andersson R. & Pettersson D., 1995.** Total Dietary Fiber Determined as Neutral Sugar Residues Uronic Acid Residues, and Klason Lignin (The Uppsala Method): Collaborative Study. *J. of AOAC International* **78**, 1030-1044.
- Templeton D., Scarlata C., Sluiter J. & Wolfrum E., 2010.** Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 2. Method Uncertainties. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9054-9062.
- Chromatography Application Notes, 2008.** *Carbohydrate Analysis HPLC Columns*. Omaha, NE, USA: Transgenomic.
- Van Soest P., 1973.** Collaborative Study of Acid-Detergent Fiber and Lignin. *J. of the AOAC* **56**, 781-784.
- Van Soest P. & Robertson J., 1985.** *Analysis of forages and fibrous foods*. Ithaca, New York, USA: Department of Animal Science, Cornell University.
- Van Soest P. & Wine R., 1967.** Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell Wall Constituents. *J. of the AOAC* **50**, 50-55.
- Vehovec T. & Obreza A., 2010.** Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. *J. of Chromatogr. A* **1217**, 1549-1559.
- Vervoort N., Daemen D. & Torok G., 2008.** Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography. *J. of Chromatogr. A* **1189**, 92-100.
- Willför S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J., Laine C., Suurnäkki A., Saake B., Uotila K., Simolin H., Hemming J. & Holmbom B., 2009.** Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. Industrial crops and products. *Industrial Crops and Product* **29**, 571-580.

Wolfrum E., Lorenz A. & de Leon N., 2009. Correlating detergent fiber analysis and dietary fiber analysis data for corn stover collected by NIRS. *Cellulose* **16**, 577-585.

Partie 2

Chapitre 6

Comparaison du dosage de la cellulose et des hémicelluloses entre la méthode NDE-SAH-LC-CAD et la méthode de Van Soest

Adapté de la publication :

Godin B., Agneessens R., Gerin P. A., Delcarte J., 2013. Structural carbohydrates in plant biomasses: correlations between the detergent fiber and the dietary fiber methods, *Biomass and Bioenergy*. Soumis

Nous avons mis en œuvre la méthode NDE-SAH-LC-CAD pour caractériser un grand nombre de biomasses végétales (49 espèces ; 461 échantillons) et pour la comparer à une méthode de référence, celle de Van Soest. En comparant les deux méthodes, nous avons observé que la méthode Van Soest surestime les teneurs en cellulose (en moyenne de 15,3% pour les biomasses commélinoides et 34,7% pour les biomasses angiospermes non-commélinoides) et en hémicelluloses (en moyenne de 9,5% pour les biomasses commélinoides), sauf pour la teneur en hémicelluloses dans les biomasses angiospermes non-commélinoides qu'elle sous-estime (en moyenne de 20,0%). Le calcul de la teneur en cellulose et en hémicelluloses par la méthode de Van Soest est entaché d'un biais car elle est basée sur des fractions contenant d'autres constituants structuraux non-(hémi-)cellulosiques. L'ampleur de ces biais indique que, pour les teneurs en cellulose et en hémicelluloses, il est primordial de savoir avec quelle méthode ces molécules sont quantifiées. Cette donnée est essentielle pour les filières de valorisation des biomasses pour estimer correctement les potentialités liées à l'utilisation de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses. Nous avons montré que les résultats qui seraient obtenus par la méthode NDE-SAH-LC-CAD peuvent néanmoins être prédits par la méthode de Van Soest à l'aide des équations de conversion que nous avons établies. Ces équations sont à choisir sur base d'une connaissance générale de la nature de la biomasse analysée. L'intérêt de ceci réside dans le fait que, par rapport à la méthode NDE-SAH-LC-CAD, la méthode de Van Soest est plus rapide, moins chère et est une méthode de référence courante pour estimer les teneurs en cellulose et en hémicelluloses. Néanmoins, l'avantage de la méthode NDE-SAH-LC-CAD est d'également donner la composition monosaccharidique des hémicelluloses. Comme les hémicelluloses sont constituées de plusieurs types de monosaccharides, cette méthode est nécessaire pour avoir une meilleure compréhension concernant la conversion des hémicelluloses en biocombustibles liquides de type alcool et en bioproduits.

Keywords. Cellulose, Hemicelluloses, Xylan, Correlation, Biofuel

1. Introduction

The main chemical components of plant biomasses are generally cellulose (linear structural polysaccharide homogeneously composed of D-glucose units), hemicelluloses (ramified structural polysaccharides heterogeneously composed of D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose and D-glucose units) and lignin (phenyl propanoid polymer composed of syringyl, guaiacyl and p-hydroxyphenyl units). Biomasses also contain other compounds such as pectins (ramified heterogeneous structural polysaccharides mainly composed of D-galacturonic acid units), starch (linear or ramified homogeneous non-structural polysaccharide composed of D-glucose units), soluble sugars (D-glucose, D-fructose, sucrose and fructans), proteins and mineral compounds (Carpita et al., 2000 ; Pauly et al., 2008).

The Van Soest (VS) sequential fiber solubilization method is widely used to assess the cellulose, hemicelluloses and lignin contents of plant feedstocks and to predict the nutritive value of these materials. This gravimetric method classifies the cell wall components of plant biomasses into three types of insoluble residues: neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and acid detergent lignin (ADL) residues. The neutral detergent extraction is operated by refluxing a biomass sample in a boiling aqueous detergent at pH 7 for 1 h (Van Soest et al., 1967). The NDF residue represents the incompletely digestible portion of forages that is composed of cellulose, hemicelluloses and lignin (Jung et al., 2004). The acid detergent extraction is operated by refluxing a biomass sample in a boiling aqueous detergent containing 1 N sulfuric acid for 1 h (Van Soest et al., 1973). Cellulose and lignin are the cell wall components recovered in the insoluble ADF residue. The acid detergent extraction has been developed as a pretreatment prior to the measurement of lignin as ADL. After the acid detergent procedure, the remaining structural carbohydrates of the ADF residue are solubilized by 72% (w/w) sulfuric acid at room temperature for 3 h (Van Soest et al., 1973). The residual insoluble ADL fraction represents an indigestible portion of forages (Jung et al., 2004). The gravimetric difference between ADF and ADL insoluble residues is used to estimate the content of cellulose. The gravimetric difference between the NDF and ADF

insoluble residues is used to estimate the content of hemicelluloses. The ADL insoluble residue is used to estimate the content of lignin (Jung, 1997 ; Jung et al., 2004). The VS method shows some deficiencies in accuracy. It overestimates the contents of cellulose and hemicelluloses, and underestimates the content of lignin (Theander et al., 1993 ; Jung, 1997). This can be explained by the fact that the:

- NDF residue contains some proteins (Theander et al., 1993 ; Jung, 1997);
- ADF residue contains some pectins when the analyzed biomass (such as a non-commelinid magnoliophyta biomass) has a high content of pectins (Jung, 1997 ; Jung et al., 2004 ; Ampuero, 2008) ;
- ADF residue contains some hemicelluloses (Morrison, 1980) ;
- ADL residue doesn't contain the acid soluble lignin (Jung, 1997).

Dietary fiber methods such as the NDE-SAH-LC-CAD method (Godin et al., 2011) are based on the Uppsala method (Theander et al., 1995 ; Sluiter et al., 2010). They are used to assess dietary fibers in animal and human food, and on crop feedstocks that are of interest as source of fibers, biofuels (such as bioethanol and biobutanol), and bio-based chemicals (Sluiter et al., 2010).

The NDE-SAH-LC-CAD method is used to determine more accurately the contents of cellulose and hemicelluloses, as compared to the VS method. The NDE-SAH-LC-CAD method quantifies the structural polysaccharides based on their monosaccharidic components (D-glucose, D-xylose, L-arabinose, D-mannose and D-galactose) (Godin et al., 2011). In the NDE-SAH-LC-CAD method, samples are first extracted by the Van Soest neutral detergent to remove all compounds that interfere with the subsequent sulphuric acid hydrolysis and chromatographic quantification of the cellulosic and hemicellulosic monosaccharides. The total glucan, xylan, arabinan, galactan and mannan contents are then determined by a two stage sulfuric acid hydrolysis method (SAH). The first stage solubilizes the structural carbohydrates by 72% w/w sulfuric acid at 30°C for 1 h and the second stage hydrolyzes these solubilized structural carbohydrates by 4% w/w sulfuric acid at 121°C for 2h (Godin et al., 2011). The released monosaccharides are separated and quantified by liquid chromatography (LC). The content of hemicellulosic glucan is determined by the same NDE-SAH-LC-CAD method except that the cellulose solubilization step (incubation with 72% w/w sulfuric acid at 30°C for 1 h) is omitted (Godin et al., 2011). The content of cellulose (cellulosic glucan ; ie D-

glucose of cellulose under its polymeric form) is calculated as the difference between the total glucan and the hemicellulosic glucan contents (Godin et al., 2011). The monosaccharidic components (D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-mannose and D-galactose) of hemicelluloses are expressed under their polymeric form (xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, mannan and galactan). In the NDE-SAH-LC-CAD method, the hemicelluloses content is considered as the sum of the xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan contents (Godin et al., 2011). To correct the results for any underestimation of the monosaccharides concentrations due to acidic degradation, a standard mixture of monosaccharides is treated with sulfuric acid in parallel with the samples (Theander et al., 1995 ; Sluiter et al., 2008 ; Godin et al., 2011).

The relationship between the contents of cellulose and hemicelluloses determined by the VS and the dietary fiber methods similar to the NDE-SAH-LC-CAD has been investigated by Theander et al. (1993) on a dataset including miscanthus (*Miscanthus sinensis* Anderss.), reed canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.), smooth brome grass (*Bromus inermis* L.), alfalfa leaf and stem (*Medicago sativa* L.). They showed that the VS method overestimates cellulose and hemicelluloses, as compared to the dietary fiber method, except for alfalfa (a non-commelinid magnoliophyta biomass compared to other biomasses which are commelinids) where the VS method underestimates the content of hemicelluloses. The VS and the dietary fiber methods have also been compared on alfalfa stems by Jung et al. (2004) and on corn stover by Wolfrum et al. (2009). In spite of the bias mentioned above, there was a very good correlation between both methods. Cellulose results of one method can be consistently and confidently converted to the expected results of the other method owing to this correlation. The reliability of this conversion has not been established for the other parameters, like the hemicelluloses content.

The VS method is faster, cheaper and more commonly practiced, as compared to the NDE-SAH-LC-CAD method. The advantage of the chromatographic NDE-SAH-LC-CAD method, as compared to the gravimetric VS method, is that the NDE-SAH-LC-CAD method also provides the monosaccharidic composition of the hemicelluloses (xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan) and of cellulose (cellulosic glucan) (Godin et al, 2011).

Predicting the cellulose, hemicelluloses and xylan contents directly from the results of the VS method would offer an interesting alternative to the time and resource-consuming NDE-SAH-LC-CAD methods. The purpose of the present study is to check the feasibility and reliability of such a prediction on commelinid and on non-commelinid magnoliophyta biomasses. The correlation between the results of the NDE-SAH-LC-CAD and the VS methods was therefore investigated for the contents of, cellulose, hemicelluloses, the non individualized sum of cellulose+hemicelluloses and the hemicellulosic components (xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan) of a wide diversity of plant biomasses.

2. Material and methods

2.1. Biomass material and chemicals

Miscanthus giganteus (*Miscanthus x giganteus* J.M. Greef & Deuter ex Hodk. & Renvoize ; cultivars: Bical and Tournai), switchgrass (*Panicum virgatum* L. ; cultivars: Alamo, Blackwell, Cave-in-Rock, Dacotah, Kanlow, Nebraska 28, Shelter and Traiblazer), fiber sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench ; cultivars: CA25, ENR10, H133, Maja and Zerberus), spelt straw (*Triticum aestivum* L. ssp. *spelta* (L.) Thell. ; cultivars: Badengold and Cosmos), “cocksfoot-alfalfa” mixture (*Dactylis glomerata* L. cultivar Terrano - *Medicago sativa* L. cultivar Europe), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. ; cultivars: Hykor, Jordane, Kora, Perun and Soni), immature rye (*Secale cereale* L. ; cultivars: Protector and Vitalio), fiber corn (*Zea mays* L. ; cultivars: Aayrton, Atlético, Aventura, Beethoven, Cannavaro, Coryphée, Dominator, Franky, Ladifférence, LG Azelo, Olympus, Ricardinio and Ronaldinio), hemp (*Cannabis sativa* L. ; cultivars: Epsilon 68, Fedora 17 and Futura 75) and jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. ; cultivar: Volkenroder spindel ; leaf & stalk) samples came from randomized blocks designed crop trials performed in 2007, 2008, 2009 and/or 2010 at Libramont (498 m above sea level (asl) ; average annual temperature: 8.6°C ; average annual precipitation: 1260 mm ; 49°55'N, 05°24'E ; Belgium) and at Gembloux (161 m asl ; average annual temperature: 9.8°C ; average annual precipitation: 856 mm ; 50°33'N, 04°43'E). Depending on the crop, trials were performed with different nitrogen fertilization levels, different

cultivars and/or different harvest periods. For each biomass sample, a plot between 9 and 24 m² of the whole above ground biomass was harvested and chopped at 10 cm from the ground with a Haldrup M-65 harvester.

Reed (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud ; cultivar: Humilis), spelt grains (*Triticum aestivum* L. ssp. *spelta* (L.) Thell. ; cultivars: Cosmos), onion leaf and bulb (*Allium cepa* L. ; cultivar: Sonia), yucca leaf (*Yucca gloriosa* L. ; cultivar: Variegata), tulip tree wood (*Liriodendron tulipifera* L.), amaranth (*Amaranthus viridis* L. ; cultivar: Amar), japanese knotweed (*Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr.), cabbage leaf (*Brassica oleracea* L. ; cultivar: Botrytis), rapeseed straw (*Brassica napus* L. ; cultivar: Aurum), pumpkin leaf & stalk (*Cucurbita maxima* Duchesne ; cultivar: Tromba), bean leafs & stalks (*Phaseolus vulgaris* L. ; cultivar: Goliath), alfalfa leafs & stalks (*Medicago sativa* L. ; cultivar: Astra), lupine leaf & stalk (*Lupinus albus* L. ; cultivar: Fortuna), oak wood (*Quercus* sp.), beech wood (*Fagus sylvatica* L.), willow wood (*Salix* sp.), aspen wood (*Populus* sp.), flax straw (*Linum usitatissimum* L. ; cultivar: Linus), nettle (*Urtica dioica* L.), bramble leaf & stalk (*Rubus fruticosus* L.), comfrey leafs & stalks (*Symphytum officinale* L. ; cultivar: De russi), jerusalem artichoke tuber (*Helianthus tuberosus* L. ; cultivar: Giant Russian), sunflower leaf & stalk (*Helianthus annuus* L.), tagetes (*Tagetes patula* L. ; cultivar: Nugget), green (unforced) and white (forced) leaf of chicory (*Cichorium intybus* L.), unforced and forced roots of chicory (*Cichorium intybus* L.), leaf & stalks and roots of carrot (*Daucus carota* L. ; cultivar: Karotant) samples were harvested manually in 2010 and/or 2011 in Wallonia (Belgium).

Immediately after the harvest, two representative subsamples of 750 g of the whole of each biomass were directly dried at 60°C for 72 h in a Memmert UFP800 oven (VWR, Heverlee, Belgium). After drying, they were first milled with a 4 mm screen hammer mill (BOA, Waterleau, Herent, Belgium) followed by a second milling step with a 1 mm screen cyclone mill (Cyclotec, FOSS Benelux N.V., Bruxelles, Belgium). The samples were stored in airtight bags at room temperature and protected from light in a dark box.

2.2. Chemical analysis

All chemicals were of analytical grade or equivalent and were purchased from VWR (Heverlee, Belgium) and Chem-Lab (Zedelgem, Belgium). Duplicate aliquots were measured on the 441 biomass samples.

Structural polysaccharides analyzed by the Van Soest method

The neutral detergent fiber residue (NDF: weight of the neutral detergent fiber residue) of the VS method was determined as described by Van Soest et al. (1967) except that 1000 U/g_{DM_sample} of an analytical thermostable α -amylase (Megazyme, Ireland) was added before the neutral detergent step for biomasses containing starch. The acid detergent fiber (ADF: weight of the acid detergent fiber residue) residue and acid detergent lignin (ADL: weight of the acid detergent lignin residue) of the VS method were determined as described by Van Soest et al. (1973) except that, prior to the ADF extraction, an extraction with the neutral detergent without adding sodium sulfite was carried out as done for the NDF. Cellulose+hemicelluloses of the VS method is calculated as NDF-ADL. The cellulose content was calculated as ADF-ADL and the hemicelluloses content was calculated as NDF-ADF (Van Soest et al., 1967 ; Van Soest et al., 1973). The terms “VS method” will be used to refer to data generated by the Van Soest fiber data (NDF, ADF, ADL and their combinations).

Structural polysaccharides analyzed by the sulfuric acid hydrolysis method

The samples were fractionated by the Van Soest neutral detergent extractions, with extraction 1: 0.1 mM phosphate buffer at pH 7 for 15 min at 90°C where 1000 U/g_{DM_sample} of an analytical thermostable α -amylase (Megazyme, Ireland) was added when the sample contained starch ; and extraction 2: Van Soest neutral detergent at 100°C for 1 h) (Godin et al., 2011). The xylan, arabinan, galactan, mannan and the total glucan contents of the insoluble residue left after these extractions were determined by a two stage sulfuric acid hydrolysis method (SAH), with stage 1: solubilization by 72% w/w sulfuric acid at 30°C for 1 h ; and stage 2: hydrolysis by 4% w/w sulfuric acid at 121°C for 2 h. The released monosaccharides were separated and quantified by a liquid chromatography (LC) system with a Carbo Sep CHO-682 Pb analytical LC column (300 mm x 7.8 mm

I.D. ; 7 μm particle size) (Interchrom, Montluçon, France) at 80°C using deionized water at 0.4 ml/min as mobile phase, with a charged aerosol detector (CAD), as described by Godin et al. (2011). The hemicellulosic glucan content was determined by the NDE-SAH-LC-CAD method except that the cellulose solubilization step (incubation with 72% w/w sulfuric acid at 30°C for 1 h) was omitted. The cellulose (cellulosic glucan ; ie D-glucose of cellulose under its polymeric form) content of the NDE-SAH-LC-CAD method is calculated as the difference between the total glucan and the hemicellulosic glucan contents. The hemicelluloses content of the NDE-SAH-LC-CAD method is calculated as the sum of the xylan, arabinan, galactan, mannan and hemicellulosic glucan contents. The content of cellulose+hemicelluloses of the NDE-SAH-LC-CAD method is calculated as the sum of the cellulose and hemicelluloses contents. The term “NDE-SAH-LC-CAD method” will be used to refer to data generated by the NDE-SAH-LC-CAD fiber data (cellulose, xylan, arabinan, galactan, mannan, hemicellulosic glucan and their combinations). The monosaccharidic components (D-xylose, L-arabinose, D-glucose, D-mannose and D-galactose) of hemicelluloses are expressed under their polymeric form (xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, mannan and galactan).

Hemicellulosic components of the ADF and the Weende residue

The ADF residue was prepared as described by Van Soest et al. (1973) except that, prior to the ADF extraction, an extraction with neutral detergent (without adding sodium sulfite) was performed as mentioned above. The Weende residue was extracted as described by (EU, 2009). Briefly, biomass samples were refluxed, in chronologic order, with boiling sulfuric acid 0.26 N for 30 min and with boiling potassium hydroxide 0.26 N for 30 min. The xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan content of the ADF and the Weende residue were determined by the same sulfuric acid hydrolysis method as described above.

2.3. Statistical analysis

The regression analyses of structural carbohydrates contents between the VS method and the NDE-SAH-LC-CAD method were performed using JMP 7.0.1 (SAS Institute, USA). The predictions made by a linear regression are considered as

reliable when the linear regression has a $R^2 \geq 0.81$ and a $RPD \geq 2.5$ (Tamaki et al., 2011).

3. Results and discussions

3.1. Main structural carbohydrates

The descriptive statistics of the structural carbohydrate contents among the 306 commelinid and the 108 non-commelinid magnoliophyta samples are shown in Tables 1 and 2, respectively. These two types of biomasses were separated because of the differences between their cell wall components. Commelinid magnoliophyta have higher cell wall contents of arabinoxylans, β -glucans and lignin (Carpita et al., 2000). Non-commelinid magnoliophyta have higher cell wall contents of xyloglucans, mannans and pectins (Carpita et al., 2000). The structural carbohydrates contained in these samples were determined by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD method. These two tables show that cellulose and hemicelluloses are the main chemical components of the DM. The average cellulose+hemicelluloses content represents more than the half of the DM of the analyzed commelinid biomasses, while it is less than the half of the DM for the non-commelinid magnoliophyta biomasses. The higher content of cellulose+hemicelluloses in commelinid magnoliophyta biomasses can be explained by the higher content of hemicelluloses and lower content of pectins in their cell walls, respectively (Carpita et al., 2000).

Table 1. Data set statistics of the structural carbohydrates contents in commelinid biomasses determined by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods (n=306)

Compound	Mean (g/100 g DM)	RSD (%)	Minimum (g/100 g DM)	Maximum (g/100 g DM)
Cellulose +Hemicelluloses VS	59.5	22	25.1	79.3
Cellulose +Hemicelluloses SAH	53.1	23	21.8	76.9
Cellulose VS	34.4	29	12.1	55.5
Cellulose SAH	29.9	28	9.7	50.6
Hemicelluloses VS	25.1	19	13.0	37.9
Hemicelluloses SAH	23.3	19	10.3	34.3
Xylan	17.1	24	5.8	27.8
Arabinan	2.72	19	1.75	4.12
Hemicellulosic glucan	2.03	28	0.87	3.76
Galactan	0.91	46	0.25	2.25
Mannan	0.54	33	0.17	0.96

DM: Dry matter ; RSD: Relative standard deviation ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ;
VS: Van Soest method

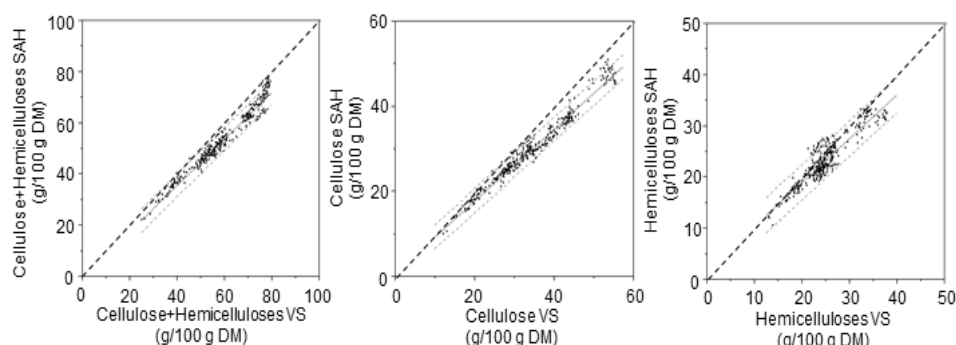
Table 2. Data set statistics of the structural carbohydrates contents in non-commelinid magnoliophyta biomasses determined by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods (n=108)

Compound	Mean (g/100 g DM)	RSD (%)	Minimum (g/100 g DM)	Maximum (g/100 g DM)
Cellulose +Hemicelluloses VS	41.1	48	7.6	80.1
Cellulose +Hemicelluloses SAH	36.2	52	5.0	71.2
Cellulose VS	31.9	52	5.3	66.0
Cellulose SAH	24.2	55	3.4	51.4
Hemicelluloses VS	9.3	43	1.6	21.8
Hemicelluloses SAH	12.0	49	1.2	25.8
Xylan	7.3	61	0.3	20.4
Arabinan	0.58	45	0.20	1.58
Hemicellulosic glucan	1.20	51	0.15	3.05
Galactan	1.73	40	0.34	3.43
Mannan	1.20	58	0.18	2.74

DM: Dry matter ; RSD: Relative standard deviation ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ;
VS: Van Soest

Figures 1 and 2 illustrate the relationship between the contents of cellulose+hemicelluloses, cellulose and hemicelluloses determined by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods, respectively. Tables 3 and 4 present the corresponding regression information. The cellulose+hemicelluloses, cellulose and hemicelluloses contents determined by the VS method are always higher, as

compared to the NDE-SAH-LC-CAD method, except in the case of the content of hemicelluloses in non-commelinid magnoliophyta biomasses (Tables 1 to 4 ; Figures 1 to 2). The overestimation of cellulose and hemicelluloses determined by the VS method can be explained by the fact that the NDE-SAH-LC-CAD method measures specifically the monosaccharidic contents of cellulose and hemicelluloses, while the cellulosic and hemicellulosic contents determined by the VS method are, respectively, dependent on the NDF residue which also contains some proteins and the ADL residue which doesn't contain the acid soluble lignin (Jung, 1997). The acid soluble lignin fraction is higher in commelinid compared to non-commelinid magnoliophyta biomasses (Theander et al., 1993). In commelinid magnoliophyta, lignin and hemicelluloses are bound through ferulate esters which are indeed more sensitive to acid hydrolysis (Jung, 1997 ; Carpita et al., 2000). Non-commelinid magnoliophyta have cell walls with a higher content of pectins, as compared to commelinids (Carpita et al., 2000). The presence of some pectins in their ADF residue also explains an overestimation of cellulose and an underestimation of hemicelluloses by the VS method (Jung, 1997 ; Carpita et al., 2000 ; Ampuero, 2008). These informations confirm that the relationship between the contents of cellulose+hemicelluloses, cellulose and hemicelluloses determined by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods for commelinid and for non-commelinid magnoliophyta biomasses must be determined separately.



DM : Dry matter ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ; VS: Van Soest method

Figure 1. Relationship between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods for the cellulose+hemicelluloses (left), cellulose (center) and hemicelluloses (right) content in commelinid biomasses (n=306). The black dashed line in each plot is the line of equality ($y=x$). The grey plain line in each plot is the regression line. The dashed grey line in each plot is the 95% confidence line of the regression.

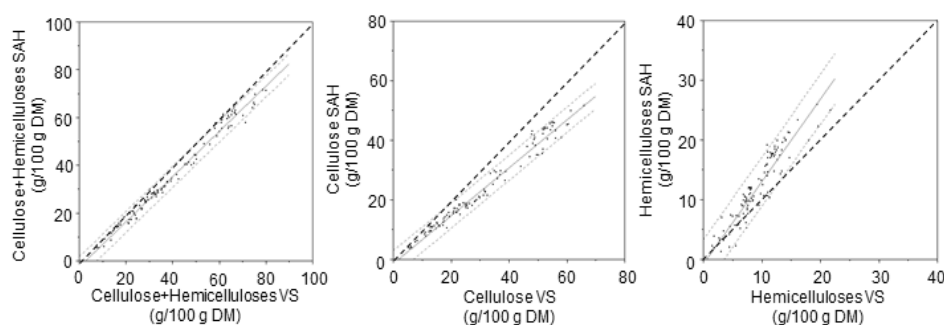
Table 3. Linear regression statistics data of structural carbohydrates contents in commelinid biomasses between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods (n=306)

Independent variable	Dependent variable	Slope	Intercept	R ²	RMSE	RPD
Cel.+Hem. VS	Cel.+Hem. SAH	0.906±0.010	-0.78±0.58 ^b	0.96	2.28	5.3
Cel. VS	Cel. SAH	0.844±0.008	0.81±0.29	0.97	1.43	5.9
Hem. VS	Hem. SAH	0.856±0.020	1.82±0.51	0.85	1.75	2.6
NDF	Cel.+Hem. SAH	0.758±0.065	3.96±0.44	0.98	1.86	6.5
NDF	Cel. SAH	0.508±0.010	-3.07±0.66	0.89	2.80	3.0
NDF	Hem. SAH	0.250±0.008	7.03±0.52	0.76	2.23	2.0
ADF	Cel. SAH	0.655±0.006	3.81±0.27	0.97	1.15	7.3

Uncertainties are expressed as ± standard deviation

^b Intercept of regression is not significantly different from zero ($p \geq 0.05$)

Cel.: Cellulose ; Hem.: Hemicelluloses ; NDF: Neutral detergent fiber ; RMSE: Root mean square error ; RPD: Ratio of the RMSE of prediction to the standard deviation of the dependent variable ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ; VS: Van Soest method



DM : Dry matter ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ; VS: Van Soest method

Figure 2. Relationship between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods for the cellulose+hemicelluloses, (left), cellulose (center) and hemicelluloses (right) content in non-commelinid magnoliophyta biomasses (n=108). The black dashed line in each plot is the line of equality ($y=x$). The grey plain line in each plot is the regression line. The dashed grey line in each plot is the 95% confidence line of the regression.

Table 4. Linear regression statistics data of structural carbohydrates contents in non-commelinid magnoliophyta biomasses between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD method (n=108)

Independent variable	Dependent variable	Slope	Intercept	R ²	RMSE	RPD
Cel.+Hem. VS	Cel.+Hem. SAH	0.945±0.011	-2.64±0.49	0.99	2.20	8.6
Cel. VS	Cel. SAH	0.803±0.012	-1.37±0.44	0.98	2.11	6.4
Hem. VS	Hem. SAH	1.381±0.049	-0.79±0.49 ^b	0.88	2.04	2.9
NDF	Cel.+Hem. SAH	0.818±0.013	-3.10±0.70	0.97	3.09	6.1
NDF	Cel. SAH	0.565±0.014	-2.98±0.76	0.94	3.37	4.0
NDF	Hem. SAH	0.252±0.005	-0.12±0.29 ^b	0.95	1.27	4.6
ADF	Cel. SAH	0.673±0.015	-1.90±0.65	0.95	2.99	4.5

Uncertainties are expressed as $\pm$ standard deviation

^b Intercept of regression is not significantly different from zero ($p \geq 0.05$)

Cel.: Cellulose ; Hem.: Hemicelluloses ; NDF: Neutral detergent fiber ; RMSE: Root mean square error ; RPD: Ratio of the RMSE of prediction to the standard deviation of the dependent variable ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ; VS: Van Soest method

The slope of the regressions (Tables 3 and 4) is an assessment of the bias between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods. The bias between these two methods affects, by order of increasing importance, the cellulose+hemicelluloses, cellulose and hemicelluloses contents. This could be explained by the fact that the ADF residue of the VS method contains some residual hemicelluloses, as also suggested by Morrison (1980). Indeed, an average of 16.3 g of hemicelluloses per

100 g of ADF residue was detected in the ADF residue of the analyzed biomasses (Figure 3). An average of 16.8 g of hemicelluloses per 100 g was also detected in the Weende residue (Figure 4). The Weende method aims at gravimetrically determining the cellulose content by means of an acid and alkaline extraction of all other components, including hemicelluloses.

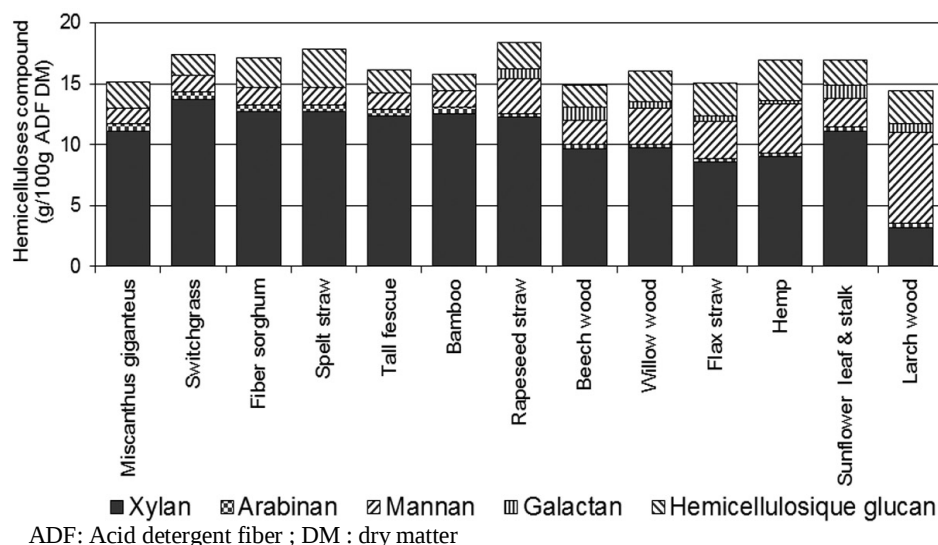


Figure 3. Hemicellulosic components detected in the ADF residue

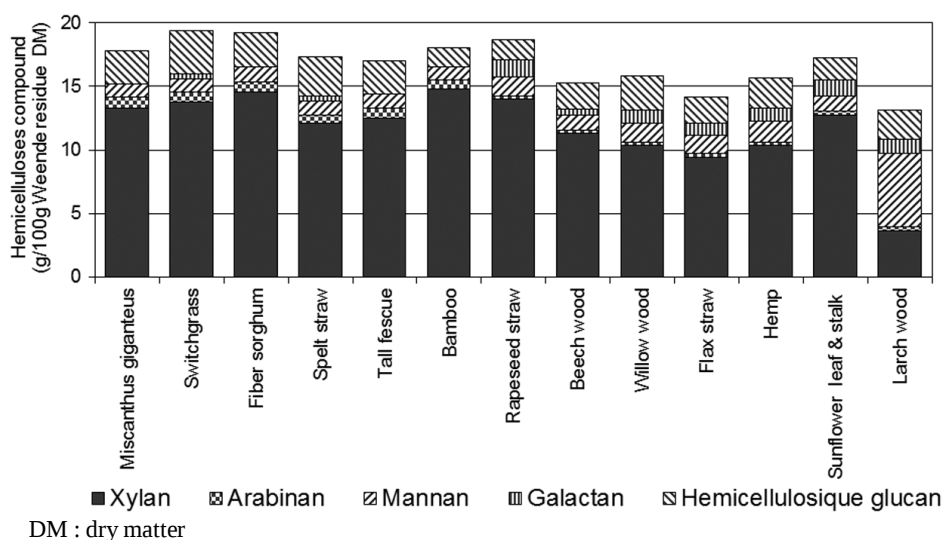


Figure 4. Hemicellulosic components detected in the Weende residue

Hemicelluloses are made of four types of structural polysaccharides: arabinoxylan, xyloglucan (which also contains galactan), β -glucan and mannan (which also contains galactan and hemicellulosic glucan) (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008). In the ADF and the Weende residues, the relative hemicellulosic components showed increased relative contents of hemicellulosic glucan and mannan, and decreased relative content of xylan, arabinan and galactan, as compared to the relative hemicellulosic components of native hemicelluloses of the analyzed samples (data not shown). This suggests that interaction of cellulose is stronger with xyloglucan and mannan, as compared to arabinoxylan. The high content of mannan in larch wood (Figures 4 and 5) is explained by its high content in the native hemicelluloses of the larch wood (data not shown). Larch wood is a member of pinophyta biomasses, which are known to have high content of mannan in their hemicelluloses (Carpita et al., 2000). The higher relative bias for cellulose+hemicelluloses of commelinid biomasses, as compared to non-commelinid magnoliophyta biomasses, is mainly due to the acid soluble lignin fraction which is higher in commelinid biomasses as explained above (Theander et al., 1993). The higher relative bias for cellulose and hemicelluloses of non-commelinid magnoliophyta biomasses, as compared to commelinid biomasses, is mainly due to the presence of some pectins in the ADF residue of non-commelinid magnoliophyta as explained above (Jung, 1997 ; Ampuero, 2008).

Owing to the large range of the contents of the various components and good correlations (values of $R^2 \geq 0.81$ and of $RPD \geq 2.5$) ; Tables 3 and 4), the regression lines seem to be reliable enough to use the relatively simple VS method to predict the values to be expected by the more tedious and resource consuming NDE-SAH-LC-CAD method. This is especially the case for the prediction made by cellulose+hemicelluloses VS, cellulose VS and hemicelluloses VS.

The suitability of using directly the NDF content to predict the cellulose+hemicelluloses content to be expected from the NDE-SAH-LC-CAD method was also tested (Tables 3 and 4). The NDF-based predictions are generally less reliable for the commelinid magnoliophyta biomasses, especially for the prediction of hemicelluloses SAH which is not reliable (value of $R^2 < 0.81$ and of $RPD < 2.5$) (Table 3). Indeed, the NDF residue also contains cellulose and lignin. In the case of the non-commelinid magnoliophyta biomasses, the prediction of SAH hemicelluloses is more reliable based on the NDF as compared to those based on the

hemicelluloses VS. This can be explained by the overestimation of hemicelluloses VS due to the presence of some pectins in the NDF residue (Jung, 1997 ; Ampuero, 2008).

The ADF content can also be used to predict the cellulose of the NDE-SAH-LC-CAD method (Tables 3 and 4). This prediction is generally slightly less reliable than the VS cellulose-based prediction probably due to the presence of lignin in ADF. The ADF provides always a slightly better prediction of the cellulose SAH compared to the same prediction given by the NDF, probably owing to the higher cellulose content in the ADF residue than in the NDF residue.

The relationships between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods are driven by the neutral detergent solubilized fraction (components such as non-structural carbohydrates, pectins, proteins, organic acids, alcohols, pigments, lipids and mineral compounds) for the cellulose+hemicelluloses, cellulose, hemicelluloses and xylan contents. Indeed, the NDF residue showed quite constant contents of these components for both commelinid and non-commelinid magnoliophyta biomasses (Tables A1 and A2 of the appendix). When these contents are expressed without taking into account the solubilized fraction by the neutral detergent (i.e. as relative contents of the NDF residue), as compared to these contents expressed on the total DM, the relative standard deviation (RSD) and the range (max-min) of these contents decreased significantly (Tables A1 and A2 of the appendix). In addition, as compared to these contents expressed on the total DM, the NDF-based prediction of these contents expressed as relative contents of the NDF residue are not reliable anymore for both commelinid and non-commelinid magnoliophyta biomasses (data not shown).

The relationship between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods is driven by the acid detergent solubilized fraction (components such as hemicelluloses, non-structural carbohydrates, pectins, proteins, organic acids, alcohols, pigments, lipids and mineral compounds) for the cellulose content. When it is expressed without taking into account the solubilized fraction by the acid detergent (i.e. as relative content of the ADF residue) (Tables A1 and A2 of the appendix), as compared to the cellulose content expressed on the total DM, the same observations are made as mentioned above for the NDF residue.

3.2. Monosaccharidic components of hemicelluloses

The composition of the hemicelluloses and the corresponding descriptive statistics are presented in Tables 1 and 2 for the data set of the 306 commelinid and of the 108 non-commelinid magnoliophyta samples, respectively. These two types of biomasses (commelinid and non-commelinid magnoliophyta) were separated because of the observed difference of their cell wall composition. The composition of the hemicelluloses can only be determined by the NDE-SAH-LC-CAD method. Xylan is the major hemicellulosic component of the analyzed samples, with contents more than two times higher in commelinid compared to non-commelinid magnoliophyta biomasses. The hemicelluloses content is indeed known to be higher in commelinid cell walls, where hemicelluloses substitute the pectins that are more present in non-commelinid magnoliophyta cell walls (Carpita et al., 2000). In addition, commelinid cell walls are known to have hemicelluloses with higher contents of arabinoxylan and β -glucan, whereas non-commelinid magnoliophyta cell walls have higher contents of xyloglucan and mannan (Carpita et al., 2000).

The average content of hemicellulosic components in commelinid biomasses is, by order of decreasing importance, xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan, while it is xylan, hemicellulosic glucan, galactan, mannan and arabinan for non-commelinid magnoliophyta biomasses (Tables 1 and 2). This is consistent with the known hemicelluloses compositions of these two types of biomasses as mentioned above (Carpita et al., 2000).

Table 5 indicates that xylan is the only individual hemicellulosic component that is sufficiently correlated with the hemicelluloses VS and NDF (values of $R^2 \geq 0.81$ and of $RPD \geq 2.5$), except for the hemicelluloses VS of commelinid magnoliophyta biomasses. Further investigation showed that no useful linear correlation (values of $R^2 < 0.81$ and/or of $RPD < 2.5$) can be detected between hemicelluloses VS or NDF and other individual SAH hemicellulosic components (data not shown). The fact that only xylan is highly correlated can be explained by its dominating contribution in the hemicellulosic component (73% w/w in commelinids, Table 1, and 61% w/w in non-commelinids magnoliophyta, Table 2) and its large range compared to the other hemicellulosic components.

Table 5. Best linear correlations between the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods for the monosaccharidic content of hemicelluloses of commelinid (n=306) and of non-commelinid magnoliophyta (n=108) biomasses

Independent variable	Dependent variable	Slope	Intercept	R ²	RMSE	RPD
<i>Commelinid magnoliophyta</i>						
NDF	Xylan	0.245±0.005	1.21±0.37	0.86	1.57	2.6
<i>Non-commelinid magnoliophyta</i>						
Hem. VS	Xylan	1.043±0.038	-2.35±0.38	0.88	1.58	2.8
NDF	Xylan	0.185±0.006	-1.57±0.33	0.89	1.48	3.0

Uncertainties are expressed as ± standard deviation

Hem.: Hemicelluloses ; NDF: Neutral detergent fiber ; RMSE: Root mean square error ; RPD: Ration of the RMSE of prediction to the standard deviation of the dependent variable ; VS: Van Soest method

4. Conclusions

Analyses of a wide set of commelinid (306 samples) and of non-commelinid (108 samples) magnoliophyta biomasses by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods indicate that there are good linear correlations between both methods for the sum of cellulose+hemicelluloses, and each individual content of cellulose and hemicelluloses. The VS method overestimates these contents, as compared to the NDE-SAH-LC-CAD method, except in the case of the hemicelluloses content of non-commelinid magnoliophyta biomasses which is underestimated. The presence of some other structural non-(hemi-)cellulosic compounds in the fiber fractions of the VS method can explain these overestimations and this underestimation. Reliable conversion factors were determined for commelinid and for non-commelinid magnoliophyta biomasses to predict the cellulose+hemicelluloses, cellulose, hemicelluloses and xylan contents to be expected from the NDE-SAH-LC-CAD method, on the basis of analyses by the VS method. These two types of biomasses were separated because of the differences between their cell wall compositions (hemicellulosic components and pectins). The VS method is faster, cheaper and more commonly practiced, as compared to the NDE-SAH-LC-CAD method. Owing to the conversion factors determined in the present study, the VS method can be used to predict the results to be expected from the NDE-SAH-LC-CAD method. Nevertheless, the advantage of the chromatographic NDE-SAH-LC-CAD method is that it also provides the composition of the hemicelluloses (xylan, arabinan,

hemicellulosic glucan, galactan and mannan). The VS method can then be very useful in the sector of biofuels (such as bioethanol and biobutanol) and bio-based chemicals production to rank plant feedstocks samples with a good accuracy according to their cellulose+hemicelluloses, cellulose, hemicelluloses and xylan contents, while the NDE-SAH-LC-CAD method may be required for an optimal valorization of hemicellulosic components.

Acknowledgements

This research was funded by the Walloon Agricultural Research Center (CRA-W) with the support of the Belgian Science Policy. The authors are grateful to A. Bridoux for her technical support.

References

- Ampuero S., 2008.** *Détermination de la teneur en fibres dans les aliments pour animaux*. Posieux, France : ALP Posieux.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall. In: Buchanan B., Gruissem W. & Jones R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists, 52-108.
- Englyst H., Quigley M. & Hudson G., 1994.** Determination of Dietary Fibre as Non-starch Polysaccharides With Gas-Liquid Chromatographic, High-performance Liquid Chromatographic or Spectrophotometric Measurement of Constituent Sugars. *Analyst* **119**,1497-1509.
- European Union, 2009.** Commission Regulation No 152/2009. *Official Journal of the European Union* **L54**, 1-130.
- Godin, B., Agneessens, R., Gerin, P. & Delcarte, J., 2011.** Composition of structural carbohydrates in biomass: Precision of a liquid chromatography method using a neutral detergent extraction and a charged aerosol detector. *Talanta* **85**, 2014-2026.
- Ishii T., 1997.** Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* **127**, 111-127.

- Jung H.-J. & Lamb J., 2004.** Prediction of cell wall polysaccharide and lignin concentrations of alfalfa stems from detergent fiber analysis. *Biomass and Bioenergy* **27**, 365-373.
- Jung H.-J., 1997.** Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. *The J. of Nutr.* **127**, 810S-813S.
- Morrison I., 1980.** Hemicellulosic Contamination of Acid Detergent Residues and Their Replacement by Cellulose Residues in Cell Wall Analysis. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 639-645.
- Pauly M. & Keegstra K., 2008.** Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal* **54**, 559-568.
- Sluiter J., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter A. & Templeton D., 2010.** Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043-9053.
- Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D. & Crocker D., 2008.** *Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.* Golden, Colorado, USA: National Renewable Energy Laboratory.
- Tamaki Y. & Mazza G., 2011.** Rapid Determination of Lignin Content of Straw Using Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 504-512.
- Theander O., Aman P., Westerlund E., Andersson R. & Pettersson D., 1995.** Total Dietary Fiber Determined as Neutral Sugar Residues Uronic Acid Residues, and Klason Lignin (The Uppsala Method): Collaborative Study. *J. of AOAC International* **78**, 1030-1044.
- Theander O. & Westerlund E., 1993.** Quantitative analysis of cell wall components. In: Jung H., Buxton D., Hatfield R. & Ralph J., eds. *Forage cell wall structure and digestibility.* Madison, USA: American Society of Agronomy, 83-104.
- Van Soest P., 1973.** Collaborative Study of Acid-Detergent Fiber and Lignin. *J. of the AOAC* **56**, 781-784.
- Van Soest P. & Wine R., 1967.** Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell Wall Constituents. *J. of the AOAC* **50**, 50-55.
- Vogel J., 2008.** Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 301-307.

Wolfrum E., Lorenz A. & de Leon N., 2009. Correlating detergent fiber analysis and dietary fiber analysis data for corn stover collected by NIRS. *Cellulose* **16**, 577-585.

Appendix

Table A1. Data set statistics of the structural carbohydrates contents in commelinid biomasses determined by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods, expressed as relative content of the NDF or ADF residue (n=306)

Compound	Mean (g/100 g DM)	RSD (%)	Minimum (g/100 g DM)	Maximum (g/100 g DM)
<i>Relative content in the NDF residue</i>				
Cellulose	92.2	3	85.0	96.6
+Hemicelluloses VS				
Cellulose	82.3	4	74.4	94.1
+Hemicelluloses SAH				
Cellulose VS	52.6	7	44.2	61.8
Cellulose SAH	45.8	8	35.4	56.9
Hemicelluloses VS	39.6	15	23.7	49.4
Hemicelluloses SAH	36.5	11	26.9	47.2
Xylan	26.5	9	19.1	32.0
Arabinan	4.43	28	2.12	7.93
Hemicellulosic glucan	3.33	35	0.97	6.87
Galactan	1.48	48	0.28	3.64
Mannan	0.87	28	0.19	1.39
<i>Relative content in the ADF residue</i>				
Cellulose VS	87.3	4	80.1	93.9
Cellulose SAH	76.0	6	65.4	89.5

ADF: Acid detergent fiber ; DM: Dry matter ; NDF: Neutral detergent fiber RSD: Relative standard deviation ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ; VS: Van Soest

Table A2. Data set statistics of the structural carbohydrates contents in non-commelinid magnoliophyta biomasses determined by the VS and the NDE-SAH-LC-CAD methods, expressed as relative content of the NDF or ADF residue (n=108)

Compound	Mean (g/100 g DM)	RSD (%)	Minimum (g/100 g DM)	Maximum (g/100 g DM)
<i>Relative content in the NDF residue</i>				
Cellulose	85.5	5	63.3	96.9
+Hemicelluloses VS				
Cellulose	73.5	10	44.7	87.0
+Hemicelluloses SAH				
Cellulose VS	65.3	9	43.3	76.4
Cellulose SAH	48.9	14	29.7	62.0
Hemicelluloses VS	20.3	23	9.2	38.8
Hemicelluloses SAH	24.6	13	12.7	32.8
Xylan	13.9	31	3.2	23.7
Arabinan	1.60	86	0.28	8.94
Hemicellulosic glucan	2.56	35	1.11	7.45
Galactan	3.99	32	1.42	8.91
Mannan	2.50	29	1.05	3.95
<i>Relative content in the ADF residue</i>				
Cellulose VS	81.8	7	54.2	95.0
Cellulose SAH	61.3	12	38.2	75.5

ADF: Acid detergent fiber ; DM: Dry matter ; NDF: Neutral detergent fiber RSD: Relative standard deviation ; SAH: NDE-SAH-LC-CAD method ; VS: Van Soest

Partie 3

Chapitre 7

Composition chimique et potentiel énergétique de biomasses végétales cultivées dans diverses conditions

Adapté de la publication :

Godin B., Lamaudière S., Agneessens R., , Schmit T., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. & Delcarte J., 2013. Chemical composition and biofuels potentials of various vegetal biomasses grown under a wide diversity of conditions. *Industrial Crops and Products*, Soumis.

Il nous paraît particulièrement important d'approfondir l'étude de la composition chimique des espèces végétales fibreuses et leurs aptitudes aux conversions énergétiques car leur intérêt en tant que source d'énergie est manifeste et grandissant (ENERBIOM, 2012). Le choix des biomasses fibreuses étudiées est expliqué à la Partie 1 - Chapitre 1.

Nous avons évalué la variabilité, à un état physiologique donné, de la composition chimique et des aptitudes aux conversions énergétiques de plusieurs biomasses fibreuses. Pour ce faire, ces biomasses ont été produites selon différentes modalités de culture (sites, années, variétés et niveaux de fertilisation azotée). Nous avons montré que, pour un même état physiologique, les propriétés chimiques de chaque biomasse fibreuse sont relativement constantes, malgré la diversité de modalités de cultures appliquées. De ce fait, pour chacune de ces biomasses fibreuses récoltées à un même degré de maturation, les procédés de valorisation ne nécessiteront que très peu d'optimisation liée à la variabilité de ses propriétés chimiques.

Keywords. Vegetal biomasses, Carbohydrates, Hemicelluloses, Analysis, Biofuel

1. Introduction

The development of the production of vegetal biomasses and of their use as energy source is currently encouraged in the European Union in the context of the European Directive 2003/30/CE (EU, 2003). The aim of this directive is to produce renewable and sustainable energy allowing the reduction of the greenhouse gas production and the fossil fuel dependence of the European Union. Whole vegetal biomasses are expected to be converted into biofuel (e.g. solid biofuel for combustion, bioethanol or biogas) in the future (Bessou et al., 2011). Sustainability of these biomass-based biofuel productions requires (McKendry, 2002):

- High dry biomass yield per hectare ;
- High biomass availability ;
- Low input requirements (fertilizers, pesticides, energy) ;
- Low environmental impacts on biodiversity, soil and water quality ;
- Low greenhouse gas production ;
- Low cost.

Two types of crops are investigated within this context (Cadoux et al., 2010 ; Godin et al., 2010):

- Perennial crops such as miscanthus (*Miscanthus* sp.), switchgrass (*Panicum virgatum* L.), meadows that can be grown on marginal lands. The growth of meadows harvested several times per year has a higher input requirement than miscanthus and switchgrass. Indeed, miscanthus and switchgrass are harvested at the end of the winter with a high dry matter but low mineral content, as compared to meadows harvested several times per year.
- Annual crops such as fiber sorghum, fiber corn, cereal straw and hemp. They need higher inputs, better soils and to be reseeded each year, but they don't block a field for several years.

Vegetal biomasses such as forage crops, agricultural residues and wood are mostly made of two types of structural polysaccharides: cellulose and hemicelluloses. Cellulose is a linear polysaccharide homogeneously made of D-

glucose units and represents 25-40 % of the vegetal biomass dry matter (DM) (Carpita et al., 2000). Hemicelluloses are ramified heterogeneous polysaccharides mainly made of linked D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose and D-glucose units and represent 10-30 % of the vegetal biomass DM (Carpita et al., 2000). The monosaccharidic content of hemicelluloses depends on the plant species (Carpita et al., 2000). The hemicelluloses of commelinid monocotyledon biomasses have higher contents of xylan and arabinan, associated as arabinoxylan, and β -glucan (Carpita et al., 2000). The hemicelluloses of non-commelinid dicotyledon biomasses have higher contents of hemicellulosic glucan, in the form of xyloglucan, and mannan (Carpita et al., 2000). Vegetal biomasses are also made of lignin (phenyl propanoid polymer composed of syringyl, guaiacyl and p-hydroxyphenyl units), pectins (ramified heterogeneous structural polysaccharide mainly composed of D-galacturonic acid units), starch, soluble sugars (D-glucose, D-fructose, sucrose and fructans), proteins and mineral compounds (Carpita et al., 2000). All these components (except mineral compounds) represent the largest pool in nature of organic carbon coming from the photosynthetically collected and stored solar energy (Chandel et al., 2010). They represent therefore a huge amount of renewable resource for a sustainable bio-based economy. However, the optimal valorization of biomass to bioproducts and biofuel requires a good knowledge of their molecular composition, in quantity and quality (McKendry, 2002 ; Kamm et al., 2004).

Vegetal biomasses can be converted to solid (e.g. pellets), liquid (e.g. bioethanol) or gaseous (e.g. biogas) biofuel (Ghysel et al., 2010 ; Bessou et al., 2011). There are two main conversion routes for the production of these biofuel (Bessou et al., 2011): biological conversions (e.g. methanogenic and ethanolic fermentations) and thermochemical conversions (e.g. combustion, gasification and pyrolysis). There are 3 types of energy vectors that can be produced from the ultimate conversion of the biofuel (Bessou et al., 2011): thermal, electricity and mechanical energy. We decided to rapidly compare the energy value of biomasses by comparing i) their higher heating values (HHV), for combustion (McKendry, 2002), ii) their bioethanol potentials as calculated by the methodology of Spatari et al. (2010), iii) their enzymatically digestible organic matter (DOM) by the methodology of De Boever et al. (1986), as an assessment of the anaerobic digestibility potential (biomethanation) without any pretreatment.

The objective of the study reported here is to assess, on large sample sets, the mean chemical composition of various vegetal biomasses. This composition includes cellulose, hemicelluloses, lignin, total soluble sugars, starch, proteins and mineral compounds, but also the absolute and relative monosaccharidic contents of hemicelluloses (xylan, arabinan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan). Variability of the biomass composition was also investigated. The enzymatically DOM, the total bioethanol potential and the HHV of the various biomasses were also determined. The analyzed biomass were miscanthus giganteus, switchgrass, spelt straw, fiber sorghum, “cocksfoot-alfalfa” mixture, tall fescue, immature rye, fiber corn, hemp and jerusalem artichoke crops coming from different trials performed under different conditions (year, area, cultivar, nitrogen fertilization level) and harvest periods (autumn and late winter). The goal of this paper is also to investigate the correlations between the biomass chemical components and properties.

2. Material and methods

2.1. Biomass material

Miscanthus giganteus (*Miscanthus x giganteus* J.M. Greef & Deuter ex Hodk. & Renvoize ; cultivars: Bical and Tournai ; Late winter and early autumn harvest), switchgrass (*Panicum virgatum* L. ; cultivars: Alamo, Blackwell, Cave-in-Rock, Dacotah, Kanlow, Nebraska 28, Shelter and Traiblazer ; Late winter and early autumn harvest), fiber sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench ; cultivars: CA25, ENR10, H133, Maja and Zerberus ; Late winter and early autumn harvest), spelt straw (*Triticum aestivum* L. ssp. *spelta* (L.) Thell. ; cultivars: Badengold and Cosmos ; Late summer harvest), “cocksfoot-alfalfa” mixture (*Dactylis glomerata* L. cultivar Terrano - *Medicago sativa* L. cultivar Europe ; 3 harvest cycles late spring-late summer-late autumn), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. ; cultivars: Hykor, Jordane, Kora, Perun and Soni ; 3 harvest cycles late spring-late summer-late autumn), immature rye (*Secale cereale* L. ; cultivars: Protector and Vitalio ; Early spring harvest), fiber corn (*Zea mays* L. ; cultivars: Aayrton, Atlético, Aventura, Beethoven, Cannavaro, Coryphée, Dominator, Franky, Ladifférence, LG Azelo,

Olympus, Ricardinio and Ronaldinio ; Late winter and early autumn harvest), hemp (*Cannabis sativa* L. ; cultivars: Epsilon 68, Fedora 17 and Futura 75 ; Early autumn harvest) and jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. ; cultivar: Volkenroder spindel ; leaf & stalk ; Early autumn harvest) came from randomized blocks designed crop trials performed in 2007, 2008, 2009 and/or 2010 at Libramont (498 m above sea level (asl) ; average annual temperature: 8.6°C ; average annual precipitation: 1260 mm ; 49°55'N, 05°24'E ; Belgium), Gembloux (161 m asl ; average annual temperature: 9.8°C ; average annual precipitation: 856 mm ; 50°33'N, 04°43'E), Tinlot (255 m asl ; average annual temperature: 9.7°C ; average annual precipitation: 871 mm ; 50°28'N, 05°23'E ; Belgium), Mötsch (330 m asl ; average annual temperature: 8.4°C ; average annual precipitation: 675 mm ; 49°57'N, 06°33'E ; Germany) or Gerbéviller (260 m asl ; average annual temperature: 9.9°C ; average annual precipitation: 1022 mm ; 48°29'N, 06°31'E ; France). Depending on the crop, trials were performed with different nitrogen fertilization levels, different cultivars and/or different harvest periods (early autumn or late winter). Nine hundred ninety seven biomass samples were analyzed. For each biomass sample, a plot between 9 and 24 m² of the whole above ground biomass was harvested and chopped at 10 cm from the ground with a Haldrup M-65 harvester.

Immediately after the harvest, two representative subsamples of 750 g of the whole of each biomass were directly dried at 60°C for 72 h in a Memmert UFP800 oven (VWR, Heverlee, Belgium). After drying, the two subsamples were first milled with a 4 mm screen hammer mill (BOA, Waterleau, Herent, Belgium) followed by a second milling step with a 1 mm screen cyclone mill (Cyclotec, FOSS Benelux N.V., Bruxelles, Belgium). The samples were stored in airtight bags at room temperature and protected from light in a dark box.

2.2. Chemical analyses

All chemicals were of analytical grade or equivalent and were purchased from VWR (Heverlee, Belgium) and Chem-Lab (Zeldelgem, Belgium). Duplicate aliquots were measured and results expressed in kg per kg of DM (103°C dried matter).

The neutral detergent fiber residue (NDF: weight of the neutral detergent fiber residue) was determined by the Van Soest (VS) gravimetric method (Van Soest et al., 1967) except that 1000 U/g_{DM_sample} of an analytical thermostable α -amylase (Megazyme, Ireland) was added before the neutral detergent step for biomasses containing starch. The acid detergent fiber residue (ADF: weight of the acid detergent fiber residue) and the acid detergent lignin (ADL: weight of the acid detergent lignin residue, which is considered as the lignin content) were determined by the VS gravimetric method (Van Soest et al., 1973) except that, prior to the ADF extraction, an extraction with the neutral detergent without adding sodium sulfite was carried out, as it is done for the NDF. The VS cellulose content was calculated as ADF-ADL. The VS hemicelluloses content was calculated as NDF-ADF (Van Soest et al., 1967 ; Van Soest et al., 1973). The total soluble sugars were determined by the Luff-Schoorl method (European Union, 2009). The starch content was determined by the Ewers method (European Union, 2009). The protein content was determined by the Kjeldahl method using 6.25 as conversion factor of nitrogen to protein (AOAC, 1990). The mineral content was determined by use of a muffle furnace set at 550°C for 3h. The dry matter (DM) content was determined at 103°C for 4h.

The monosaccharides xylan, arabinan, mannan, galactan and the total glucan present in the structural polysaccharides were determined on a subset of 255 samples by a sulfuric acid hydrolysis method (SAH) after fractionation (Godin et al., 2011). The hemicellulosic glucan content was determined by the SAH method on the same subset of samples except that the cellulose solubilization step (incubation with H₂SO₄ 72% w/w for 1 h at 30°C) was skipped. The cellulosic glucan content was calculated as the difference between the total glucan and the hemicellulosic glucan content. The Van Soest method is known to overestimates the cellulose and the hemicelluloses content as compared to the SAH method (Lorenz 2009; Wolfrum et al., 2009; Godin et al., 2011).

To correct for this bias, the SAH cellulose and the SAH hemicelluloses content of the 999 samples analyzed by the VS method were determined by the relationship between the concentrations of the components determined by the VS and SAH method as based on the dataset developed in our laboratory:

- Cellulose_SAH = (0.844 x Cellulose_VS) + 0.008 for commelinid monocotyledons biomasses
(n=306, R²=0.97, RMSE=0.014, RPD=5.9) (Eq. 1) ;
- Cellulose_SAH = (0.803 x Cellulose_VS) - 0.014 for non-commelinid dicotyledons biomasses
(n=108, R²=0.98, RMSE=0.021, RPD=6.4) (Eq. 2) ;
- Hemicelluloses_SAH = (0.856 x Hemicelluloses_VS) + 0.018 for commelinid monocotyledons biomasses (n=306, R²=0.85, RMSE=0.018, RPD=2.6) (Eq. 3) ;
- Hemicelluloses_SAH = (1.381 x Hemicelluloses_VS) - 0.008 for non-commelinid dicotyledons biomasses (N=108, R²=0.88, RMSE=0.020, RPD=2.9) (Eq. 4).

The predictions made by a linear regression are considered as reliable when the linear regression has a R²≥0.81 and a RPD≥2.5 (Tamaki et al., 2011).

Cellulose_SAH and hemicelluloses_SAH are mentioned below as cellulose and hemicelluloses, respectively.

2.3. Biofuel potentials

The enzymatically DOM of the biomass, as determined by the De Boever method (De Boever et al., 1986), was used to compare the suitability of the different biomasses to be converted by anaerobic digestion without any pretreatment. We can consider that the enzymatically DOM corresponds to the minimum level of anaerobic digestion without any pretreatment of the biomass because this biological conversion digest at least as much as the enzymes used in the method used to quantify the enzymatically DOM. Briefly, biomass samples were incubated, in chronologic order, with pepsin in 0.1 N HCl for 24 h at 40°C, with 0.1 N HCl for 45 min at 80°C and with cellulase in an acetate buffer at pH 4.8 for 24 h at 40°C. The bioethanol potential was assessed by following the methodology of (Spatari et al., 2010), on the basis of i) the monomers expected from the hydrolysis yields of

cellulose, hemicelluloses (hydrolysis yields of respectively 91% and 81% with a liquid hot water pretreatment (da Costa Sousa et al., 2009)) and starch (hydrolysis yield of 96% (Buchholz et al., 2008)); ii) the stoichiometric ethanol fermentation yields of monosaccharides (92.5% for glucose and fructose, and 86% for xylose, arabinose, galactose and mannose (Hamelinck et al., 2005)) and iii) the ethanol recovery yield (99.5% (Spatari et al., 2010)). The mean relative monosaccharidic content of the hemicelluloses, as presented in Figure 2 top, was used for calculation. The bioethanol potential was calculated as the ethanol that can be expected from fermentation of the directly available soluble sugars and starch, and also from cellulose and hemicelluloses after biomass hydrolysis. The thermal energy was assessed on the basis of the higher heating value (HHV). The HHV was determined by the method using a Parr controlled oxygen bomb calorimeter (European Committee for Standardization, 2005).

2.4. Crop yields

The total harvestable biomass components and expected biofuel yields per hectare and per year were determined by multiplying our data with the crop DM yield per hectare and per year (Table 1, crop trials made in the area of Gembloux, Belgium; T. Schmit personal communication, unpublished data). The dry matter contents of the harvested biomasses are also shown in Table 1.

Table 1. Crop yield (as dry matter) and dry matter content (with its standard deviation) of the investigated biomasses

Biomass	Crop DM yield (Mg/(hectare x year))	Dry matter content (kg/kg WM)
Miscanthus giganteus late winter	12.5	0.789±0.076
Miscanthus giganteus autumn	20.0	0.420±0.043
Switchgrass late winter	6.0	0.839±0.063
Switchgrass autumn	9.0	0.575±0.124
Spelt straw	8.0	0.792±0.094
Fiber sorghum late winter	7.5	0.396±0.081
Fiber sorghum autumn	15.0	0.257±0.047
“Cocksfoot-alfalfa” mixture (3 harvest cycles)	12.0	0.246±0.023
Tall fescue (3 harvest cycles)	12.0	0.253±0.043
Immature rye	3.0	0.214±0.017
Fiber corn late winter	8.0	0.656±0.060
Fiber corn autumn	20.0	0.335±0.032
Hemp	14.0	0.391±0.064
Jerusalem artichoke	11.0	0.292±0.061

DM: Dry matter ; WM: Wet matter

2.5. Statistical analysis

The Tukey-Kramer multiple mean comparison test (with $\alpha = 0.05$) based on the ANOVA analysis of these means and the correlation analysis were performed using JMP 7.0.1 (SAS Institute, USA). The starch content was not included because only few biomasses contained starch.

3. Results and discussion

3.1. Biomass chemical composition

The chemical composition of the analyzed biomasses is shown in Figure 1 top, together with its variability (details shown in Table A1 of the appendix). Ranking of these biomasses by using a Tukey-Kramer multiple mean comparison test performed for the content of each main chemical component is presented in Table A1 of the appendix. Cellulose and hemicelluloses are generally the main chemical components of the DM, except for fiber corn because of its high starch content, and for immature rye and jerusalem artichoke because of their high total

soluble sugars contents. The highest lignin and structural carbohydrate contents are offered by late winter miscanthus. The total soluble sugars correspond to the sum of the soluble monosaccharides, sucrose and fructans. The highest total soluble sugars, proteins and mineral compounds content are, respectively, observed in immature rye, “cocksfoot-alfalfa” mixture and tall fescue. Preliminary analyses have shown the absence of starch in all biomasses (data not shown) except fiber corn. Therefore, the starch content has only been determined in the later. Based on the main chemical components, 2 distinctive types of vegetal biomass profiles can be observed in Figure 1 top and by the ranking of these biomasses by using a Tukey-Kramer multiple mean comparison test (Table A1 of the appendix):

- Miscanthus, switchgrass, fiber sorghum late winter and spelt straw which have a higher cellulose, hemicelluloses and lignin content, and have a lower non-structural carbohydrates, proteins and mineral compounds content ;
- Tall fescue, “cocksfoot-alfalfa” mixture, immature rye, fiber sorghum autumn, fiber corn, hemp and jerusalem artichoke which have a lower cellulose and hemicelluloses content, and have a higher non-structural carbohydrates, proteins and mineral compounds content.

The cleavage between these two groups can be explained by the fact that:

- The biomasses with higher contents of structural components are mainly made of stems with more lignified cell walls (rich in secondary cell walls) that have higher contents of these components to stand up ;
- The biomasses with higher contents of non-structural components are mainly made of leaves with much less lignified cell walls and metabolically more active cells.

Figure 1 shows a 0.12-0.25 kg/kg_{DM} non-identified fraction in all biomasses. Soluble polysaccharides (such as pectins), acid soluble lignin, organic acids, alcohols, pigments and lipids compose most probably this fraction, as suggested by Hames (2009) for other biomasses. Hemp and jerusalem artichoke have a higher non-identified fraction compared to the other biomasses. This can be explained by their botanical differences. Hemp and jerusalem artichoke are non-commelinid dicotyledons which have a higher pectin and lower hemicelluloses content as compared to the other biomasses that are commelinid monocotyledons. The latter

are known to have a lower pectin content and a higher hemicelluloses content (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2011).

Biomasses harvested in late winter had higher contents of structural components (cellulose, hemicelluloses and lignin) and lower contents non-structural components (total soluble sugars, proteins and mineral compounds) compared to the corresponding biomasses harvested in autumn (Figure 1 top). This can be explained by the nutrient translocation to the rhizomes, the solubilization and the leaching of the non-structural components during the winter (Cadoux et al., 2009).

The chemical composition of each analyzed biomass is generally relatively stable independently of crop conditions (small standard deviations in Figure 1 top and Table A1 of the appendix). This quite reproducible chemical composition for each type of biomass can be explained by the fact that they have been harvest at the same harvest period. The most variable chemical components are the non-structural carbohydrates (total soluble sugars and starch), and the cellulose content of both hemp and jerusalem artichoke (Figure 1 top). For the non-structural carbohydrates, this could be explained by the variability of plant metabolism linked to photosynthesis. For the cellulose content variability of hemp and jerusalem artichoke, this could be explained by their phylogenetic origins.

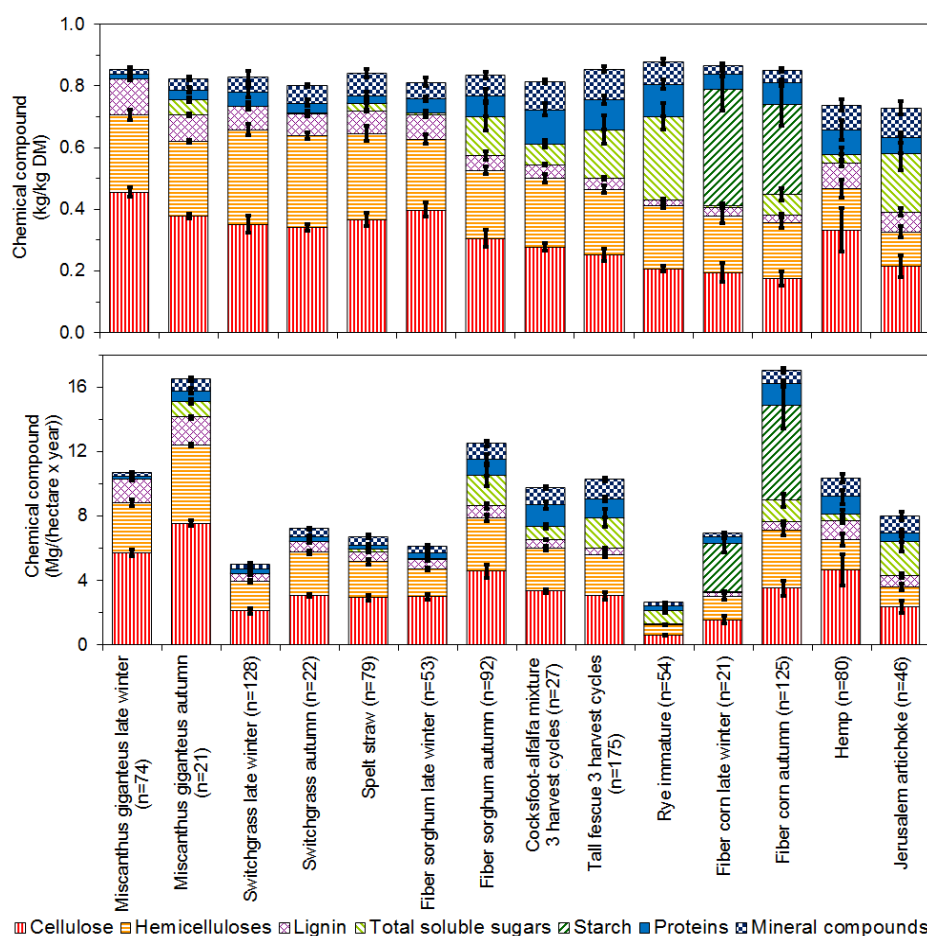


Figure 1. Main chemical composition (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses. Error bars correspond to standard deviation, n to number of analyzed samples.

The significant correlations between the main chemical components are highlighted in Table 2. The correlations between structural components and between non-structural components are all significantly positive. The correlations between structural components and non-structural components are all significantly negative. This can be explained by the distinction underlined above between biomasses mainly made of stems and biomasses mainly made of leaves (Carpita et al., 2000).

Table 2. Correlations between the contents of the biomass main chemical components (n=999)

	Cel.	Hem.	Lignin	Total soluble sugars	Proteins	Mineral compounds
Cel.	/					
Hem.	0.50***	/				
Lignin	0.89***	0.29***	/			
Total soluble sugars	-0.59***	-0.40***	-0.64***	/		
Proteins	-0.62***	-0.38***	-0.66***	0.53***	/	
Mineral compounds	-0.31***	-0.25***	-0.35***	0.45***	0.61***	/

*** p<0.001

Cel.: Cellulose ; Hem.: Hemicelluloses

The biomass chemical components produced per hectare and year are summarized in Figure 1 bottom. These results are mainly influenced by the crop DM yield. Biomasses harvested in late winter, while presenting higher contents of structural components (cellulose, hemicelluloses and lignin) as discussed above (Figure 1 top), have actually lower yields of harvested biomass (Figure 1). The decrease of biomass yields can be explained by the loss of leaf biomass during the winter (Cadoux et al., 2009). For perennial crops, this decrease in yield can also be explained by the nutrient translocation from the stems and/or leaves to the rhizomes (Cadoux et al., 2009).

An issue for an autumn harvest of miscanthus and switchgrass is that such a harvest disables the crop to translocate its nutrients to its rhizomes (Cadoux et al., 2009). Therefore, to have the same crop yield the following year, it will need a higher fertilization level compared to the same crop harvested in the winter (Cadoux et al., 2009). An increased use of fertilizer will lead to an increase of the amount of greenhouse gas emission due to its out spread and its manufacture (Cadoux et al., 2009).

3.2. Monosaccharidic composition of hemicelluloses

The absolute and relative contents of hemicellulosic components of the analyzed biomasses are shown with their variabilities in Figure 2 top and bottom, respectively. The absolute contents of hemicellulosic components are also shown in Table A2 of the appendix, with ranking by using a Tukey-Kramer multiple mean comparison test. Xylan is the major absolute and relative hemicellulosic component. The highest absolute hemicelluloses and xylan contents are found in switchgrass, while the highest relative xylan contents is offered by late winter miscanthus. Based on the hemicellulosic components, 2 distinctive types of vegetal biomass profiles can be observed in Figure 2 top and by the ranking of these biomasses by using a Tukey-Kramer multiple mean comparison test (Table A2 of the appendix):

- Miscanthus, switchgrass, fiber sorghum, fiber corn, spelt straw, “cocksfoot-alfalfa” mixture, tall fescue and immature rye, where the major relative hemicellulosic components are, by order of decreasing importance, xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan. All these biomasses are commelinid monocotyledons (“cocksfoot-alfalfa” mixture is considered as a commelinid monocotyledon because of the dominance of cocksfoot). Such biomasses are known to have hemicelluloses with higher content of arabinoxylan and β -glucan, as compared to non-commelinid dicotyledons (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2011) ;
- Hemp and jerusalem artichoke, where the major relative hemicellulosic components are, by order of decreasing importance, xylan, hemicellulosic glucan, galactan, mannan and arabinan. These biomasses are non-commelinid dicotyledons. Such biomasses are known to have hemicelluloses with higher contents of xyloglucan and mannan, as compared to commelinid monocotyledons (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2011).

The lower content of arabinan of the analyzed non-commelinid dicotyledons biomasses compared to the analyzed commelinid monocotyledons biomasses confirms that the arabinoxylan of commelinid monocotyledons are more substituted with arabinan, which is known to be highly linked to lignin by ferulate residues (Carpita et al., 2000).

The absolute and relative contents of hemicellulosic components showed a low variability within each type of biomass (Figure 2). These quite reproducible hemicellulosic contents for each type of biomass can be explained by the fact that they have been harvest at the same harvest period.

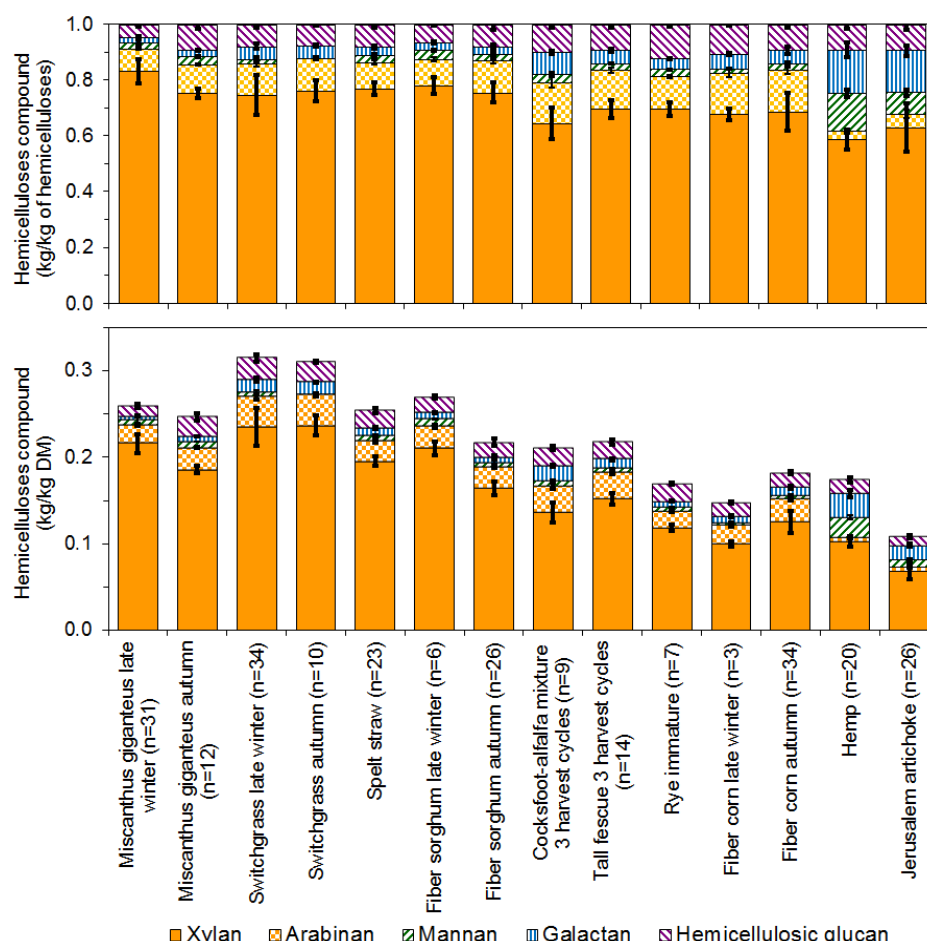


Figure 2. Relative (top) and absolute (bottom) monosaccharidic compositions of hemicelluloses of the different investigated biomasses. Error bars correspond to standard deviation, n to number of analyzed samples.

The correlations between the relative monosaccharidic components of hemicelluloses are highlighted in Table 3. The correlation analysis of the hemicellulosic components was done separately on commelinid monocotyledons and non-commelinid dicotyledons biomasses because of their distinctive hemicelluloses profile, as above mentioned. Hemicelluloses are made of four types

of structural polysaccharides: arabinoxylan, xyloglucan (which also contains galactan), β -glucan and mannan (which also contains galactan and hemicellulosic glucan) (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008). The high correlation between the relative content of xylan and arabinan in commelinid monocotyledon biomasses (Table 3) can be explained by the fact that less lignified cell walls (with lower contents of structural components ; poor in secondary cell walls) are known to have arabinoxylan with a higher degree of substitution by arabinan and higher contents of xyloglucan, β -glucan and mannan compared to more lignified cell walls which have a higher content of arabinoxylan with a lower degree of substitution by arabinan (Ishii, 1997 ; Carpita et al., 2000 ; Vogel, 2008). This can also explain the high negative correlation between the relative content of xylan and galactan (Table 3), and the high positive correlation between xylan and hemicellulosic glucan in commelinid monocotyledon biomasses (Table 3).

Table 3. Correlations between the relative monosaccharidic components of hemicelluloses of the investigated commelinid monocotyledon (n=209) and non-commelinid dicotyledon (n=46) biomasses

	Xylan	Arabinan	Mannan	Galactan	Hemicellulosic glucan
<i>Commelinid monocotyledons</i>					
Xylan	/				
Arabinan	-0.90***	/			
Mannan	-0.20**	0.02	/		
Galactan	-0.83***	0.76***	-0.04	/	
Hemicellulosic glucan	-0.84***	0.63***	0.07	0.55***	/
<i>Non-commelinid dicotyledons</i>					
Xylan	/				
Arabinan	0.21	/			
Mannan	-0.72***	-0.67***	/		
Galactan	-0.54***	0.10	0.04	/	
Hemicellulosic glucan	-0.08	-0.30*	0.03	-0.38**	/

* $p < 0.050$; ** $p < 0.010$; *** $p < 0.001$

3.3. Biomass characteristics as guide in the selection of transformation technology

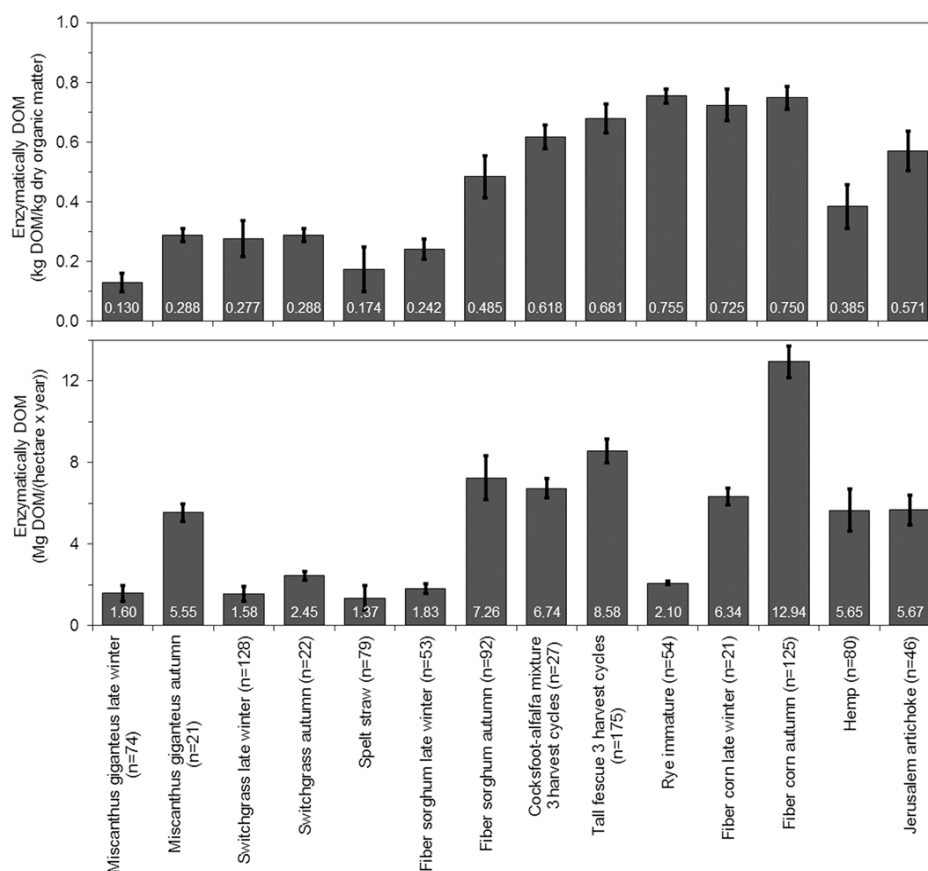
Enzymatically digestible organic matter

The interest of the analyzed biomasses for conversion by anaerobic digestion (biomethanation) was assessed by their contents in enzymatically digestible organic matter (DOM) (Figure 3) without any pretreatment. Details of Figure 3 and a ranking of the biomasses after a Tukey-Kramer multiple mean comparison test performed for their respective enzymatically DOM are presented in Table A3 of the appendix. For the purpose of our study, this method was considered much faster than determining the real biomethane potential, while the results can be correlated with anaerobic digestibility (De Boever et al., 1986; Lesteur et al., 2011). The biomasses with the highest enzymatically DOM per kg of the dry organic matter are fiber corn and immature rye (Figure 3 top). This can be explained by their high contents of total soluble sugars, starch and/or proteins, which are a part of the enzymatically DOM (De Boever et al., 1986). Crops mainly made of stems, with a high content of (lignified) structural components, have the lowest enzymatically DOM. Crops with an important part of leaves show intermediate enzymatically DOM. Biomasses with high enzymatically DOM have generally a high content of mineral compounds (Figures 1 top and 3 top) because they are made of an important part of leaves which have much less lignified cell walls and cells rich in cytoplasm (containing the mineral salts). This content of mineral compounds brought to the anaerobic digestion is used by the microorganisms to digest the biomass.

Table 4 presents the correlations between the enzymatically DOM and the main chemical components of the biomass. The enzymatic digestibility is significantly positively and negatively correlated to the non-structural components and structural components, respectively. This can be explained by the enzymatic cocktail used to determine the DOM that is more efficient to hydrolyze the non-structural components.

The enzymatically DOM content showed a low variability within each type of biomass, except for spelt straw (Figure 3 top). This low variability can be explained by the low variability observed for the chemical component contents (Figure 1 top).

Figure 3 bottom also presents the enzymatically DOM yields that can be harvested per hectare. The enzymatically DOM yields depend mainly on the biomass DM yield and only to a secondary extent on its digestibility. Biomasses harvested in autumn have a higher enzymatic DOM yield than when harvested in late winter. This can be explained by the higher non-structural content in the autumn harvest.



DOM: Digestible organic matter

Figure 3. Enzymatically DOM (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses. Error bars correspond to standard deviation, n to number of analyzed samples.

Bioethanol

Figure 4 presents the calculated bioethanol production that can be expected from the conversion of the different carbohydrate components of the biomass, i.e. soluble carbohydrates and starch/fructanes that can be readily fermented with current technologies, and bioethanol from cellulose and hemicelluloses which need a pretreatment to be fermented. Details of Figure 4 and a biomass ranking after a Tukey-Kramer multiple mean comparison test performed for their respective bioethanol potential are presented in Table A3 of the appendix. The biomasses with highest total bioethanol potential per kg of DM are fiber corn and miscanthus. Late winter miscanthus has the highest ethanol potential based on structural carbohydrates, while fiber corn has the highest ethanol potential based on non-structural carbohydrates. Structural polysaccharides are the main source of potential ethanol for most substrates, excepted fiber corn, immature rye and jerusalem artichoke, where non-structural carbohydrates bring a significant contribution.

There are highly significant positive and negative correlations between the structural components and, respectively, the bioethanol coming from structural carbohydrates and from non-structural carbohydrates (Table 4), as a direct consequence of the negative correlations of the later discussed in Table 2.

The range of the total bioethanol potential observed for each type of biomass is generally relatively narrow (Figure 4 top). This low variability can be explained by the low variability observed for the carbohydrate contents (Figure 1 top). The largest variability is observed for biomasses with the highest content of reserve and soluble carbohydrates, in line with the higher variability of the latter with plant metabolism (Figure 1 top).

Figure 4 bottom presents the total ethanol production potential that can be expected per hectare. These results are mainly influenced by the crop DM yield (Table 1). As compared to the autumn harvest, crops harvested in late winter, while presenting higher content of total bioethanol potential per dry mass (Figure 4 top), show reduced production per hectare due to the loss of harvestable dry matter during winter.

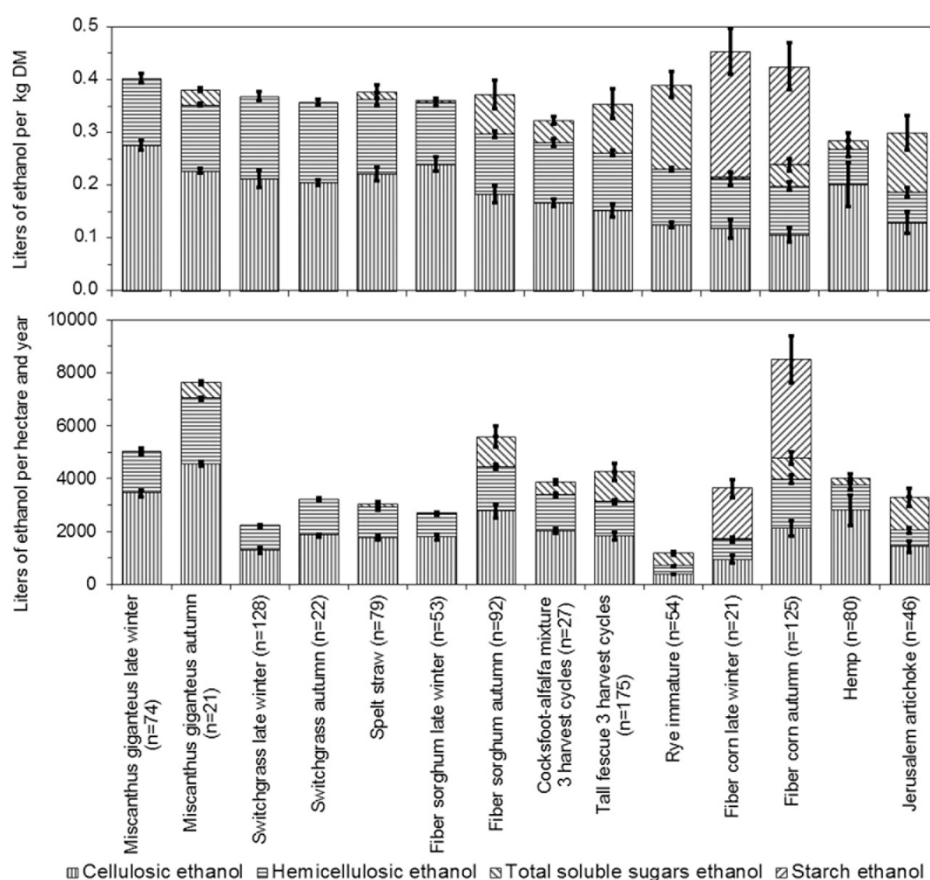


Figure 4. Potential bioethanol (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses. Error bars correspond to standard deviation, n to number of analyzed samples.

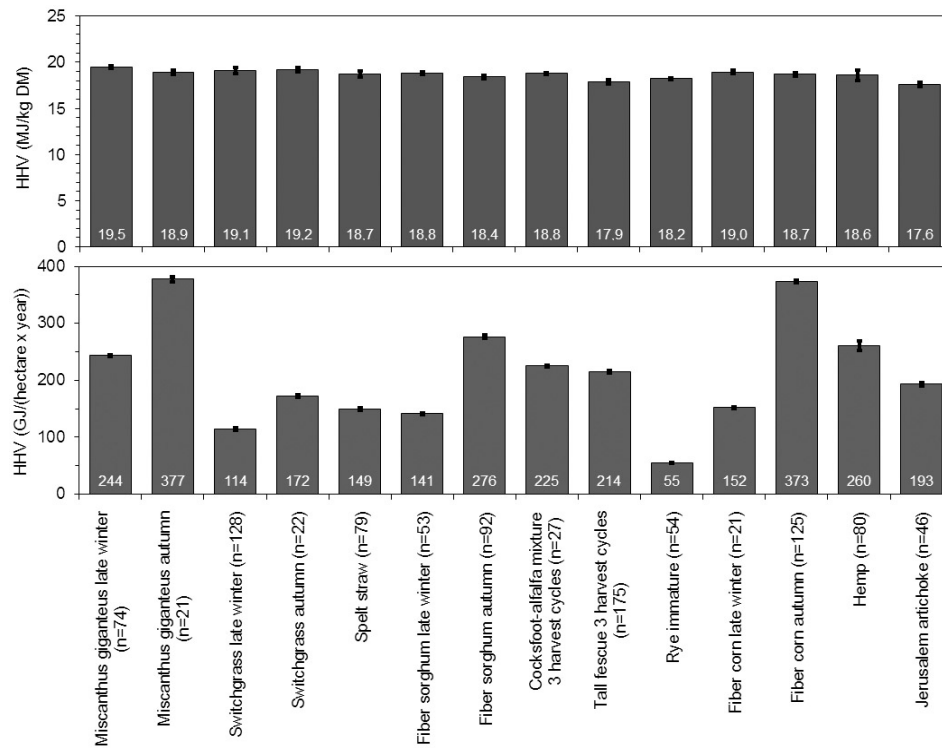
Thermal energy

The potential use of the analyzed biomasses to produce thermal energy by combustion (independently of their humidity that can be adjusted by drying, if required) was assessed by the HHV. Figure 5 presents the HHV measured for the analyzed biomasses, together with its variability. Details of Figure 5 and ranking of the biomasses after a Tukey-Kramer multiple mean comparison test performed for their respective HHV can be found in Table A3 of the appendix. The biomass with the highest HHV per kg of the DM is the late winter harvested miscanthus. The highest significant correlation between the HHV and the main chemical components (Table 4) is the one with the mineral compounds content ($r=-0.76$;

$p < 0.001$). This can be explained by the influence of the total organic matter content (complement of the mineral compounds) on the HHV, the relatively low contents of lignin (HHV 25.10 MJ/kg dry lignin ; Klass, 2004) and of proteins (HHV 24.00 MJ/kg dry protein ; Klass, 2004), and the relatively low differences of HHV between the other individual organic compounds (monosaccharides 15.60 MJ/kg dry monosaccharide ; polysaccharides 17.50 MJ/kg dry polysaccharide ; Klass, 2004). Table 5 shows that HHV is negatively correlated with the enzymatically DOM ($r = -0.58$; $p < 0.001$). This can be explained by the fact that biomasses with high HHV have an organic matter with higher lignin content which is a highly enzymatically indigestible organic matter and has a high HHV. Biomasses with low HHV have an organic matter with lower lignin content but with higher contents of other organic components that are more enzymatically DOM and have a lower HHV.

The range of HHV observed for each analyzed biomass is very narrow (Figure 5 top). This can be explained by the fact that the HHV is related to the organic matter (complement of the mineral compounds content) for which a very narrow range is also observed (Figure 1 top).

Figure 5 bottom present the total thermal energy that can potentially be produced by combustion of the biomass that can be harvested per hectare, considering that the biomass is available in dry state. As for the other potential valorizations, HHV per hectare depends more on the yield of DM per hectare than on biomass composition. As for the other energy potentials, loss of harvestable biomass during the winter has a negative impact on the potential that can be recovered after winter. An efficient conversion of vegetal biomass to thermal energy by combustion requires that the biomass has a high DM content and a low mineral compounds content. Indeed, the water content of biomass induces a loss of energy and the mineral compounds produces clinkers. The winter harvest has a higher DM content and lower mineral compounds content compared to the autumn harvest (Figure 1 top and Table 1). This is the case of the winter harvest and the spelt straw.



DM: Dry matter ; HHV: Higher heating value

Figure 5. Higher heating value (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses of the different investigated biomasses in dry state. Error bars correspond to standard deviation, n to number of analyzed samples.

Table 4. Correlations between enzymatically DOM-bioethanol potential from structural-bioethanol potential from non-structural carbohydrates-higher heating value and the biomass main chemical components (n=999)

	Cel.	Hem.	Lignin	Total soluble sugars	Proteins	Mineral compounds
Enzymatically DOM	-0.94***	-0.55***	-0.91***	0.69***	0.74***	0.36***
Bioethanol potential from structural carbohydrates	0.94***	0.77***	0.77***	-0.59***	-0.62***	-0.34***
Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	-0.87***	-0.52***	-0.79***	0.50***	0.35***	-0.06
Higher heating value	0.55***	0.53***	0.54***	-0.71***	-0.43***	-0.76***

*** p<0.001

Cel.: Cellulose ; DOM: Digestible organic matter ; Hem.: Hemicelluloses

Table 5. Correlations between the enzymatically DOM, bioethanol potential from structural carbohydrates, bioethanol from non-structural carbohydrates and higher heating value (n=999)

	Enzymatically DOM	Bioethanol potential from structural carbohydrates	Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	Higher heating value
Enzymatically DOM	/			
Bioethanol potential from structural carbohydrates	-0.91***	/		
Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	0.84***	-0.85***	/	
Higher heating value	-0.58***	0.63***	-0.37***	/

*** p<0.001

DOM: Digestible organic matter

4. Conclusions

Analyzed biomasses show 2 distinctive patterns: either a high content of structural components with low content of non-structural components, or the opposite. The relative hemicellulosic components profile shows 2 distinctive patterns according to plant groups: i) commelinid monocotyledons with, by order of decreasing importance, xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan ; ii) non-commelinid dicotyledons with, by order of decreasing importance, xylan, hemicellulosic glucan, galactan, mannan and arabinan.

The composition of each type of biomass remained relatively constant despite the diversity of the cropping and harvest conditions (year, area, cultivar, nitrogen fertilization level). Consistently, the measured enzymatically DOM, the calculated bioethanol potential and the measured higher heating values were also quite reproducible for the analyzed biomass. Based on the biomass composition, fiber corn, immature rye and tall fescue appear as the best substrates for anaerobic digestion (low cellulose and lignin contents); late winter harvested miscanthus is the best substrate for combustion (high organic matter and water contents); fiber corn and late winter harvested miscanthus are also the best substrates for bioethanol production (high total carbohydrates content as cellulose, hemicelluloses and starch).

However, when considering also the crop DM yield per hectare, autumn harvested fiber corn appears the best or a very good substrate for anaerobic digestion, bioethanol and combustion, while autumn harvested miscanthus is the best substrate only for combustion.

Acknowledgements

This research was funded by the Walloon Agricultural Research Center (CRA-W) with the support of the Belgian Science Policy and by the ENERBIOM project (ENERBIOM project n°14GR23024 of the European territorial co-operation program in the context of INTERREG IV A « Grande Région » 2007-2013 n°CCI2007CB163PO064, co-financed by the FEDER-EU funds). The authors are

grateful to the technicians of the BIOETHA2 and the ENERBIOM projects for their technical support.

References

- AOAC, 1990.** *Official methods of analysis*. 15th ed. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemist.
- Balat M., Balat H. & Oz C., 2008.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Sci.* **34**, 551-573.
- Bessou C., Ferchaud F., Gabrielle B. & Mary B., 2011.** Biofuels, greenhouse gases and climate change. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **31**, 1-79.
- Buchholz K. & Seibel J., 2008.** Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research* **343**, 1966-1979.
- Cadoux S., Briand S., Chabbert B., Besnard A., Félix I., Savouré M., Marsac S., Preudhomme M., Labalette F. & Boizard H., 2010.** *Biomass productivity of different energy crops under French conditions: Results of the “Regix” Experimental network*. Lyon, France: 18th European Biomass Conference & Exhibition.
- Cadoux S., Preudhomme M., Machet J., Mary B., Fourdinier E., Ferchaud F., Boizard H. & Gosse G., 2009.** *Productivity and environmental impacts of energy crops first results of the long term experiment « biomass & environment »*. Hamburg, Germany: 17th European Biomass Conference & Exhibition.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall, *In*: Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.
- Chandel A., Singh O. & Rao L., 2010.** Biotechnological Applications of Hemicellulosic Derived Sugars: State-of-the-Art, *In*: Singh, O. & Harvey, S., eds. *Sustainable biotechnology: sources of renewable energy*. New York, USA: Springer, pp. 63-81.
- da Costa Sousa L., Chundawat S., Balan V. & Dale, B., 2009.** ‘Cradle-to-grave’ assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **20**, 1-9.

- De Boever J., Cottyn B., Andries J., Buysse F. & Vanacker J., 1988.** The Use of a Cellulase Technique to Predict Digestibility, Metabolizable and Net Energy of Forages. *Animal Feed Sci. and Technol.* **19**, 247-260.
- De Boever J., Cottyn B., Buysse F. & Vanacker J., 1986.** The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolisable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Sci. and Technol.* **14**, 203-214.
- European Committee for Standardization, 2005.** *CEN/TS 14918: Solid Biofuels - Method for the determination of calorific value*. Brussels, Belgium: European Committee for Standardization.
- European Union, 2009.** Commission Regulation No 152/2009. *Official Journal of the European Union* **L54**, 1-130.
- European Union, 2003.** Directive 2003/30/CE of the European parliament and of the council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport. *Official Journal of the European Union* **L123**, 42-46.
- Ghysel F., Godin B., Flamin C., Delfosse P., Delcarte J. & Stilmant D., 2010.** Valorisation énergétique des fourrages : comparaison de trois filières, enjeux et opportunités. *Fourrages* **203**, 163-173.
- Godin, B., Agneessens, R., Gerin, P. & Delcarte, J., 2011.** Composition of structural carbohydrates in biomass: Precision of a liquid chromatography method using a neutral detergent extraction and a charged aerosol detector. *Talanta* **85**, 2014-2026.
- Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P. & Delcarte, J., 2010.** Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**, 549-560.
- Hamelinck C., van Hooijdonk & G., Faaij A., 2005.** Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* **28**, 384-410.
- Hames B., 2009.** Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, In: Mielenz, J., eds. Biofuels: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* vol. 581. New York, USA: Humana Press, pp. 145-183.
- Kamm B. & Kamm M., 2004.** Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 137-145.

Klass D., 2004. Biomass for Renewable Energy and Fuels. *Encyclopedia of Energy* **1**, 193-212.

Lesteur M., Latrille E., Maurel V., Roger J., Gonzalez C., Junqua G. & Steyer J., 2011. First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy. *Bioresource Technol.* **102**(3), 2280-2288.

Lorenz A., Coors J., de Leon N., Wolfrum E., Hames B., Sluiter A. & Weimer P., 2009. Characterization, Genetic Variation, and Combining Ability of Maize Traits Relevant to the Production of Cellulosic *Ethanol*. *Crop Sci.* **49**, 85-98.

McKendry P., 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technol.* **83**, 37-46.

Spatari S., Bagley D. & MacLean H., 2010. Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. *Bioresource Technol.* **101**, 654-667.

Tamaki Y. & Mazza G., 2011. Rapid Determination of Lignin Content of Straw Using Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 504-512.

Van Soest P. & Wine R., 1967. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *J. of the AOAC* **50**, 50-55.

Van Soest P., 1973. Collaborative Study of Acid-Detergent Fiber and Lignin. *J. of the AOAC* **56**, 781-784.

Vogel J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 301-307.

Wolfrum E., Lorenz A. & de Leon N., 2009. Correlating detergent fiber analysis and dietary fiber analysis data for corn stover collected by NIRS. *Cellulose* **16**, 577-585.

Appendix

Table A1. Main chemical components content (mean and standard deviation) of the different investigated biomasses. For each parameter, biomasses with the same letter are not significantly different.

	Number of samples	Cellulose (kg/kg DM)	Hemicelluloses (kg/kg DM)	Lignin (kg/kg DM)	Total soluble sugars (kg/kg DM)	Starch (kg/kg DM)	Proteins (kg/kg DM)	Mineral compounds (kg/kg DM)
Miscanthus giganteus late winter	74	0.457 ±0.015 A	0.249 ±0.018 C	0.118 ±0.008 A	0.000 ±0.000 I	ND	0.013 ±0.004 H	0.018 ±0.005 I
Miscanthus giganteus autumn	21	0.378 ±0.008 B, C	0.243 ±0.005 C, D	0.086 ±0.005 B	0.049 ±0.007 E, F	ND	0.033 ±0.009 F, G	0.037 ±0.006 G, H
Switchgrass late winter	128	0.352 ±0.028 D	0.306 ±0.017 A	0.077 ±0.012 C	0.000 ±0.000 H, I	ND	0.045 ±0.018 E, F	0.050 ±0.019 F
Switchgrass autumn	22	0.341 ±0.009 D, E	0.297 ±0.011 A	0.073 ±0.009 C	0.002 ±0.001 I	ND	0.032 ±0.011 F, G	0.056 ±0.005 E, F
Spelt straw	79	0.367 ±0.021 C	0.279 ±0.025 B	0.075 ±0.004 C	0.024 ±0.021 F, G, H	ND	0.025 ±0.012 G	0.071 ±0.013 D
Fiber sorghum late winter	53	0.398 ±0.023 B	0.230 ±0.014 D, E	0.078 ±0.008 C	0.008 ±0.005 H, I	ND	0.044 ±0.008 E, F	0.054 ±0.013 F
Fiber sorghum autumn	92	0.305 ±0.028 F	0.222 ±0.013 E	0.048 ±0.013 E	0.126 ±0.045 D	ND	0.069 ±0.020 D	0.065 ±0.011 D, E
Cocksfoot-Alfalfa mixture 3 harvest cycles	27	0.278 ±0.012 G	0.223 ±0.014 E, F	0.043 ±0.003 E	0.069 ±0.013 E	ND	0.111 ±0.019 A	0.091 ±0.007 B
Tall fescue 3 harvest cycles	175	0.253 ±0.020 H	0.213 ±0.012 F, G	0.035 ±0.004 F	0.157 ±0.046 C	ND	0.098 ±0.014 B	0.100 ±0.009 A
Rye immature	54	0.208 ±0.009 I	0.204 ±0.007 G	0.019 ±0.004 H	0.270 ±0.042 A	ND	0.106 ±0.015 A, B	0.072 ±0.009 D
Fiber corn late winter	21	0.195 ±0.029 I, J	0.184 ±0.025 H	0.029 ±0.005 G, H	0.006 ±0.004 G, H, I	0.375 ±0.068 A	0.051 ±0.010 E	0.028 ±0.006 H, I
Fiber corn autumn	125	0.176 ±0.024 J	0.181 ±0.016 H	0.024 ±0.004 G	0.068 ±0.020 E	0.293 ±0.070 B	0.069 ±0.011 D	0.041 ±0.006 G

DM: Dry matter ; ND: not determined

Table A1 (second part). Main chemical components content (mean and standard deviation) of the different investigated biomasses. For each parameter, biomasses with the same letter are not significantly different.

	Number of samples	Cellulose (kg/kg DM)	Hemicelluloses (kg/kg DM)	Lignin (kg/kg DM)	Total soluble sugars (kg/kg DM)	Starch (kg/kg DM)	Proteins (kg/kg DM)	Mineral compounds (kg/kg DM)
Hemp	80	0.333 ±0.069 E	0.134 ±0.029 I	0.083 ±0.010 B	0.027 ±0.023 F, G	ND	0.080 ±0.032 C	0.082 ±0.018 C
Jerusalem artichoke	46	0.216 ±0.034 I	0.112 ±0.019 J	0.065 ±0.012 D	0.189 ±0.055 B	ND	0.051 ±0.016 E	0.096 ±0.022 A, B

DM: Dry matter ; ND: not determined

Table A2. Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses (mean and standard deviation) of the different investigated biomasses. For each parameter, biomasses with the same letter are not significantly different.

	Number of samples	Xylan (kg/kg DM)	Arabinan (kg/kg DM)	Mannan (kg/kg DM)	Galactan (kg/kg DM)	Hemicellulosic glucan (kg/kg DM)
Miscanthus giganteus late winter	31	0.216 ±0.011 B	0.0210 ±0.0013 E	0.0058 ±0.0028 C, D, E	0.0046 ±0.0009 F	0.0121 ±0.0022 H
Miscanthus giganteus autumn	12	0.186 ±0.004 D	0.0258 ±0.0011 C, D	0.0069 ±0.0005 B, C, D	0.0061 ±0.0005 D, E, F	0.0225 ±0.0039 A, B, C
Switchgrass late winter	34	0.235 ±0.022 A	0.0348 ±0.0028 A	0.0048 ±0.0034 D, E, F	0.0150 ±0.0029 B	0.0250 ±0.0041 A
Switchgrass autumn	10	0.237 ±0.012 A	0.0358 ±0.0016 A	0.0004 ±0.0012 G	0.0142 ±0.0007 B	0.0237 ±0.0012 A, B
Spelt straw	23	0.210 ±0.008 B, C	0.0256 ±0.0020 C, D	0.0087 ±0.0006 B, C	0.0072 ±0.0010 C, D, E, F	0.0178 ±0.0016 C, D, E, F, G
Fiber sorghum late winter	6	0.164 ±0.008 E	0.0247 ±0.0016 D	0.0054 ±0.0018 D, E, F	0.0060 ±0.0017 E, F	0.0173 ±0.0039 D, E, G
Fiber sorghum autumn	26	0.195 ±0.006 C, D	0.0242 ±0.0021 D	0.0060 ±0.0016 C, D, E	0.0079 ±0.0012 D, E	0.0207 ±0.0032 B, C, F
Cocksfoot-Alfalfa mixture 3 harvest cycles	9	0.136 ±0.012 F, G	0.0309 ±0.0036 B	0.0064 ±0.0011 B, C, D, E, F	0.0165 ±0.0011 B	0.0210 ±0.0022 B, C, D, F
Tall fescue 3 harvest cycles	14	0.152 ±0.007 E, F	0.0305 ±0.0021 B	0.0051 ±0.0003 D, E, F	0.0106 ±0.0012 C	0.0200 ±0.0029 B, C, D, E, F
Rye immature	7	0.118 ±0.004 G, H	0.0196 ±0.0011 E	0.0043 ±0.0001 D, E, F	0.0066 ±0.0005 D, E, F	0.0208 ±0.0014 A, B, C, D, E, F
Fiber corn late winter	3	0.100 ±0.003 H	0.0220 ±0.0025 D, E	0.0022 ±0.0003 E, F, G	0.0077 ±0.0007 C, D, E, F	0.0158 ±0.0007 D, E, F, G, H
Fiber corn autumn	34	0.125 ±0.013 G	0.0271 ±0.0026 C	0.0039 ±0.0013 F	0.0091 ±0.0022 C, D	0.0170 ±0.0023 E, G

DM: Dry matter

Table A2 (second part). Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses (mean and standard deviation) of the different investigated biomasses. For each parameter, biomasses with the same letter are not significantly different.

	Number of samples	Xylan (kg/kg DM)	Arabinan (kg/kg DM)	Mannan (kg/kg DM)	Galactan (kg/kg DM)	Hemicellulosic glucan (kg/kg DM)
Hemp	20	0.102 ±0.006 H	0.0053 ±0.0016 F	0.0238 ±0.0025 A	0.0271 ±0.0047 A	0.0160 ±0.0028 G
Jerusalem artichoke	26	0.068 ±0.009 I	0.0054 ±0.0016 F	0.0084 ±0.0012 B	0.0162 ±0.0019 B	0.0102 ±0.0022 H

DM: Dry matter

Table A3. Dry matter, enzymatically DOM, bioethanol potential and higher heating value (mean and standard deviation) of the different investigated biomasses. For each parameter, biomasses with the same letter are not significantly different.

	Number of samples	Enzymatically DOM (kg DOM/kg dry organic matter)	Liters of ethanol per kg DM	Higher heating value (MJ/kg DM)
Miscanthus giganteus <i>late winter</i>	74	0.130±0.031 I	0.403±0.018 C	19.5±0.1 A
Miscanthus giganteus <i>autumn</i>	21	0.288±0.022 F, G	0.381±0.012 D, E, F	18.9±0.3 B, C, D
Switchgrass <i>late winter</i>	128	0.277±0.059 F	0.369±0.026 E, F, G	19.1±0.3 B
Switchgrass <i>autumn</i>	22	0.288±0.022 F, G	0.357±0.011 G, H	19.2±0.3 B
Spelt straw	79	0.174±0.075 H	0.378±0.038 E	18.7±0.3 E, F
Fiber sorghum <i>late winter</i>	53	0.242±0.033 G	0.362±0.024 F, G, H	18.8±0.2 C, D
Fiber sorghum <i>autumn</i>	92	0.485±0.071 D	0.372±0.050 E, F, G	18.4±0.2 F, G
Cocksfoot-Alfalfa mixture <i>3 harvest cycles</i>	27	0.618±0.039 C	0.323±0.022 I	18.8±0.1 C, D, E
Tall fescue <i>3 harvest cycles</i>	175	0.670±0.036 B	0.355±0.046 H	17.9±0.2 H
Rye immature	54	0.755±0.023 A	0.391±0.034 C, D	18.2±0.1 G
Fiber corn <i>late winter</i>	21	0.725±0.052 A	0.454±0.073 A	19.0±0.2 C
Fiber corn <i>autumn</i>	125	0.750±0.038 A	0.425±0.079 B	18.7±0.2 D, E
Hemp	80	0.385±0.074 E	0.285±0.070 K	18.6±0.6 E
Jerusalem artichoke	46	0.571±0.065 C	0.300±0.063 J	17.6±0.3 I

DM: Dry matter ; DOM: Digestible organic matter

Partie 3

Chapitre 8

Influence de la maturité sur la composition chimique et le potentiel énergétique de biomasses végétales

Adapté de la publication :

Godin B., Lamaudière S., Agneessens R., , Schmit T., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. & Delcarte J., 2013. Chemical composition and biofuels potentials of various vegetal biomasses: influence of the harvest period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Soumis.

Après avoir évalué la variabilité, à un état physiologique donné, de la composition chimique et des aptitudes aux conversions énergétiques de plusieurs biomasses fibreuses, nous avons déterminé ces propriétés de ces biomasses à des états physiologiques très contrastés.

L'état physiologique est un paramètre important à prendre en compte pour les procédés de valorisation d'une biomasse fibreuse car nous avons montré que les propriétés chimiques de la biomasse en dépendent. Généralement, pour chacune des biomasses fibreuses, au cours de la maturation de la plante :

- Les teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine augmentent ;
- Les teneurs en constituants non-structuraux diminuent ;
- La teneur relative en xylane dans les hémicelluloses augmente ;
- La teneur relative en glucane hémicellulosique diminue ;
- La matière organique digestible enzymatiquement (MODE), l'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse, diminue fortement ;
- Le pouvoir calorifique supérieur (PCS), l'indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse, augmente légèrement ;
- Le potentiel en bioéthanol total (issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux) augmente modérément.

Ces évolutions s'expliquent par la maturation de la plante au cours de laquelle ses parois secondaires s'épaississent et se lignifient ; la part de feuilles diminue et la part de tiges augmente. Le maïs fibre ne suit pas ces tendances car, lors de sa maturation, de l'amidon (qui est digestible) apparaît au niveau de son épi. La part d'amidon étant une fraction importante de cette plante, elle dilue les teneurs des autres constituants chimiques.

Keywords. Harvest period, Vegetal biomasses, Hemicelluloses, Analysis, Biofuel

1. Introduction

The main chemical components of vegetal biomasses (forage crops, agricultural residues and wood) are cellulose (linear homogeneous structural polysaccharide composed of D-glucose units), hemicelluloses (ramified heterogeneous structural polysaccharides composed composed of D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose and D-glucose units), lignin (phenyl propanoid polymer composed of syringyl, guaiacyl and p-hydroxyphenyl units), pectins (ramified heterogeneous structural polysaccharides mainly composed of D-galacturonic acid units), soluble sugars (D-glucose, D-fructose, sucrose and fructans), starch, proteins and mineral compounds (Carpita et al., 2000). The content of these components changes as the plant matures. There is a thickening and lignification (increase of secondary cell walls) of the cell walls as the plant develops during the growing season. This causes the increase of the proportion of structural components (cellulose, hemicellulose and lignin) and the decrease of the proportion of the non-structural components (non-structural carbohydrates, proteins and mineral compounds) in the harvested biomass as growth is prolonged (Dien et al., 2006). This has been shown for the structural components and non-structural components of alfalfa, reed canarygrass and switchgrass by Dien et al. (2006). It has also been shown for the structural components of corn stems by Jung et al. (2006). An optimal valorization of these biomasses to produce biofuel or green chemicals requires a good knowledge of the available contents and molecular composition of the main chemical components, which evolve with the harvest period (McKendry, 2002 ; Kamm et al., 2004).

Solid (e.g. pellets), liquid (e.g. bioethanol) and gaseous (e.g. biogas) biofuel can be produced from biomasses (Ghysel et al., 2010 ; Bessou et al., 2011). Thereafter, these biofuel can be used to produce three types of energy: thermal, electrical and mechanical energy (Bessou et al., 2011). In order to compare the energy value of biomasses, we decided to use the higher heating value (HHV), the methodology of (Spatari et al., 2010) and the enzymatically digestible organic matter (DOM) (De Boever et al., 1986) as fast approaches to assess, respectively,

the combustion (McKendry, 2002), the bioethanol and the anaerobic digestibility without any pretreatment (biomethanation) potentials of the biomasses.

The aim of the present study is to assess the influence of the harvest period on the main chemical components of the biomasses (cellulose, hemicelluloses, lignin, total soluble sugars, starch, proteins, mineral compounds), the monosaccharidic components of hemicelluloses (xylan, arabinan, mannan, galactan, hemicellulosic glucan), the enzymatically DOM, the total bioethanol potential and the HHV of various crops (miscanthus, switchgrass, fiber sorghum, fiber corn, spelt, tall fescue, cocksfoot, hemp and jerusalem artichoke).

2. Material and methods

2.1. Biomass material

Miscanthus giganteus (*Miscanthus x giganteus* J.M. Greef & Deuter ex Hodk. & Renvoize ; cultivar: Bical), switchgrass (*Panicum virgatum* L. ; cultivar: Cave-in-Rock), fiber sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench ; cultivar: H133), fiber corn (*Zea mays* L. ; Cultivar: Ronaldinio), spelt (*Triticum aestivum* L. ssp. *spelta* (L.) Thell. ; cultivar: Cosmos), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. ; cultivar: Kora), cocksfoot (*Dactylis glomerata* L. ; cultivar: Terrano), hemp (*Cannabis sativa* L. ; cultivar: Epsilon 68) and jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. ; aerial part ; cultivar: Volkenroder spindel) came from crop trials performed in 2009 and 2010 at Libramont (498 m above sea level (asl); average annual temperature: 8.6°C ; average annual precipitation: 1260 mm ; 49°55'N, 05°24'E ; Belgium). For each biomass sample, a plot between 12 and 24 m² of the whole above ground biomass was harvested (at 10 cm from the ground) manually at different harvest periods. For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

The biomass was chopped and two representative subsamples of 750 g of the whole of each biomass were then directly dried at 60°C for 72 h in a Memmert UFP800 oven (VWR, Heverlee, Belgium). After drying, the two subsamples were first milled with a 4 mm screen hammer mill (BOA, Waterleau, Herent, Belgium) followed by a second milling step with a 1 mm screen cyclone mill (Cyclotec, FOSS

Benelux N.V., Bruxelles, Belgium). The samples were stored in airtight bags at room temperature and protected from light in a dark box.

2.2. Chemical analyses

All chemicals were of analytical grade or equivalent and were purchased from VWR (Heverlee, Belgium) and Chem-Lab (Zedelgem, Belgium). Duplicate aliquots were measured and results expressed in kg per kg of DM (103°C dried matter).

The xylan, arabinan, mannan, galactan and the total glucan content were determined by a sulfuric acid hydrolysis method (SAH) after fractionation (Godin et al., 2011). The hemicellulosic glucan content was determined by the SAH method except that the cellulose solubilization step (incubation with H₂SO₄ 72% w/w for 1 h at 30°C) was skipped. The cellulosic glucan content is calculated as the difference between the total glucan and the hemicellulosic glucan content. The acid detergent lignin (ADL which is considered as the lignin content) was determined by the Van Soest (VS) gravimetric method (Van Soest et al., 1973). The total soluble sugars were determined by the Luff-Schoorl method (European Union, 2009). The starch content was determined by the Ewers method (European Union, 2009). The protein content was determined by the Kjeldahl method using 6.25 as conversion factor of nitrogen to protein (AOAC, 1990). The mineral content was determined by use of a muffle furnace set at 550°C for 3h. The dry matter (DM) content was determined at 103°C for 4h.

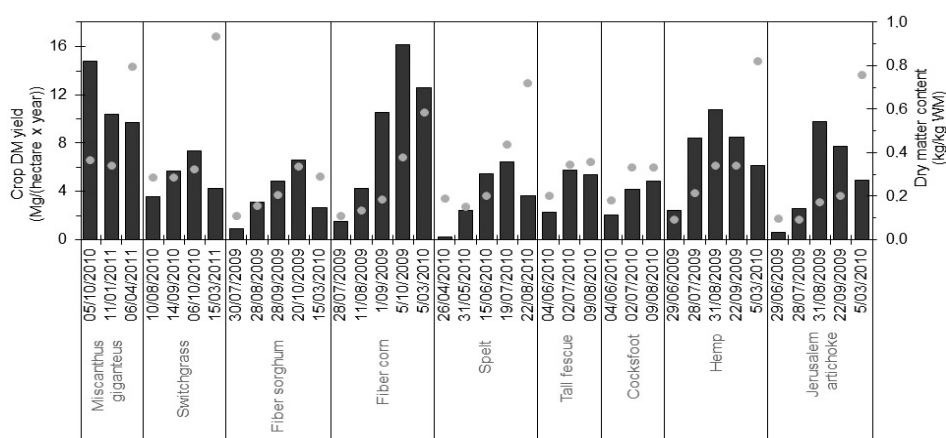
2.3. Biofuel potentials

The enzymatically DOM of the biomass, as determined by the De Boever method (De Boever et al., 1986), was used to compare the suitability of the different biomasses to be converted by anaerobic digestion without any pretreatment. We can consider that the enzymatically DOM corresponds to the minimum level of anaerobic digestion without any pretreatment of the biomass because this biological conversion digest at least as much as the enzymes used in the method used to quantify the enzymatically DOM. Briefly, biomass samples were incubated, in chronologic order, with pepsin in 0.1 N HCl for 24 h at 40°C, with 0.1 N HCl for 45

min at 80°C and with cellulase in an acetate buffer at pH 4,8 for 24 h at 40°C. The bioethanol potential was assessed by following the methodology of (Spatari et al., 2010), on the basis of i) the monomers expected from the hydrolysis yields of cellulose, hemicelluloses (hydrolysis yields of respectively 91% and 81% with a liquid hot water pretreatment (da Costa Sousa et al., 2009)) and starch (hydrolysis yield of 96% (Buchholz et al., 2008)); ii) the stoichiometric ethanol fermentation yields of monosaccharides (92.5% for glucose and fructose, and 86% for xylose, arabinose, galactose and mannose (Hamelinck et al., 2005)) and iii) the ethanol recovery yield (99.5% (Spatari et al., 2010)). The bioethanol potential was calculated as the ethanol that can be expected from fermentation of the directly available soluble sugars and starch, and also from cellulose and hemicelluloses after hydrolysis and conversion. The thermal energy was assessed on the basis of the higher heating value (HHV). The HHV was determined by the method using a Parr controlled oxygen bomb calorimeter (European Committee for Standardization, 2005).

2.4. Crop yields

To be expressed per hectare, the results were weighted by the yield of the DM per hectare, of each vegetal biomass. The crop DM yields and DM contents at each harvest time are shown in Figure 1.



For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

DM: Dry matter ; WM: Wet matter

Figure 1. Crop yield (as dry matter ; black bars) and dry matter content (grey dots) of the different investigated biomasses according to harvest period

3. Results and discussion

3.1. Biomass chemical composition

The evolution of the chemical composition of the analyzed biomasses is shown in Figure 2 as a function of their harvest period (details can be found in Table A1 of the appendix). The biomasses with the highest and lowest content of structural components (cellulose, hemicelluloses and lignin) are miscanthus and jerusalem artichoke, respectively. The biomass with the highest starch content is fiber corn. For all crops, the content of proteins and mineral compounds decreases with aging, while the content of structural components increases (Figure 2 top). The evolution of these chemical components according to the harvest period can be explained by the fact that, during its development, the part of leaves of a plant decreases whereas the part of stems of a plant increases. The leaves have less lignified cell walls (poor in secondary cell walls) and metabolically active cells with high contents of non-structural components (Hatfield et al., 2007 ; Nizami et al., 2009). The stems have lignified cell walls with high contents of structural components to stand up. This lignification (increase of structural components ; increase of secondary cell walls) of cell walls increases with the plant development (Hatfield et al., 2007 ; Nizami et al., 2009). A peak of the content of total soluble sugars (sum of the soluble monosaccharides, sucrose and fructans) is generally observed in the summer (Figure 2 top). It corresponds to the anthesis period of the plant. It is known that after the anthesis of the plant, the plant will start to rapidly increase its contents of cellulose, hemicelluloses and lignin and rapidly decreases its content of soluble sugars. This corresponds to the lignification of the cell walls (Hatfield et al., 2007). Late winter harvested biomasses have higher contents of structural components and lower contents of non-structural components compared to the same biomass harvested during autumn (Figure 2 top). This can be explained by the nutrient translocation to the rhizomes, the solubilization and the leaching of the non-structural components during the winter (Cadoux et al., 2009).

The evolution of the main chemical components in fiber corn is different because of the increase of the starch content, which dilutes the other main chemical components

(Figure 2 top). Starch accumulation is also observed in spelt, but to a lesser extent; only the straw was analyzed for the last harvest period and no remaining starch was found (Figure 2 top).

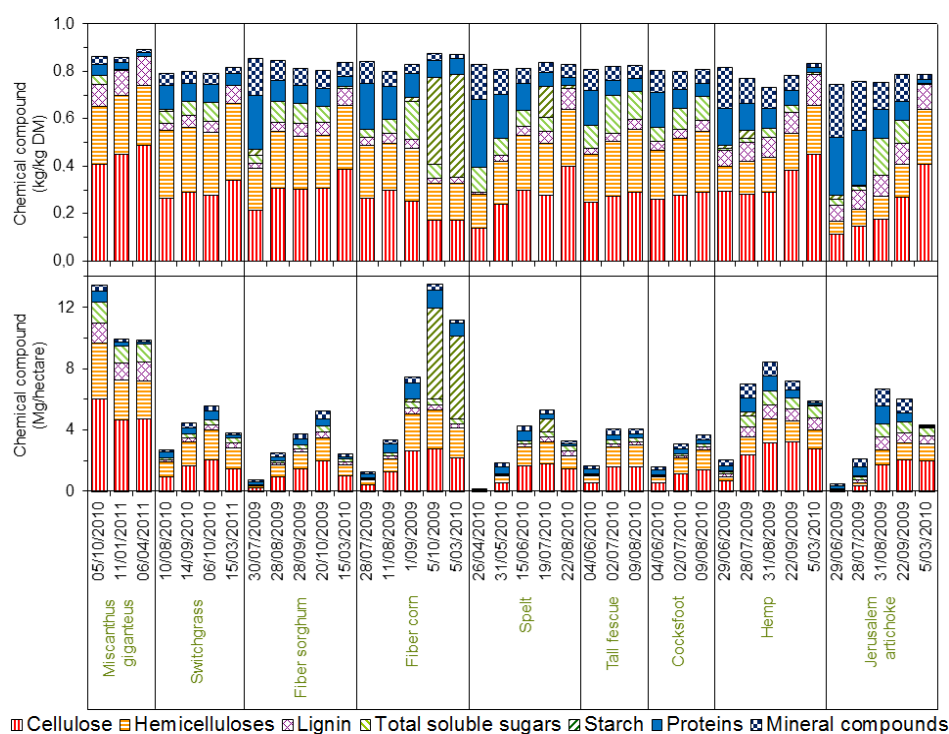
Soluble polysaccharides (such as pectins), acid soluble lignin, organic acids, alcohols, pigments and lipids compose most probably the non-identified fraction of each biomass in Figure 2 top, as also suggested by Hames (2009) for other biomasses. Hemp and jerusalem artichoke have a higher non-identified fraction compared to the other biomasses. This can be explained by their botanical differences. Hemp and jerusalem artichoke are non-commelinid dicotyledons which are known to have a higher pectin content and a lower hemicelluloses content, as compared to the other biomasses that are commelinid monocotyledons (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2011).

Figure 2 bottom also shows the biomass chemical components that can be harvested per hectare as a function of the harvest period. It appears that the crop DM yield is the parameter that influences the most the amount of chemical components that can be collected per hectare. Therefore, lower yields of total harvested biomass are actually observed for late winter harvest while this harvest period presents the highest specific contents of structural components (cellulose, hemicelluloses and lignin) (Figure 2 top). The loss of leaf biomass during the winter can explain this yield decrease (Cadoux et al., 2009). The nutrient translocation from the stems and/or the leaves to the rhizomes can also explain this decrease for perennial crops (Cadoux et al., 2009).

Fiber corn has a low specific content of structural components but it has a high yield of structural components per hectare because of its high biomass yield per hectare. This is also observed for hemp that has an intermediate specific content of structural components which ends up as a relatively high yield per hectare owing to the total dry matter produced.

Perennial crops that are harvested in autumn are expected to need a higher fertilization level, as compared to the same crop harvested during the winter, because such a early harvest disables the crop to translocate its nutrients to its rhizomes (Cadoux et al., 2009). The amount of greenhouse gas production would also increase due to the manufacture and spreading of increased amounts of fertilizers (Cadoux et al., 2009).

The crop DM yield per hectare is highly dependent on the area where it is grown (Cadoux et al., 2010). Therefore, it should be noted that the yields used in the present study correspond to Libramont (Belgium) which is a mid-mountain area (498 m asl ; average annual temperature: 8.6°C ; average annual precipitation: 1260 mm).



For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.
Figure 2. Main chemical composition (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses according to the harvest period. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

3.2. Monosaccharidic composition of hemicelluloses

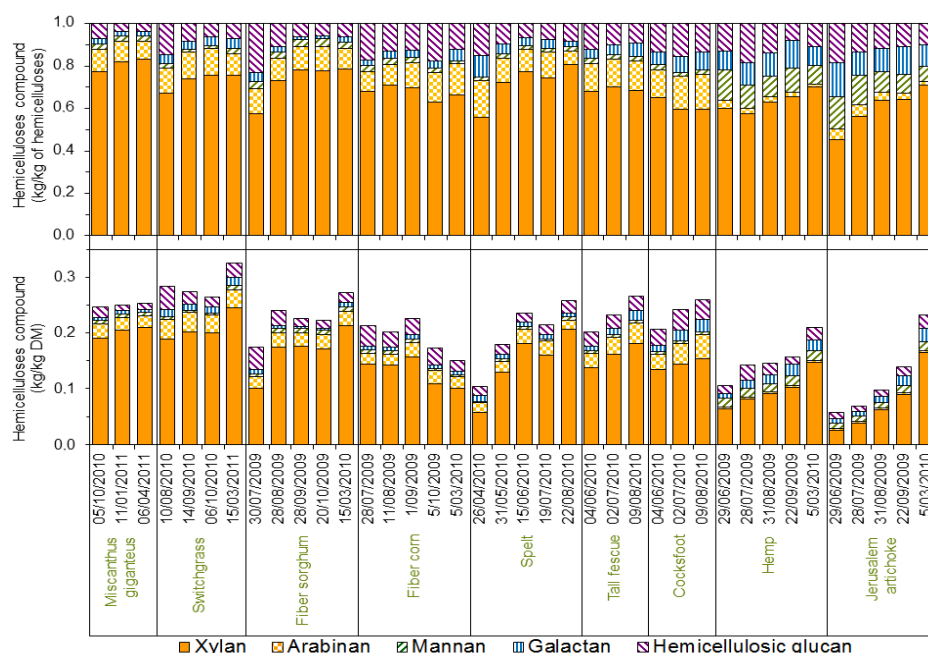
Figure 3 presents the composition of the hemicelluloses as a function of the harvest period (details can be found in Table A2 of the appendix). The biomass with the highest and lowest absolute content of hemicelluloses are switchgrass and jerusalem artichoke, respectively. Xylan is the major absolute and relative hemicellulosic component. The last harvest period of miscanthus has the highest relative content of xylan whereas the last harvest period of switchgrass has the highest absolute content of xylan. The absolute and relative contents of xylan and arabinan, at a same harvest date, are higher in the commelinid monocotyledon biomasses, as compared to the non-commelinid dicotyledon biomasses (hemp and jerusalem artichoke). The opposite is observed for the absolute and relative content of mannan and the relative content of galactan. This is consistent with the fact that commelinid monocotyledon biomasses are known to have hemicelluloses with higher contents of arabinoxylan and β -glucan, and lower content of xyloglucan and mannan, as compared to non-commelinid dicotyledons biomasses (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2011). Figure 3 shows that, in general, an increase of the total hemicelluloses content is mainly due to an increase of the xylan content, while the relative contents of arabinan and hemicellulosic glucan decrease. This can be associated with cell wall lignification (increase of secondary cell walls), decrease of the leaf part of the plant and the corresponding increase of the stem part of the plant, as mentioned above (Hatfield et al., 2007 ; Nizami et al., 2009).

For the commelinid monocotyledon biomasses, at a same harvest date, the absolute and relative hemicellulosic components are generally, by decreasing order of importance, xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan. They are known to have higher content of arabinoxylan and β -glucan, as compared to non-commelinid dicotyledons. During growth, the absolute and relative contents of xylan generally increase while there is a decrease of the relative content of hemicellulosic glucan (Figure 3). The evolution of the hemicellulosic content in the fiber corn dry matter is different (Figure 3) due to the contribution of starch, as discussed above. This different evolution is not observed with the last harvest stage of spelt, as discussed above (Figure 2 top).

For the non-commelinid dicotyledon biomasses, at a same harvest date, the absolute and relative hemicellulosic components are generally, by order of decreasing importance, xylan, hemicellulosic glucan, galactan, mannan and arabinan. They are indeed known to have hemicelluloses with higher content of xyloglucan and mannan, as compared to commelinid monocotyledons (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008). Figure 3 shows that, in general, the absolute content of xylan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan and the relative content of xylan increase during the growth while the relative contents of mannan and hemicellulosic glucan decrease.

Arabinoxylan, xyloglucan (which also contains galactan), β -glucan and mannan (which also contains galactan and hemicellulosic glucan) are the four main type of structural polysaccharides of hemicelluloses (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008). The evolution of the relative contents of these hemicellulosic polysaccharides according to the harvest period can be explained by the increasing degree of lignification (increase of secondary cell walls) of the cell walls during its development. Lignified cell walls have a higher content of arabinoxylan, and lower contents of xyloglucan, β -glucan and mannan compared to less lignified cell walls (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008).

It has been mentioned by Carpita et al. (2000) that arabinoxylan are more substituted by arabinan in commelinid monocotyledons compared to non-commelinid dicotyledons. The fact that the lignin of commelinid monocotyledons is highly linked to the arabinan residue of arabinoxylan by ferulate residues explains the high degree of substitution of arabinoxylan by arabinan (Carpita et al., 2000).



For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

Figure 3. Relative (top) and absolute (bottom) monosaccharidic composition of hemicelluloses of the different investigated biomasses according to the harvest period. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

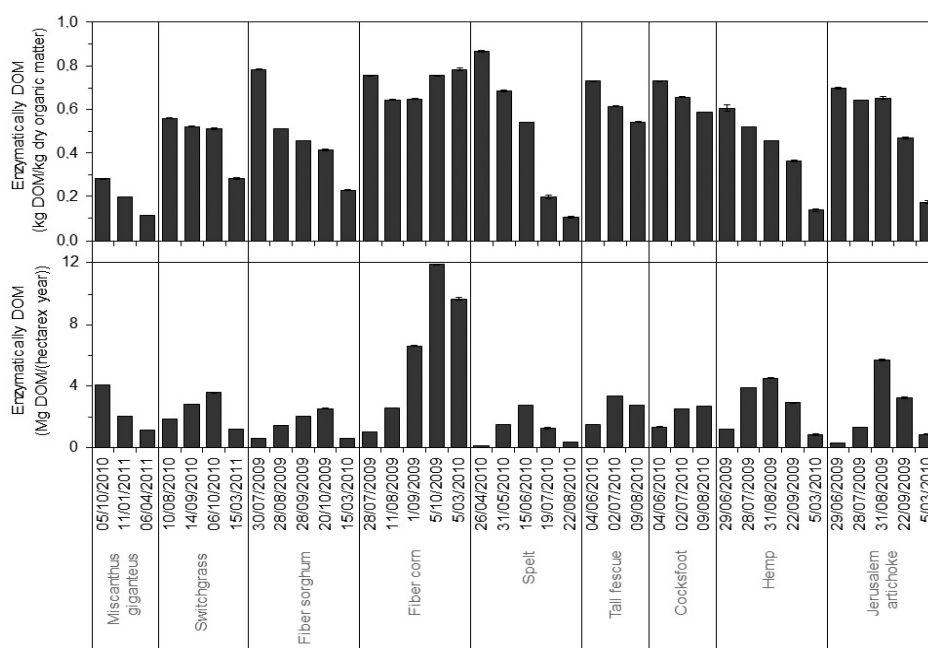
3.3. Biomass characteristics as guide in the selection of transformation technology

Enzymatically digestible organic matter

The enzymatically digestible organic matter (DOM) was used to assess the suitability of the analyzed biomasses for anaerobic digestion (biomethanation) without any pretreatment. The evolution of enzymatically DOM of the analyzed biomasses with the harvest period is shown in Figure 4 (details in Table A3 of the appendix). For the purpose of our study, this method was considered much faster than determining the real biomethane potential, while the results can be correlated with anaerobic digestibility (De Boever et al., 1986; Lesteur et al., 2011). The biomasses with the highest enzymatically DOM per kg of the dry organic matter are fiber corn, cocksfoot, tall fescue and jerusalem artichoke. This can be explained by their high total soluble sugars, starch and/or proteins content which are a part of the

enzymatically DOM (De Boever et al., 1986). It is generally observed that, during the growth, the enzymatically DOM content decreases (Figure 4 top). This can be mainly explained by the increase of cellulose and lignin contents during plant aging (Figure 2 top) which is due to the cell wall thickening and lignification, the decrease of the leave part and the increase of the stem part of the plant, as mentioned above (Hatfield et al., 2007 ; Nizami et al., 2009). The evolution of the enzymatic degradability in fiber corn is different, mainly because of the important increase of the starch content which is a part of the enzymatically DOM (Figure 4) (De Boever et al., 1986). This different evolution is not observed with the last harvest stage of spelt because only the straw part is considered (Figure 2 top). Biomasses with high enzymatically DOM have generally a high content of mineral compounds (Figures 2 top and 4 top) because they are made of an important part of leaves which have much less lignified cell walls and cells rich in cytoplasm (containing the mineral salts). This content of mineral compounds brought to the anaerobic digestion is used by the microorganisms to digest the biomass.

Figure 4 bottom shows the evolution of yields of enzymatically DOM per hectare according to harvest period. The amount of enzymatically DOM per hectare depends mainly on the biomass yield and only to a secondary extent on its degradability. The highest quantity of enzymatically DOM per hectare is therefore observed for the autumn harvest.



For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

DOM: Digestible organic matter

Figure 4. Enzymatically DOM (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses according to the harvest period. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

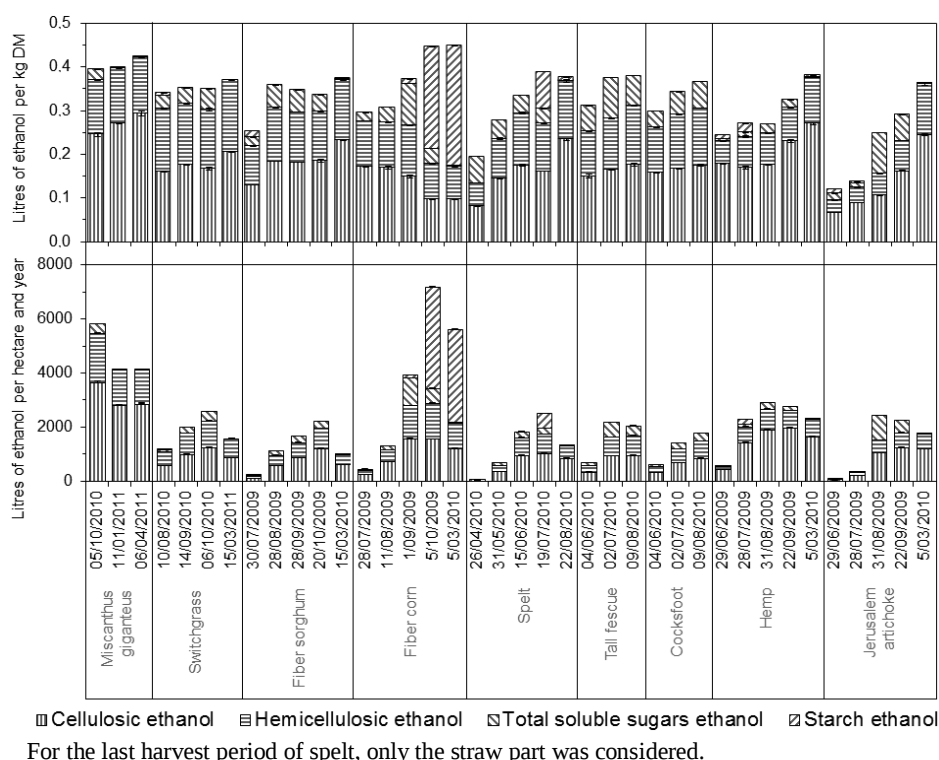
Bioethanol

The calculated ethanol production expected from the analyzed biomasses is shown in Figure 5 (details in Table A3 of the appendix). Bioethanol production from soluble carbohydrates and starch/fructanes of biomasses can be readily fermented with current technologies whereas bioethanol production from cellulose and hemicelluloses of biomasses need a pretreatment to be fermented. Without any pretreatment only 20% of the ethanol production from cellulose and hemicelluloses can be reached (Balat et al., 2008). Fiber corn and miscanthus are the biomasses with highest total bioethanol yield per kg of DM. Late winter miscanthus and hemp are the biomasses with the highest bioethanol potential coming from structural carbohydrates (Figure 5 top). Fiber corn is the biomass with the highest bioethanol potential coming from non-structural carbohydrates (Figure 5 top). For most substrates, the main sources of ethanol are structural carbohydrates, except for fiber corn, jerusalem artichoke and tall fescue where a significant contribution is brought

by non-structural carbohydrates (Figure 5 top). The increase of the bioethanol potential from structural carbohydrates, according to the harvest period, is linked to the increasing content of structural components (Figure 2 top and Figure 5 top). Fiber corn shows a different pattern because starch dilutes the structural carbohydrates (Figure 2 top and Figure 5 top). This different evolution is not observed with the last harvest stage of spelt because only the straw part is considered (Figure 2 top).

A peak of bioethanol potential from non-structural carbohydrates can be observed in the summer (Figure 5 top), as a consequence of the, above mentioned, peak of total soluble sugars at the same period (Figure 2 top).

The total bioethanol potential per hectare that can be expected for the analyzed biomasses is shown in Figure 5 bottom. The total bioethanol potential per hectare is mostly affected by the crop DM yield. The highest total bioethanol potential per hectare is therefore observed for the autumn harvest.



■ Cellulosic ethanol ■ Hemicellulosic ethanol ▨ Total soluble sugars ethanol ▤ Starch ethanol

For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

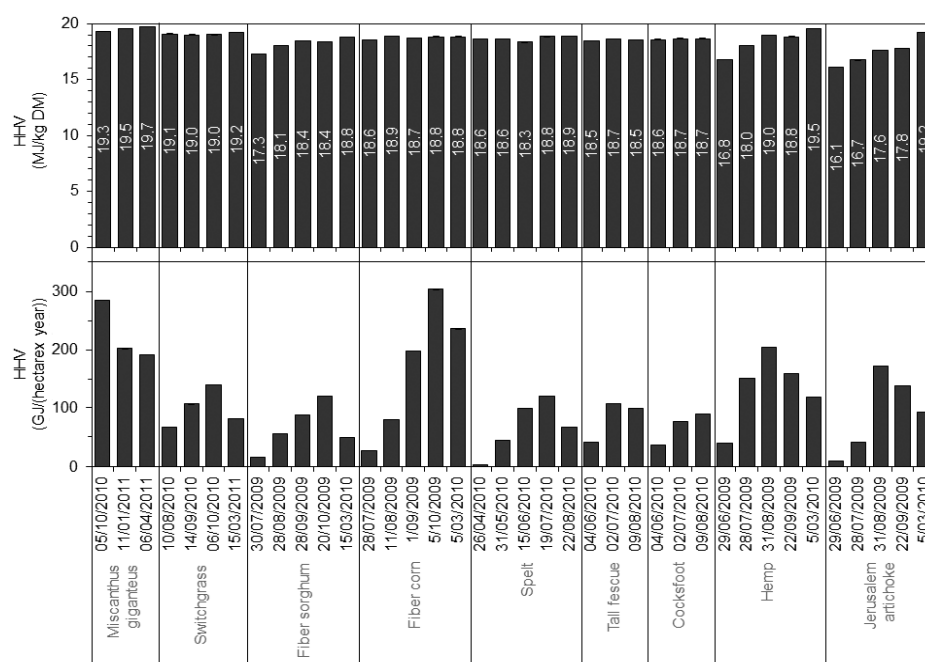
Figure 5. Potential bioethanol (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses according to the harvest period. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

Thermal energy

The HHV was used to assess the suitability of the biomasses for conversion to thermal energy by combustion, independently of their humidity (that can be adjusted by drying, if required). Figure 7 presents the evolution of biomass HHV with the harvest period (details in Table A3 of the appendix). Late winter harvested miscanthus is the biomass with the highest HHV per kg of DM. The HHV increases very slightly with plant aging (Figure 6 top). This can be mainly explained by the increase of the organic matter content (complement of the mineral content, that decreases) and by the slightly increasing lignin content during plant aging (Figure 2 top).

The thermal energy that can be expected per hectare from combustion of harvested biomass is shown in Figure 6 bottom. The HHV per hectare is mainly affected by the crop DM yield. The highest thermal energy production potential per

hectare is therefore observed for the autumn harvest. Nevertheless, in real combustion, the biomass water content reduces the net useful energy yield and its mineral content can lead to clinker formation. Figure 1 and Figure 2 top show that a winter harvest or harvest as straw is more appropriate because the biomass presents higher DM and lower mineral contents, as compared to the autumn harvest.



For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

DM : Dry matter ; HHV: Higher heating value

Figure 6. Higher heating value (top) and yield (bottom) of the different investigated biomasses in dry state according to the harvest period. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

4. Conclusions

The chemical composition of various energy crops grown under conditions of mid-mountain Belgium evolves with plant aging, with a significant increase of the content of structural components, a decrease of the content of non-structural components and a decrease of the enzymatic digestibility. In the hemicellulosic components, there is an increase of the relative content of xylan and a decrease of the relative content of hemicellulosic glucan. These results were used to compare the investigated crops as a source of renewable biofuel. The enzymatically DOM

decrease according to the harvest stage is related to the increase of the cellulose and lignin content. The increase of total bioethanol yield per biomass DM with harvest stage can be explained by the increase of the total carbohydrates content. The biomass heating energy value increases with harvest stage as a consequence of the increasing proportion of lignin and total organic matter, and the corresponding decrease of the mineral content.

The amount of harvestable biomass increases during the growth season, but decreases during winter. For all energy conversions investigated, the best harvest period is autumn, because the significantly higher crop DM yield largely compensate for the sometimes slightly less favorable chemical composition. The biomass compositions presented in the present paper can be further used to investigate with more details the suitability of each biomass for bioenergy or biorefining conversion or fractionation processes.

Acknowledgements

This research was funded by the Walloon Agricultural Research Center (CRA-W) with the support of the Belgian Science Policy and by the ENERBIOM project (ENERBIOM project n°14GR23024 of the European territorial co-operation program in the context of INTERREG IV A « Grande Région » 2007-2013 n°CCI2007CB163PO064, co-financed by the FEDER-EU funds). The authors are grateful to the technicians of the BIOETHA2 and the ENERBIOM projects for their technical support.

References

- AOAC, 1990.** *Official methods of analysis*. 15th ed. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemist.
- Balat M., Balat H. & Oz C., 2008.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Sci.* **34**, 551-573.
- Bessou C., Ferchaud F., Gabrielle B. & Mary B., 2011.** Biofuels, greenhouse gases and climate change. *A review. Agron. Sustain. Dev.* **31**, 1-79.
- Buchholz K. & Seibel J., 2008.** Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research* **343**, 1966-1979.

Cadoux S., Briand S., Chabbert B., Besnard A., Félix I., Savouré M., Marsac S., Preudhomme M., Labalette F. & Boizard H., 2010. *Biomass productivity of different energy crops under French conditions: Results of the “Regix” Experimental network*. Lyon, France: 18th European Biomass Conference & Exhibition.

Cadoux S., Preudhomme M., Machet J., Mary B., Fourdinier E., Ferchaud F., Boizard H. & Gosse G., 2009. *Productivity and environmental impacts of energy crops first results of the long term experiment « biomass & environment »*. Hamburg, Germany: 17th European Biomass Conference & Exhibition.

Carpita N. & McCann M., 2000. The cell wall, *In*: Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.

da Costa Sousa L., Chundawat S., Balan V. & Dale, B., 2009. ‘Cradle-to-grave’ assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **20**, 1-9.

De Boever J., Cottyn B., Andries J., Buysse F. & Vanacker J., 1988. The Use of a Cellulase Technique to Predict Digestibility, Metabolizable and Net Energy of Forages. *Animal Feed Sci. and Technol.* **19**, 247-260.

De Boever J., Cottyn B., Buysse F. & Vanacker J., 1986. The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolisable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Sci. and Technol.* **14**, 203-214.

Dien B., Jung H.-J., Vogel K., Casler M., Lamb J., Iten L., Mitchell R. & Sarath G., 2006. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy* **30**, 880-891.

European Committee for Standardization, 2005. *CEN/TS 14918: Solid Biofuels - Method for the determination of calorific value*. Brussels, Belgium: European Committee for Standardization.

European Union, 2009. Commission Regulation No 152/2009. *Official Journal of the European Union* **L54**, 1-130.

Ghysel F., Godin B., Flamin C., Delfosse P., Delcarte J. & Stilmant D., 2010. Valorisation énergétique des fourrages : comparaison de trois filières, enjeux et opportunités. *Fourrages* **203**, 163-173.

- Godin, B., Agneessens, R., Gerin, P. & Delcarte, J., 2011.** Composition of structural carbohydrates in biomass: Precision of a liquid chromatography method using a neutral detergent extraction and a charged aerosol detector. *Talanta* **85**, 2014-2026.
- Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P. & Delcarte, J., 2010.** Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**, 549-560.
- Hamelinck C., van Hooijdonk & G., Faaij A., 2005.** Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* **28**, 384-410.
- Hames B., 2009.** Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, In: Mielenz, J., eds. Biofuels: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* vol. 581. New York, USA: Humana Press, pp. 145-183.
- Hatfield R., Jung H., Broderick G. & Jenkins, T. 2007.** Nutritional chemistry of forages. In: Barnes, R., Nelson, C., Moore, K. & Collins, M., eds. Forages: *The Science of Grassland Agriculture*, Volume 2. Madison, USA: American Society of Agronomy, pp. 467-485.
- Ishii T., 1997.** Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* **127**, 111-127.
- Jung H. & Casler M., 2006.** Maize Stem Tissues: Impact of Development on Cell Wall Degradability. *Crop Sci.* **46**, 1801-1809.
- Kamm B. & Kamm M., 2004.** Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 137-145.
- Lesteur M., Latrille E., Maurel V., Roger J., Gonzalez C., Junqua G. & Steyer J., 2011.** First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy. *Bioresource Technol.* **102**(3), 2280-2288.
- McKendry P., 2002.** Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technol.* **83**, 37-46.
- Nizami A.-S., Korres N. & Murphy J., 2009.** Review of the Integrated Process for the Production of Grass Biomethane. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 8496-8508.

- Spatari S., Bagley D. & MacLean H., 2010.** Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. *Bioresource Technol.* **101**, 654-667.
- Van Soest P., 1973.** Collaborative Study of Acid-Detergent Fiber and Lignin. *J. of the AOAC* **56**, 781-784.
- Vogel J., 2008.** Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 301-307.

Appendix

Table A1. Composition (mean and standard deviation of the mean) of the different investigated biomasses according to the harvest period

	Harvest period	Cellulose (kg/kg DM)	Hemicelluloses (kg/kg DM)	Lignin (kg/kg DM)	Total soluble sugars (kg/kg DM)	Starch (kg/kg DM)	Proteins (kg/kg DM)	Mineral compounds (kg/kg DM)
Miscanthus giganteus	05/10/2010	0.407 ±0.008	0.246 ±0.001	0.090 ±0.001	0.040 ±0.000	0.000	0.048 ±0.001	0.030 ±0.000
	11/01/2011	0.450 ±0.004	0.250 ±0.005	0.106 ±0.001	0.004 ±0.001	0.000	0.029 ±0.001	0.019 ±0.000
	06/04/2011	0.488 ±0.010	0.252 ±0.002	0.124 ±0.001	0.001 ±0.000	0.000	0.014 ±0.000	0.013 ±0.000
Switchgrass	10/08/2010	0.267 ±0.002	0.284 ±0.002	0.032 ±0.000	0.049 ±0.001	0.010 ±0.001	0.098 ±0.000	0.050 ±0.000
	14/09/2010	0.292 ±0.003	0.274 ±0.003	0.048 ±0.001	0.061 ±0.000	0.000	0.075 ±0.001	0.049 ±0.000
	06/10/2010	0.278 ±0.005	0.264 ±0.005	0.047 ±0.000	0.080 ±0.001	0.000	0.073 ±0.001	0.047 ±0.000
	15/03/2011	0.341 ±0.003	0.324 ±0.002	0.074 ±0.000	0.000	0.000	0.052 ±0.001	0.026 ±0.000
Fiber sorghum	30/07/2009	0.215 ±0.000	0.175 ±0.001	0.023 ±0.000	0.033 ±0.000	0.024 ±0.000	0.226 ±0.001	0.156 ±0.000
	28/08/2009	0.305 ±0.001	0.240 ±0.001	0.040 ±0.001	0.087 ±0.000	0.000	0.087 ±0.001	0.084 ±0.000
	28/09/2009	0.302 ±0.001	0.226 ±0.001	0.052 ±0.000	0.084 ±0.001	0.000	0.077 ±0.001	0.070 ±0.001
	20/10/2009	0.306 ±0.006	0.222 ±0.001	0.058 ±0.000	0.065 ±0.000	0.000	0.078 ±0.001	0.075 ±0.000
	15/03/2010	0.385 ±0.001	0.272 ±0.001	0.073 ±0.000	0.005 ±0.001	0.002 ±0.001	0.044 ±0.000	0.056 ±0.000
Fiber corn	28/07/2009	0.286 ±0.002	0.203 ±0.000	0.037 ±0.000	0.032 ±0.001	0.000	0.194 ±0.001	0.092 ±0.001
	11/08/2009	0.281 ±0.004	0.203 ±0.000	0.044 ±0.000	0.058 ±0.001	0.000	0.138 ±0.001	0.064 ±0.000
	1/09/2009	0.248 ±0.004	0.228 ±0.002	0.038 ±0.002	0.162 ±0.001	0.016 ±0.000	0.101 ±0.002	0.039 ±0.000
	5/10/2009	0.162 ±0.000	0.161 ±0.002	0.023 ±0.000	0.057 ±0.000	0.366 ±0.001	0.073 ±0.001	0.026 ±0.000
	5/03/2010	0.160 ±0.002	0.148 ±0.001	0.023 ±0.000	0.003 ±0.000	0.432 ±0.001	0.067 ±0.002	0.018 ±0.000

For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

DM: Dry matter

Table A1 (second part). Composition (mean and standard deviation of the mean) of the different investigated biomasses according to the harvest period

	Harvest period	Cellulose (kg/kg DM)	Hemicelluloses (kg/kg DM)	Lignin (kg/kg DM)	Total soluble sugars (kg/kg DM)	Starch (kg/kg DM)	Proteins (kg/kg DM)	Mineral compounds (kg/kg DM)
Spelt	26/04/2010	0.135	0.103	0.011	0.103	0.000	0.288	0.147
		±0.003	±0.000	±0.000	±0.001		±0.000	±0.000
	31/05/2010	0.240	0.179	0.026	0.071	0.000	0.184	0.104
		±0.001	±0.002	±0.000	±0.001		±0.001	±0.000
	15/06/2010	0.289	0.236	0.038	0.069	0.000	0.111	0.063
		±0.004	±0.006	±0.000	±0.001		±0.000	±0.000
Spelt straw	19/07/2010	0.289	0.214	0.050	0.057	0.133	0.058	0.040
		±0.001	±0.001	±0.000	±0.000	±0.000	±0.001	±0.001
	22/08/2010	0.389	0.262	0.088	0.000	0.012	0.036	0.052
		±0.004	±0.005	±0.000		±0.000	±0.001	±0.000
Tall fescue	04/06/2010	0.249	0.202	0.023	0.097	0.000	0.148	0.089
		±0.007	±0.002	±0.000	±0.001		±0.002	±0.000
	02/07/2010	0.273	0.232	0.036	0.157	0.000	0.065	0.060
		±0.001	±0.002	±0.001	±0.001		±0.000	±0.000
	09/08/2010	0.292	0.265	0.041	0.116	0.000	0.055	0.057
		±0.005	±0.003	±0.001	±0.001		±0.001	±0.000
Cocksfoot	04/06/2010	0.261	0.207	0.037	0.061	0.000	0.146	0.093
		±0.001	±0.003	±0.001	±0.000		±0.001	±0.001
	02/07/2010	0.277	0.242	0.037	0.090	0.000	0.079	0.076
		±0.002	±0.001	±0.000	±0.002		±0.001	±0.000
	09/08/2010	0.290	0.259	0.043	0.101	0.000	0.055	0.059
		±0.004	±0.001	±0.000	±0.001		±0.001	±0.000
Hemp	29/06/2009	0.295	0.106	0.066	0.009	0.014	0.153	0.173
		±0.000	±0.003	±0.001	±0.001	±0.000	±0.002	±0.001
	28/07/2009	0.281	0.142	0.080	0.016	0.034	0.111	0.106
		±0.006	±0.003	±0.000	±0.000	±0.002	±0.001	±0.001
	31/08/2009	0.292	0.145	0.087	0.035	0.000	0.087	0.085
		±0.002	±0.001	±0.002	±0.000		±0.001	±0.000
	22/09/2009	0.381	0.157	0.091	0.029	0.000	0.061	0.065
		±0.006	±0.003	±0.001	±0.001		±0.001	±0.000
Jerusalem artichoke	5/03/2010	0.449	0.210	0.129	0.001	0.007	0.023	0.016
		±0.004	±0.003	±0.000	±0.001	±0.001	±0.001	±0.001
	29/06/2009	0.111	0.057	0.068	0.025	0.016	0.247	0.222
		±0.000	±0.001	±0.001	±0.000	±0.000	±0.001	±0.000
	28/07/2009	0.149	0.068	0.082	0.018	0.005	0.232	0.204
		±0.001	±0.001	±0.001	±0.000	±0.002	±0.001	±0.0002
	31/08/2009	0.178	0.098	0.087	0.157	0.000	0.119	0.114
		±0.001	±0.002	±0.001	±0.001		±0.001	±0.000
Jerusalem artichoke	22/09/2009	0.268	0.139	0.088	0.100	0.000	0.081	0.113
		±0.002	±0.001	±0.001	±0.001		±0.000	±0.000
	5/03/2010	0.406	0.232	0.106	0.000	0.004	0.019	0.020
		±0.003	±0.007	±0.000		±0.001	±0.001	±0.001

For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.
DM: Dry matter

Table A2. Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses (mean and standard deviation of the mean) of the different investigated biomasses according to the harvest period

	Harvest period	Xylan (kg/kg DM)	Arabinan (kg/kg DM)	Mannan (kg/kg DM)	Galactan (kg/kg DM)	Hemicellulosic glucan (kg/kg DM)
Miscanthus	05/10/2010	0.190 ±0.001	0.0258 ±0.0002	0.0063 ±0.0001	0.0062 ±0.0006	0.0177 ±0.0003
	giganteus 11/01/2011	0.204 ±0.003	0.0236 ±0.0001	0.0063 ±0.0000	0.0055 ±0.0007	0.0102 ±0.0016
	06/04/2011	0.209 ±0.002	0.0213 ±0.0002	0.0068 ±0.0000	0.0050 ±0.0002	0.0100 ±0.0007
Switchgrass	10/08/2010	0.190 ±0.001	0.0340 ±0.0003	0.0052 ±0.0001	0.0121 ±0.0003	0.0427 ±0.0013
	14/09/2010	0.202 ±0.001	0.0344 ±0.0011	0.0033 ±0.0003	0.0107 ±0.0010	0.0233 ±0.0006
	06/10/2010	0.200 ±0.004	0.0334 ±0.0008	0.0031 ±0.0000	0.0106 ±0.0002	0.0178 ±0.0005
	15/03/2011	0.244 ±0.003	0.0331 ±0.0001	0.0083 ±0.0002	0.0145 ±0.0001	0.0242 ±0.0013
Fiber sorghum	30/07/2009	0.100 ±0.000	0.0208 ±0.0003	0.0055 ±0.0001	0.0077 ±0.0000	0.0405 ±0.0008
	28/08/2009	0.175 ±0.001	0.0252 ±0.0006	0.0072 ±0.0000	0.0058 ±0.0004	0.0271 ±0.0002
	28/09/2009	0.176 ±0.002	0.0242 ±0.0007	0.0079 ±0.0000	0.0029 ±0.0000	0.0149 ±0.0002
	20/10/2009	0.172 ±0.000	0.0253 ±0.0005	0.0079 ±0.0003	0.0032 ±0.0002	0.0135 ±0.0000
	15/03/2010	0.212 ±0.001	0.0265 ±0.0018	0.0086 ±0.0004	0.0067 ±0.0001	0.0176 ±0.0006
Fiber corn	28/07/2009	0.144 ±0.000	0.0191 ±0.0010	0.0068 ±0.0002	0.0056 ±0.0002	0.0367 ±0.0008
	11/08/2009	0.143 ±0.002	0.0191 ±0.0005	0.0063 ±0.0001	0.0064 ±0.0004	0.0272 ±0.0016
	1/09/2009	0.156 ±0.001	0.0269 ±0.0008	0.0055 ±0.0001	0.0079 ±0.0001	0.0287 ±0.0004
	5/10/2009	0.109 ±0.002	0.0236 ±0.0000	0.0037 ±0.0000	0.0059 ±0.0003	0.0311 ±0.0000
	5/03/2010	0.100 ±0.001	0.0220 ±0.0001	0.0022 ±0.0000	0.0077 ±0.0003	0.0190 ±0.0001
Spelt	26/04/2010	0.058 ±0.001	0.0175 ±0.0002	0.0021 ±0.0000	0.0103 ±0.0005	0.0158 ±0.0010
	31/05/2010	0.129 ±0.001	0.0207 ±0.0002	0.0036 ±0.0001	0.0087 ±0.0004	0.0175 ±0.0013
	15/06/2010	0.181 ±0.004	0.0255 ±0.0008	0.0041 ±0.0003	0.0083 ±0.0002	0.0168 ±0.0005
	19/07/2010	0.159 ±0.001	0.0259 ±0.0004	0.0038 ±0.0001	0.0086 ±0.0004	0.0170 ±0.0018
Spelt straw	22/08/2010	0.206 ±0.001	0.0222 ±0.0004	0.0053 ±0.0000	0.0068 ±0.0002	0.0218 ±0.0003

For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.
DM: Dry matter

Table A2 (second part). Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses (mean and standard deviation of the mean) of the different investigated biomasses according to the harvest period

	Harvest period	Xylan (kg/kg DM)	Arabinan (kg/kg DM)	Mannan (kg/kg DM)	Galactan (kg/kg DM)	Hemicellulosic glucan (kg/kg DM)
Tall fescue	04/06/2010	0.137 ±0.003	0.0261 ±0.0009	0.0051 ±0.0002	0.0087 ±0.0008	0.0249 ±0.0009
	02/07/2010	0.162 ±0.001	0.0300 ±0.0005	0.0050 ±0.0001	0.0110 ±0.0002	0.0237 ±0.0004
	09/08/2010	0.181 ±0.003	0.0364 ±0.0010	0.0053 ±0.0002	0.0167 ±0.0006	0.0256 ±0.0017
Cocksfoot	04/06/2010	0.134 ±0.002	0.0273 ±0.0000	0.0046 ±0.0001	0.0122 ±0.0002	0.0287 ±0.0007
	02/07/2010	0.144 ±0.001	0.0376 ±0.0003	0.0045 ±0.0000	0.0185 ±0.0005	0.0378 ±0.0009
	09/08/2010	0.154 ±0.002	0.0428 ±0.0000	0.0052 ±0.0005	0.0223 ±0.0007	0.0354 ±0.0005
Hemp	29/06/2009	0.063 ±0.001	0.0036 ±0.0000	0.0155 ±0.0001	0.0094 ±0.0012	0.0139 ±0.0005
	28/07/2009	0.081 ±0.000	0.0035 ±0.0001	0.0159 ±0.0000	0.0151 ±0.0020	0.0265 ±0.0012
	31/08/2009	0.091 ±0.000	0.0039 ±0.0002	0.0136 ±0.0004	0.0160 ±0.0013	0.0206 ±0.0001
	22/09/2009	0.102 ±0.001	0.0036 ±0.0000	0.0177 ±0.0002	0.0202 ±0.0015	0.0131 ±0.0015
	5/03/2010	0.147 ±0.001	0.0025 ±0.0002	0.0183 ±0.0006	0.0192 ±0.0027	0.0232 ±0.0012
Jerusalem artichoke	29/06/2009	0.026 ±0.000	0.0029 ±0.0001	0.0086 ±0.0002	0.0091 ±0.0009	0.0108 ±0.0003
	28/07/2009	0.038 ±0.000	0.0038 ±0.0003	0.0095 ±0.0003	0.0074 ±0.0010	0.0095 ±0.0012
	31/08/2009	0.062 ±0.001	0.0036 ±0.0001	0.0095 ±0.0001	0.0106 ±0.0009	0.0119 ±0.0003
	22/09/2009	0.089 ±0.001	0.0038 ±0.0001	0.0122 ±0.0003	0.0186 ±0.0008	0.0154 ±0.0015
	5/03/2010	0.164 ±0.001	0.0039 ±0.0000	0.0163 ±0.0003	0.0232 ±0.0008	0.0244 ±0.0015

For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

DM: Dry matter

Table A3. Enzymatically DOM, potential bioethanol and higher heating value (mean and standard deviation of the mean) of the different investigated biomasses according to the harvest period

	Harvest period	Enzymatically DOM (kg DOM/kg dry organic matter)	Liters of ethanol per kg DM	Higher heating value (MJ/kg DM)
Miscanthus giganteus	05/10/2010	0.283±0.001	0.395±0.004	19.3±0.0
	11/01/2011	0.200±0.001	0.400±0.001	19.5±0.0
	06/04/2011	0.118±0.001	0.423±0.003	19.7±0.0
Switchgrass	10/08/2010	0.561±0.001	0.341±0.003	19.1±0.0
	14/09/2010	0.523±0.003	0.352±0.001	19.0±0.0
	06/10/2010	0.512±0.004	0.350±0.003	19.0±0.0
	15/03/2011	0.285±0.003	0.370±0.000	19.2±0.0
Fiber sorghum	30/07/2009	0.783±0.003	0.254±0.000	17.3±0.0
	28/08/2009	0.513±0.000	0.358±0.000	18.1±0.0
	28/09/2009	0.458±0.000	0.347±0.003	18.4±0.0
	20/10/2009	0.416±0.003	0.336±0.000	18.4±0.0
	15/03/2010	0.232±0.002	0.375±0.002	18.8±0.0
Fiber corn	28/07/2009	0.755±0.000	0.295±0.001	18.6±0.0
	11/08/2009	0.645±0.001	0.308±0.003	18.9±0.0
	1/09/2009	0.650±0.003	0.372±0.001	18.7±0.0
	5/10/2009	0.756±0.002	0.446±0.018	18.8±0.0
	5/03/2010	0.783±0.006	0.448±0.008	18.8±0.0
Spelt	26/04/2010	0.866±0.004	0.195±0.000	18.6±0.0
	31/05/2010	0.685±0.003	0.278±0.001	18.6±0.0
	15/06/2010	0.543±0.000	0.335±0.002	18.3±0.1
	19/07/2010	0.202±0.007	0.389±0.002	18.8±0.0
Spelt straw	22/08/2010	0.108±0.003	0.376±0.001	18.9±0.0
Tall fescue	04/06/2010	0.730±0.003	0.311±0.001	18.45±0.0
	02/07/2010	0.615±0.002	0.376±0.002	18.65±0.0
	09/08/2010	0.545±0.000	0.380±0.003	18.55±0.0
Cocksfoot	04/06/2010	0.730±0.003	0.299±0.000	18.58±0.0
	02/07/2010	0.657±0.002	0.344±0.005	18.65±0.0
	09/08/2010	0.590±0.001	0.366±0.002	18.65±0.0

For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

DM: Dry matter ; DOM: Digestible organic matter

Table A3 (second part). Enzymatically DOM, potential bioethanol and higher heating value (mean and standard deviation of the mean) of the different investigated biomasses according to the harvest period

	Harvest period	Enzymatically DOM (kg DOM/kg dry organic matter)	Liters of ethanol per kg DM	Higher heating value (MJ/kg DM)
Hemp	29/06/2009	0.608±0.013	0.245±0.001	16.8±0.0
	28/07/2009	0.521±0.000	0.272±0.009	18.0±0.0
	31/08/2009	0.458±0.000	0.270±0.003	19.0±0.0
	22/09/2009	0.366±0.003	0.324±0.007	18.8±0.0
	5/03/2010	0.142±0.007	0.381±0.006	19.5±0.0
Jerusalem artichoke	29/06/2009	0.697±0.005	0.120±0.000	16.1±0.0
	28/07/2009	0.643±0.001	0.137±0.003	16.7±0.0
	31/08/2009	0.653±0.005	0.249±0.005	17.6±0.0
	22/09/2009	0.471±0.006	0.291±0.003	17.8±0.0
	5/03/2010	0.177±0.006	0.364±0.002	19.2±0.0

For the last harvest period of spelt, only the straw part was considered.

DM: Dry matter ; DOM: Digestible organic matter

Partie 3

Chapitre 9

Composition chimique et potentiel énergétique d'une grande diversité de biomasses végétales

Adapté de la publication :

Godin B., Lamaudière S., Agneessens R., , Schmit T., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. & Delcarte J., 2013. Chemical composition and biofuels potentials of a wide diversity of vegetal biomasses. *Energy and Fuels*, Soumis.

Nous avons acquis les connaissances de la composition chimique (y compris l'analyse en monosaccharides dans les hémicelluloses) et les aptitudes aux conversions énergétiques d'une grande diversité phylogénétique de biomasses végétales à maturités. Il est nécessaire d'élargir nos connaissances à l'ensemble des biomasses végétales de façon à pouvoir les classer par catégorie correspondant chacune à des filières de valorisation énergétique qui leur conviennent le plus.

La détermination de la composition chimique de ces biomasses d'origines phylogénétiques variées a montré que chacune d'entre elles possède une composition distincte. Néanmoins, une analyse en composantes principales, appliquée à l'ensemble des compositions chimiques des biomasses étudiées, nous a permis de mettre en évidence que les biomasses végétales peuvent se structurer en groupes présentant des propriétés chimiques similaires. Ces groupes sont liés à leur origine phylogénétique (commélinoïde, magnoliophyte non-commélinoïde et gymnosperme) et à leur teneur en fibres (niveau bas et haut). Le classement de biomasses végétales permet de simplifier l'orientation de celles-ci vers les filières de conversion énergétique adéquates. Nous avons également évalué les aptitudes aux conversions énergétiques des groupes de biomasses. Nous observons que l'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse (MODE, c'est-à-dire la matière organique digestible enzymatiquement sans prétraitement) et le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux (dont la transformation en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse) et non-structuraux des biomasses s'étendent sur des gammes étendues et dépendent fortement de la composition chimique. L'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse diminue avec l'augmentation des constituants les moins digestibles, à savoir : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. En général, le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux dépend principalement des teneurs en cellulose et en hémicelluloses, excepté pour les biomasses non-commélinoïdes riches en sucres solubles et commélinoïdes riches en amidon. Par contre, l'indicateur du potentiel d'une biomasse en combustion après sa déshydratation (le PCS) est peu variable avec la biomasse et ne dépend que de la teneur en matière organique. Il augmente avec la teneur en matière organique (qui est le complément des substances minérales).

Keywords. Vegetal biomasses, Carbohydrates, Hemicelluloses, Analysis, Biofuel

1. Introduction

To reduce simultaneously human induced global warming and the depletion of fossil fuel resources, alternative production chains are necessary (EU, 2003). One of the promising sources of renewable and sustainable energy are vegetal biomasses (McKendry, 2002). Cellulose (linear homogeneous structural polysaccharide composed of D-glucose units), hemicelluloses (ramified heterogeneous structural polysaccharides composed of D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose and D-glucose units), lignin (phenyl propanoid polymer composed of syringyl, guaiacyl and p-hydroxyphenyl units), pectins (ramified heterogeneous structural polysaccharides mainly composed of D-galacturonic acid units), soluble sugars (D-glucose, D-fructose, sucrose and fructans), starch, proteins and mineral compounds are the main chemical components of vegetal biomasses (Carpita et al., 2000). These components (except mineral compounds) represent the pool of organic carbon coming from the photosynthetically collected and stored solar energy (Chandel et al., 2010). They represent a huge amount of renewable resource for a sustainable bio-based economy. The optimal valorization of these biomass components, for green chemistry and/or for biofuel production, requires a good knowledge of the contents and molecular composition of their components (McKendry, 2002 ; Kamm et al., 2004). The content of the main chemical components depends on the plant species (Pauly et al., 2008 ; Saidur et al., 2011). The contents of structural components depend on the degree of lignification of the cell wall. Stems are richer in secondary walls (which have high cellulose content) and highly lignified primary cell walls, as compared to leaves (Carpita et al., 2000). In the case of hemicelluloses, the content of their monosaccharidic components (D-xylose, L-arabinose, D-mannose, D-galactose and D-glucose) depends on the phylogenetic origins of the plant species. The hemicelluloses of commelinid biomasses have higher contents of xylan and arabinan, associated as arabinoxylan, and β -glucan (Carpita et al., 2000). The hemicelluloses of non-commelinid magnoliophyta biomasses have higher contents of hemicellulosic glucan, in the form of xyloglucan, and mannan (Carpita et al., 2000). The hemicelluloses of pinophyta biomasses have a higher content of

mannan (Carpita et al., 2000). Primary cell walls have higher contents of xyloglucan, β -glucan and mannan, as compared to secondary cell wall that have a higher content of arabinoxylan (Ishii, 1997 ; Carpita et al., 2000 ; Vogel, 2008).

Whole plants biomasses can be used to produce bioenergy (thermal, electrical and mechanical energy) by converting their main chemical components into biofuel (solid, liquid or gaseous) (Ghysel et al., 2010 ; Bessou et al., 2011). Depending on its composition, each type of biomass can be better suited to specific types of conversion processes. In order to rapidly compare the energy value of biomasses and their suitability for conversion processes, we selected 3 properties, in addition to the chemical composition, i) the higher heating values (HHV), as an assessment for conversion by combustion (McKendry, 2002), ii) the bioethanol potential, as calculated by the methodology of Spatari et al. (2010), iii) the enzymatic digestibility (biomethanation) by the methodology of De Boever et al. (1986), as fast assessment of the anaerobic digestibility without any pretreatment.

The present study summarizes the main chemical components (cellulose, hemicelluloses, lignin, total soluble sugars, starch, proteins, mineral compounds), the composition of hemicelluloses (xylan, arabinan, mannan, galactan, hemicellulosic glucan), the enzymatically digestible organic matter (DOM), the bioethanol and the thermal energy potential for a wide diversity of plant biomasses. The chemical components enabled to classify the analyzed biomasses into different groups. The investigated properties were also correlated to the biomass chemical composition.

2. Material and methods

2.1. Biomass material

Miscanthus giganteus (*Miscanthus x giganteus* J.M. Greef & Deuter ex Hodk. & Renvoize ; cultivars: Bical and Tournai ; Late winter and early autumn harvest), switchgrass (*Panicum virgatum* L. ; cultivars: Alamo, Blackwell, Cave-in-Rock, Dacotah, Kanlow, Nebraska 28, Shelter and Traiblazer ; Late winter and early autumn harvest), fiber sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench ; cultivars: CA25, ENR10, H133, Maja and Zerberus ; Late winter and early autumn harvest), spelt

straw (*Triticum aestivum* L. ssp. *spelta* (L.) Thell. ; cultivars: Badengold and Cosmos ; Late summer harvest), “cocksfoot-alfalfa” mixture (*Dactylis glomerata* L. cultivar Terrano - *Medicago sativa* L. cultivar Europe ; 3 harvest cycles late spring-late summer-late autumn), tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb. ; cultivars: Hykor, Jordane, Kora, Perun and Soni ; 3 harvest cycles late spring-late summer-late autumn), immature rye (*Secale cereale* L. ; cultivars: Protector and Vitalio ; Early spring harvest), fiber corn (*Zea mays* L. ; cultivars: Aayrton, Atlético, Aventura, Beethoven, Cannavaro, Coryphée, Dominator, Franky, Ladifférence, LG Azelo, Olympus, Ricardinio and Ronaldinio ; Late winter and early autumn harvest), hemp (*Cannabis sativa* L. ; cultivars: Epsilon 68, Fedora 17 and Futura 75 ; Early autumn harvest) and jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L. ; cultivar: Volkenroder spindel ; leaf & stalk ; Early autumn harvest) samples came from randomized blocks designed crop trials performed in 2007, 2008, 2009 and/or 2010 at Libramont (498 m above sea level (asl) ; average annual temperature: 8.6°C ; average annual precipitation: 1260 mm ; 49°55'N, 05°24'E ; Belgium), Gembloux (161 m asl ; average annual temperature: 9.8°C ; average annual precipitation: 856 mm ; 50°33'N, 04°43'E), Tinlot (255 m asl ; average annual temperature: 9.7°C ; average annual precipitation: 871 mm ; 50°28'N, 05°23'E ; Belgium), Mötsch (330 m asl ; average annual temperature: 8.4°C ; average annual precipitation: 675 mm ; 49°57'N, 06°33'E ; Germany) or Gerbéviller (260 m asl ; average annual temperature: 9.9°C ; average annual precipitation: 1022 mm ; 48°29'N, 06°31'E ; France). For each biomass sample, a plot between 9 and 24 m² of the whole above ground biomass was harvested and chopped at 10 cm from the ground with a Haldrup M-65 harvester.

Reed (*Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud ; cultivar: Humilis ; Late winter harvest), bamboo (*Phyllostachis vivax* Siebold & Zucc ; Late winter harvest), leaf and bulb of onion (*Allium cepa* L. ; cultivar: Sonia ; Early autumn harvest), yucca leaf (*Yucca gloriosa* L. ; cultivar: Variegata ; Late summer harvest), tulip tree wood (*Liriodendron tulipifera* L.), sugar beet leaf & stalk (*Beta vulgaris* L. ; cultivar: Angelica, Bernadetta, Mangelan and Rubens ; Early autumn harvest), amaranth leaf & stalk (*Amaranthus viridis* L. ; cultivar: Amar ; Early autumn harvest), japanese knotweed (*Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr. ; Early autumn harvest), cabbage leaf (*Brassica oleracea* L. ; cultivar: Botrytis ; Early autumn

harvest), rapeseed straw (*Brassica napus* L. ; cultivar: Aurum ; Late summer harvest), pumpkin leaf & stalk (*Cucurbita maxima* Duchesne ; cultivar: Tromba ; Early autumn harvest), bean leaf & stalk (*Phaseolus vulgaris* L. ; cultivar: Goliath ; Early autumn harvest), alfalfa leaf & stalk (*Medicago sativa* L. ; cultivar: Astra ; Late spring harvest), lupine leaf & stalk (*Lupinus albus* L. ; cultivar: Fortuna ; Late summer harvest), flax straw (*Linum usitatissimum* L. ; cultivar: Linus ; Late summer harvest), nettle (*Urtica dioica* L. ; Early autumn harvest), bramble leaf & stalk (*Rubus fruticosus* L. ; Late summer harvest), comfrey leaf & stalk (*Symphytum officinale* L. ; cultivar: De russi ; Late spring harvest), tomato leaf & stalk (*Solanum lycopersicum* L. ; cultivar: Campbell 33 ; Late summer harvest), potato leaf & stalk (*Solanum tuberosum* L. ; cultivar: Desiree, Kenebec and Nicolas ; Late summer harvest), jerusalem artichoke tuber (*Helianthus tuberosus* L. ; cultivar: Volkenroder spindel ; Winter harvest), sunflower leaf & stalk (*Helianthus annuus* L. ; cultivar: Giant Russian ; Early autumn harvest), tagetes (*Tagetes patula* L. ; cultivar: Nugget ; Early autumn harvest), green (Early autumn harvest) and white leaf of chicory (*Cichorium intybus* L.), unforced (Early autumn harvest) and forced root of chicory (*Cichorium intybus* L.), oak wood (*Quercus* sp.), beech wood (*Fagus sylvatica* L.), willow wood (*Salix* sp. ; Late winter harvest ; 3 years old), aspen wood (*Populus* sp.), spruce wood (*Picea abies* (L.) Karst.), pine wood (*Pinus* sp.), larch wood (*Larix decidua* Mill.), maidenhair tree wood (*Ginkgo biloba* L.), fern (*Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn ; Late spring harvest), horsetail (*Equisetum* sp. ; Late spring harvest) and moss (*Bryum* sp. ; Late spring harvest) samples were harvested manually in 2010 and 2011 in Wallonia (Belgium).

After the harvest, two representative subsamples of 750 g of the whole of each biomass were directly dried at 60°C for 72 h in a Memmert UFP800 oven (VWR, Heverlee, Belgium). After drying, the two subsamples were first milled with a 4 mm screen hammer mill (BOA, Waterleau, Herent, Belgium) followed by a second milling step with a 1 mm screen cyclone mill (Cyclotec, FOSS Benelux N.V., Bruxelles, Belgium). The samples were stored in airtight bags at room temperature and protected from light in a dark box.

2.2. Chemical analyses

All chemicals were of analytical grade or equivalent and were purchased from VWR (Heverlee, Belgium) and Chem-Lab (Zeldelgem, Belgium). Duplicate aliquots were measured and results expressed in kg per kg of DM (103°C dried matter).

The xylan, arabinan, mannan, galactan and the total glucan content were determined by a sulfuric acid hydrolysis method (SAH) after fractionation (Godin et al., 2011). The hemicellulosic glucan content was determined by the SAH method except that the cellulose solubilization step (incubation with H₂SO₄ 72% w/w for 1 h at 30°C) was skipped. The cellulosic glucan content is calculated as the difference between the total glucan and the hemicellulosic glucan content. The acid detergent lignin (ADL: weight of the acid detergent fiber residue) was determined by the Van Soest (VS) gravimetric method (Van Soest et al., 1973). The total soluble sugars were determined by the Luff-Schoorl method (European Union, 2009). The starch content was determined by the Ewers method (European Union, 2009). The protein content was determined by the Kjeldahl method using 6.25 as conversion factor of nitrogen to protein (AOAC, 1990). The mineral content was determined by use of a muffle furnace set at 550°C for 3h. The dry matter (DM) content was determined at 103°C for 4h.

2.3. Biofuel potentials

The enzymatically DOM of the biomass, as determined by the De Boever method (De Boever et al., 1986), was used to compare the suitability of the different biomasses to be converted by anaerobic digestion without any pretreatment. We can consider that the enzymatically DOM corresponds to the minimum level of anaerobic digestion without any pretreatment of the biomass because this biological conversion digest at least as much as the enzymes used in the method used to quantify the enzymatically DOM. Briefly, biomass samples were incubated, in chronologic order, with pepsin in 0.1 N HCl for 24 h at 40°C, with 0.1 N HCl for 45 min at 80°C and with cellulase in an acetate buffer at pH 4.8 for 24 h at 40°C. The bioethanol potential was assessed by following the methodology of (Spatari et al., 2010), on the basis of i) the monomers expected from the hydrolysis yields of

cellulose, hemicelluloses (hydrolysis yields of respectively 91% and 81% with a liquid hot water pretreatment (da Costa Sousa et al., 2009)) and starch (hydrolysis yield of 96% (Buchholz et al., 2008)); ii) the stoichiometric ethanol fermentation yields of monosaccharides (92.5% for glucose and fructose, and 86% for xylose, arabinose, galactose and mannose (Hamelinck et al., 2005)) and iii) the ethanol recovery yield (99.5% (Spatari et al., 2010)). The bioethanol potential was calculated as the ethanol that can be expected from fermentation of the directly available soluble sugars and starch, and also from cellulose and hemicelluloses after hydrolysis and conversion. The thermal energy was assessed on the basis of the higher heating value (HHV). The HHV was determined by the method using a Parr controlled oxygen bomb calorimeter (European Committee for Standardization, 2005).

2.4. Statistical analysis

The principal component analysis and the correlation analysis were performed using JMP 7.0.1 (SAS Institute, USA). The starch content was not included because only few biomasses contained starch. The principal component analysis consists in a variance analysis determining the main axis of orthogonal variation by a transformation of the initial matrix in three different matrices:

- Matrix of scores
- Matrix of loadings
- Matrix of residues

The score plot is a plan of sample distribution according to their scores in the projection over the axis of the principal components.

3. Results and discussion

We analyzed biomasses of various phylogenetic origins, as shown in Figure 1.

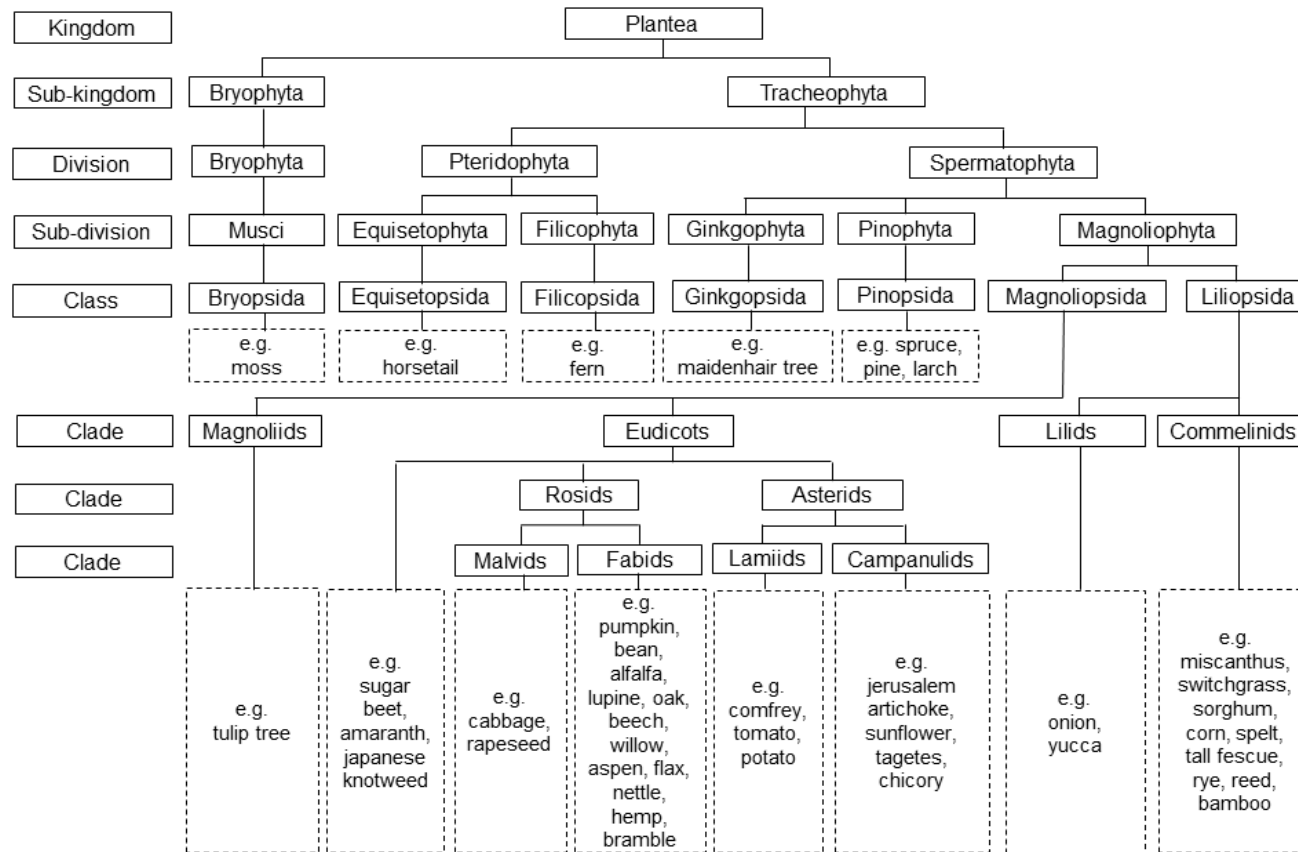


Figure 1. Phylogenetic origins of the various analyzed biomasses

3.1. Biomass chemical composition

The chemical composition of the analyzed biomasses is shown in Figure 2. It is also shown in Table A1 of the appendix. A wide range of values is observed for each main chemical component (Figure 2). Late winter miscanthus, beech wood and aspen wood are the biomasses with the highest content of structural polysaccharides (cellulose and hemicelloses). Pinophyta biomasses have the highest content of lignin. The highest contents of soluble sugars (soluble monosaccharides, sucrose and fructans), proteins and mineral compounds are observed in onion bulb, tomato leaf & stalk and moss, respectively.

A principal component analysis was performed on the chemical composition (except starch). Figure 3 plots the scores of the first and third principal components. Based on the chemical composition (Figure 2) and the principal components analysis (Figure 3), 6 types of biomass profiles are observed:

- Upper right side of the score plot of Figure 3 (Left side), commelinid fibrous biomasses (reed, bamboo, miscanthus, switchgrass, spelt straw) that have high contents of cellulose and hemicelluloses, an intermediate content of lignin, and low contents of non-structural carbohydrates, proteins and mineral compounds ;
- Center and upper left side of the score plot of Figure 3 (Left side), commelinid less fibrous biomasses (fiber sorghum, “cocksfoot alfalfa” mixture (mean of 3 harvest cycles), tall fescue (mean of 3 harvest cycles), immature rye, fiber corn) that have intermediate contents of cellulose, hemicelluloses, lignin, total soluble sugars, proteins and mineral compounds ;
- Lower center side of the score plot of Figure 3 (Left side), non-commelinid fibrous magnoliophyta biomasses (tulip tree wood, japanese knotweed, rapeseed straw, oak wood, beech wood, willow wood, aspen wood, flax straw, hemp, bramble leaf & stalk, tagetes, jerusalem artichoke leaf & stalk, sunflower leaf & stalk) that have a high content of lignin, intermediate contents of cellulose, hemicelluloses, total soluble sugars, proteins and mineral compounds. The woody non-commelinid fibrous magnoliophyta biomasses are the species that are situated on the score plot of Figure 3 (Left side) near miscanthus, a commelinid fibrous biomass ;

- Left side of the score plot of Figure 3 (Left side), non-commelinid less fibrous magnoliophyta biomasses (sugar beet leaf & stalk, amaranth, cabbage leaf, pumpkin leaf & stalk, bean leaf & stalk, alfalfa leaf & stalk, lupine leaf & stalk, nettle, comfrey leaf & stalk, tomato leaf & stalk, potato leaf & stalk, chicory green leaf) that have high contents of proteins and mineral compounds, an intermediate content of total soluble sugars, and low contents of cellulose, hemicelluloses and lignin ;
- Bottom left side of the score plot of Figure 3 (Left side), non-commelinid high total soluble sugars magnoliophyta biomasses (chicory white leaf, unforced and forced tuber of chicory, jerusalem artichoke tuber, leaf and bulb of onion leaf, yucca leaf) that have a high content of total soluble sugars, intermediate contents of proteins and mineral compounds, and low contents of cellulose, hemicelluloses and lignin ;
- Bottom right side of the score plot of Figure 3 (Left side), pinophyta biomasses (spruce wood, pine wood, larch wood) that have high contents of cellulose, hemicelluloses and lignin, and low contents of non-structural carbohydrates, proteins and mineral compounds.

The chemical composition profile of maidenhair tree wood, fern, horsetail and moss are, respectively, near to those of pinophyta, non-commelinid fibrous magnoliophyta, non-commelinid less fibrous magnoliophyta and commelinid less fibrous biomasses. The three non spermatophyta biomasses seem to have their own chemical composition profile. This can be explained by the fact that these plants are not magnoliophyta biomasses.

The first and third principal components represent 59.5 and 11.8 % of the total variability, respectively (Table 1). Thus, these two components explain 71.3% of the total variability of the sample composition. The cleavage is mainly explained by the eigenvector of the first principal component (Table 1) which shows i) high positive correlations among the contents of structural components (cellulose, hemicelluloses and lignin) on the one hand, and among the contents of non-structural components (total soluble sugars, proteins and mineral compounds), on the other hand, ii) high negative correlations among the contents of structural components and non-structural components. These correlations can be explained by the fact that biomasses with higher contents of structural components are mainly made of stems

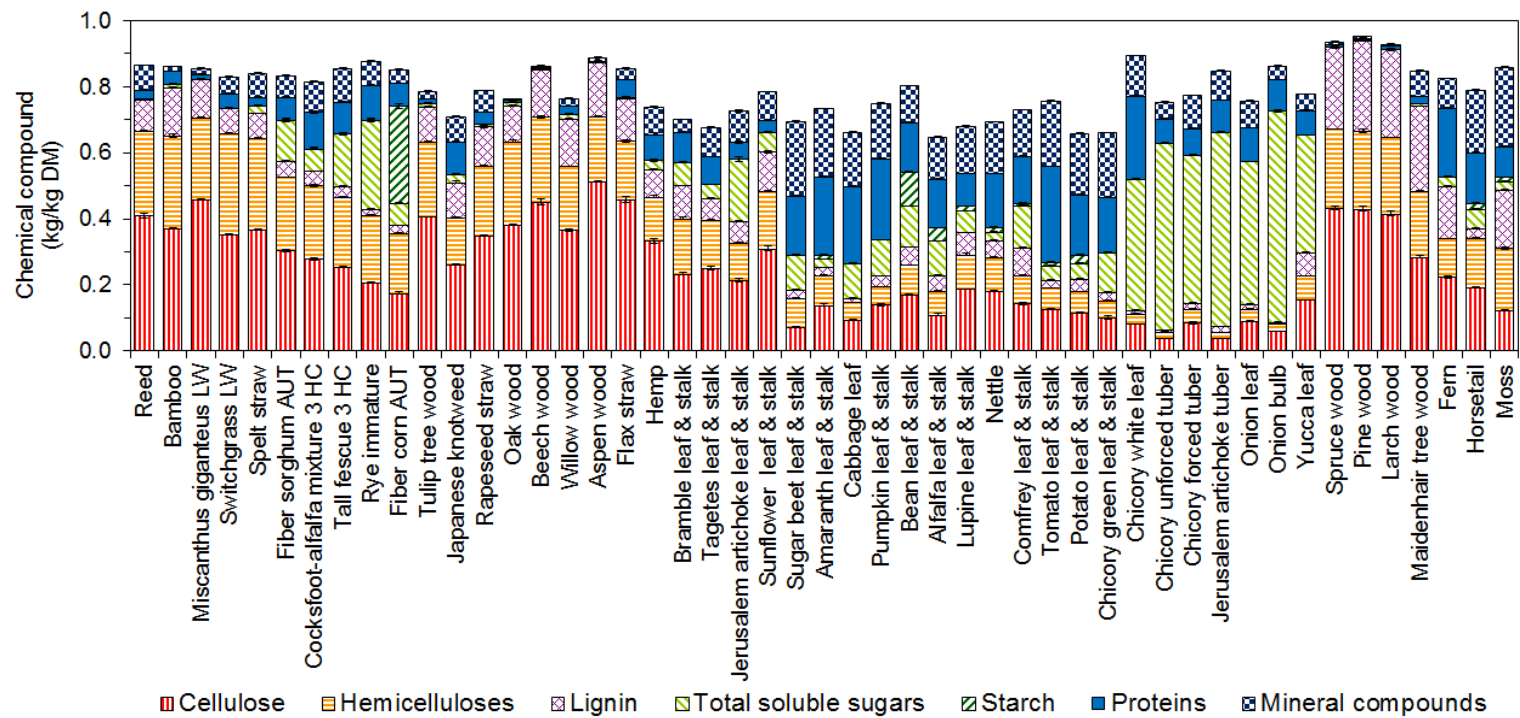
(rich in secondary cell walls) with more lignified cell walls whereas biomasses with higher contents of non-structural components are also made of an important part of leaves with less lignified cell walls and cytoplasm-rich metabolically active cells.

The cleavage between the defined groups is also explained by the eigenvector of the third principal component (Table 1) which has a very high positive correlation with the total content of hemicelluloses. This can be explained by the botanical difference of the cell wall components of commelinid and non-commelinid magnoliophyta biomasses. Commelinid biomasses are known to have a higher content of hemicelluloses and a lower content of pectin, as compared to non-commelinid magnoliophyta biomasses (Carpita et al., 2000 ; Godin et al., 2011).

The second and fourth principal components are also important components because of their relative eigenvalue percentage (Table 1). Their eigenvectors correlate mostly with mineral compounds and total soluble sugars, respectively. This means that these two chemical components are also important discrimination parameters for the investigated biomasses.

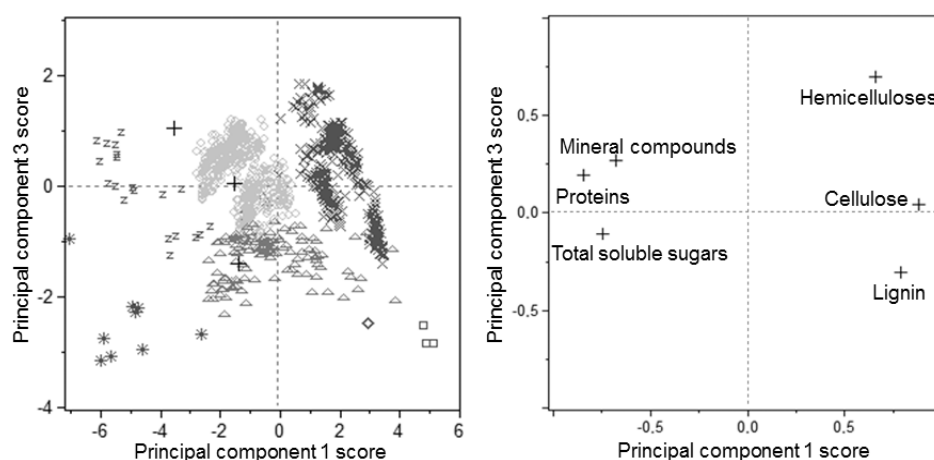
The significant negative or positive correlations between the contents of chemical components shown by the eigenvector of the first principal component (Table 1) are confirmed by the results of the correlation analysis of commelinid biomasses (Table 2) and of non-commelinid magnoliophyta biomasses (Table 2).

Figure 2 shows a 0.10-0.30 kg/kg_{DM} non-identified fraction in all biomasses. Soluble polysaccharides (such as pectins), acid soluble lignin, organic acids, alcohols, pigments and lipids compose most probably the non-identified fraction, as also suggested by Hames (2009) for other biomasses. Less fibrous biomasses have a higher non-identified fraction compared to the other biomasses. This can be explained by the higher pectin content and the lower hemicelluloses content in less fibrous biomasses, as compared to fibrous biomasses. The latter are indeed mainly made of stems rich in secondary cell walls, whereas less fibrous biomasses have also an important part of leaves (Carpita et al., 2000).



3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DM: Dry matter ; LW: Late winter

Figure 2. Chemical composition of the various analyzed biomasses. Error bars correspond to standard deviation of the mean.



Left: Score plot along the first and the third principal component score of the analyzed biomasses ; Right: Score plot along the first and the third principal component score of the main chemical components ; x, commelinid fibrous biomass ; o, commelinid less fibrous biomass ; Δ, non-commelinid fibrous magnoliophyta biomass ; z, non-commelinid less fibrous magnoliophyta biomass ; *, non-commelinid high total soluble sugars magnoliophyta biomass ; □, pinophyta biomass ; ◇, ginkgophyta biomass ; +, non-spermatophyta biomass.

Figure 3. Principal component analysis of the main chemical components of the various analyzed biomasses

Table 1. Relative percentage of the explained variance and loading vector of the principal component analysis of the main chemical components

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6
<i>Relative percentage of the explained variance</i>	59.5	14.5	11.8	8.1	3.9	2.2
<i>Loading vector</i>						
Cellulose	0.471	0.265	0.049	0.361	0.259	-0.713
Hemicelluloses	0.352	-0.208	0.835	0.162	0.078	0.322
Lignin	0.421	0.466	-0.363	0.239	0.191	0.617
Total soluble sugars	-0.392	-0.346	-0.128	0.821	0.173	0.082
Proteins	-0.445	0.333	0.228	-0.202	0.774	0.024
Mineral compounds	-0.356	0.662	0.317	0.269	-0.512	-0.016

PC: Principal component

Table 2. Correlations between the contents of the main chemical components of the commelinid (n=873) and of the non-commelinid magnoliophyta biomasses (n=179)

	Cel.	Hem.	Lignin	Total soluble sugars	Proteins	Mineral compounds
<i>Commelinid magnoliophyta</i>						
Cel.	/					
Hem.	0.66***	/				
Lignin	0.95***	0.63***	/			
Total soluble sugars	-0.57***	-0.51***	-0.67***	/		
Proteins	-0.69***	-0.50***	-0.77***	0.68***	/	
Mineral compounds	-0.31***	-0.11***	-0.48***	0.50***	0.66***	/
<i>Non-commelinid magnoliophyta</i>						
Cel.	/					
Hem.	0.80***	/				
Lignin	0.80***	0.83***	/			
Total soluble sugars	-0.64***	-0.60***	-0.64***	/		
Proteins	-0.52***	-0.50***	-0.49***	-0.04	/	
Mineral compounds	-0.62***	-0.49***	-0.60***	0.04	0.72***	/

*** p<0.001

Cel.: Cellulose ; Hem.: Hemicelluloses

3.2. Monosaccharidic composition of hemicelluloses

Figure 4 presents the composition of the hemicelluloses (details in Table A2 of the appendix). A wide range of values is observed for the absolute and relative contents hemicellulosic components (Figure 4 top and bottom, respectively). Commelinoid and non-commelinid fibrous magnoliophyta biomasses have the highest absolute content of hemicelluloses. Xylan is generally the major absolute and relative hemicellulosic component, except in the following biomasses:

- Sugar beet leaf & stalk, where arabinan is the highest absolute and relative component of hemicelluloses ;
- High total soluble sugars biomasses (leaf and bulb of onion, yucca leaf, jerusalem artichoke tuber, chicory white leaf, unforced and forced tuber of chicory), where the galactan and the arabinan are also high relative components of hemicelluloses ;

- Less evolved species, pinophyta (spruce wood, pine wood, larch wood) and non-spermatophyta (maidenhair tree wood, fern horsetail, moss) biomasses, where mannan is also a high absolute and relative component of hemicelluloses.

A principal component analysis was performed on the relative content of hemicellulosic components. Figure 5 plots the scores of the first and second principal components, which help to distinguish 3 types of biomass profiles:

- Upper left center side of the score plot of Figure 5 (Left side), commelinid biomasses (reed, bamboo, miscanthus, switchgrass, fiber sorghum, fiber corn, spelt straw, tall fescue, “cocksfoot-alfalfa” mixture, immature rye), where the major relative hemicellulosic components are generally, by order of decreasing importance, xylan, arabinan, hemicellulosic glucan, galactan and mannan. Commelinid monocotyledons are known to have higher contents of arabinoxylan and β -glucan compared to non-commelinid magnoliophyta biomasses (Carpita et al., 2000) ;
- Lower right center and right side of the score plot of Figure 5 (Left side) gathers non-commelinid magnoliophyta biomasses, either fibrous (tulip tree wood, japanese knotweed, rapeseed straw, oak wood, beech wood, willow wood, aspen wood, flax straw, hemp, bramble leaf & stalk, tagetes, jerusalem artichoke leaf & stalk, sunflower leaf & stalk), less fibrous (sugar beet leaf & stalk, amaranth, cabbage leaf, pumpkin leaf & stalk, bean leaf & stalk, alfalfa leaf & stalk, lupine leaf & stalk, nettle, comfrey leaf & stalk, tomato leaf & stalk, potato leaf & stalk, chicory green leaf), or with high total soluble sugars (chicory white leaf, unforced and forced tuber of chicory, jerusalem artichoke tuber, leaf and bulb of onion leaf, yucca leaf). In these biomasses, the relative xylan content of hemicelluloses is generally lower and the relative contents of hemicellulosic glucan, galactan and mannan are generally higher, as compared to commelinid biomasses. Non-commelinid magnoliophyta are known to have hemicelluloses with higher contents of xyloglucan and mannan compared to commelinid biomasses (Carpita et al., 2000). In Figure 5, the non-commelinid magnoliophyta group tends to be subdivided according to the chemical composition in the 3 following subgroups: non-commelinid fibrous magnoliophyta, non-commelinid less fibrous magnoliophyta and non-commelinid high total soluble sugars magnoliophyta. This subdivision corresponds to the increasing relative contents

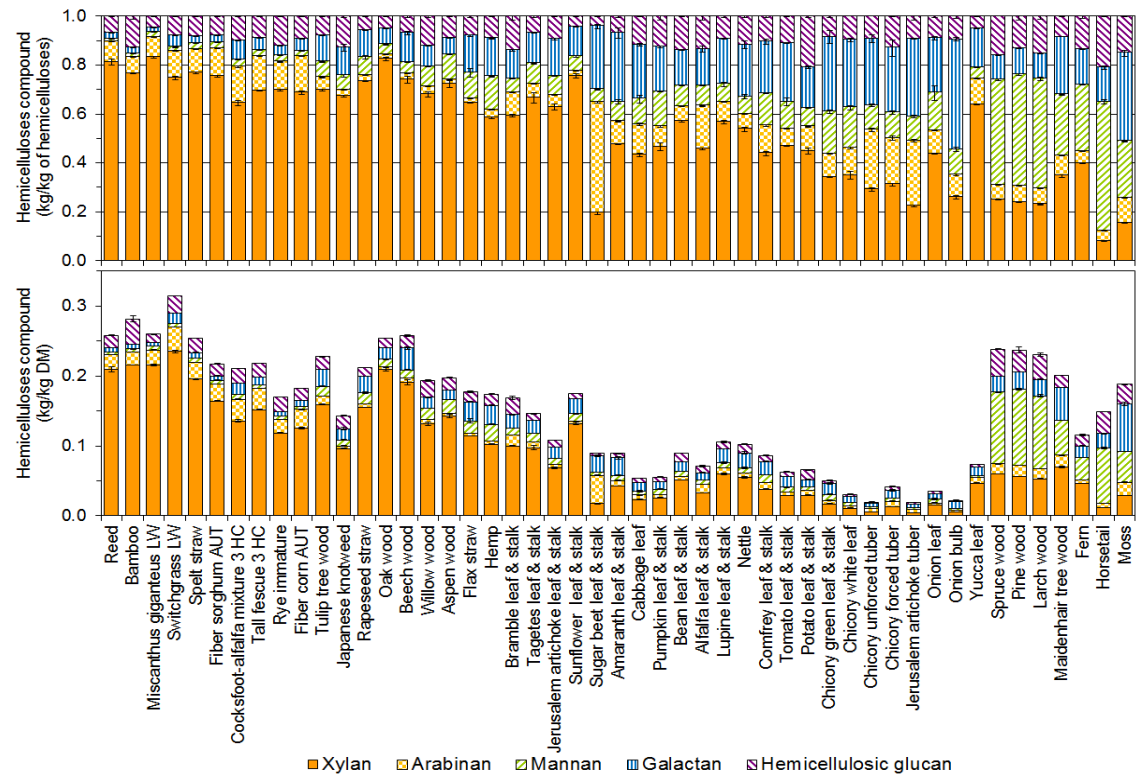
of arabinan and galactan. Sugar beets leaf & stalk are the biomasses that are at the right top part of the score plot of Figure 5 (Left side) because of their very high relative content of arabinan ;

- Bottom right side of the score plot of Figure 5 (Left side), pinophyta (spruce wood, pine wood, larch wood), ginkgophyta (maidenhair tree wood) and non-spermatophyta biomasses (fern, horsetail, moss), where the relative xylan and mannan components of hemicelluloses are, respectively, low and high compared to the magnoliophyta biomasses. Pinophyta biomasses are known to have hemicelluloses with a higher content of mannan compared to magnoliophyta biomasses (Carpita et al., 2000). Fern is the biomass for which this is the less pronounced.

The first and second principal components represent 54.5 and 24.6 % of the total variability, respectively (Table 3). Thus, these two components explain 79.1% of the total variability of the sample composition. The cleavage between groups is mainly explained by the eigenvector of the first principal component (Table 3) which shows that there is a high positive correlation between the relative contents of mannan, galactan and hemicellulosic glucan that are negatively correlated to the relative content of xylan. These correlations can be explained by the fact that the contents of xyloglucan (which also contains galactan), mannan (which also contains galactan and hemicellulosic glucan) and β -glucan and the content of arabinoxylan are, respectively, high and low in less lignified cell walls (poor in secondary cell walls), compared to more lignified cell walls (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008). The cleavage between these groups is also explained by the eigenvector of the second principal component (Table 3) which has a very high positive correlation with the relative content of arabinan. This can be explained by the botanical difference of the cell wall hemicellulosic components of commelinid and non-commelinid magnoliophyta biomasses. Commelinid biomasses are known to have a higher content of arabinoxylan as compared to non-commelinid magnoliophyta biomasses. The latter have a higher content of xyloglucan and mannan (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008). The third principal component is also an important component because of its relative eigenvalue percentage (Table 3) and its high positive correlation with the relative content of hemicellulosic glucan. This means that this hemicellulosic

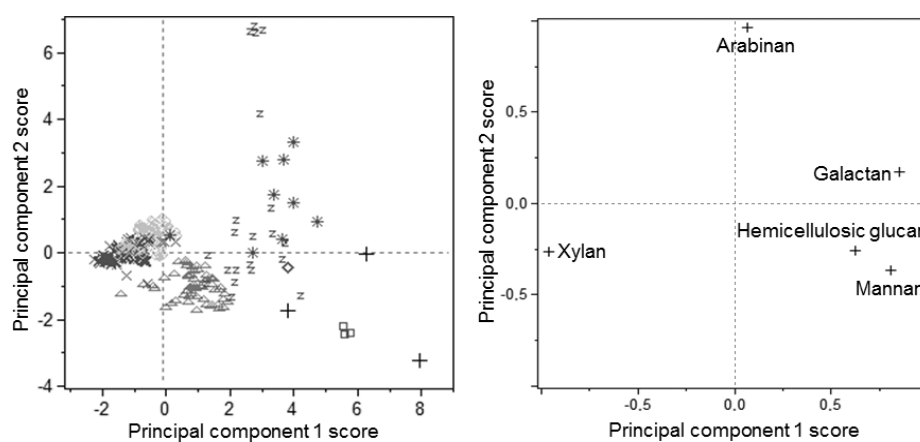
component is also an important discrimination parameter for the investigated biomasses.

The significant negative or positive correlations between the relative contents of xylan, mannan, galactan and hemicellulosic glucan shown by the eigenvector of the first principal component (Table 3) are confirmed by the results of the correlation analysis of commelinid biomasses (Table 4) and of non-commelinid magnoliophyta biomasses (Table 4). The high correlation between the relative content of xylan and arabinan (Table 4) can be explained by the fact that less lignified cell walls (with lower contents of structural components ; poor in secondary cell walls) are known to have arabinoxylan with a higher degree of substitution by arabinan and higher contents of xyloglucan, β -glucan and mannan compared to more lignified cell walls which have a higher content of arabinoxylan with a lower degree of substitution by arabinan (Ishii, 1997 ; Carpita et al., 2000 ; Vogel, 2008). This can also explain the high positive correlation between the relative content of arabinan and galactan (Table 4), and the high positive correlation between xylan and hemicellulosic glucan in commelinid biomasses (Table 4).



3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DM: Dry matter ; LW: Late winter

Figure 4. Relative monosaccharidic composition of hemicelluloses of the various analyzed biomasses (top). Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses of various biomasses (bottom).



Left: Score plot along the first and the third principal component score of the analyzed biomasses ; Right: Score plot along the first and the second principal component score of the relative hemicellulosic components ; x, commelinid fibrous biomass ; o, commelinid less fibrous biomass ; Δ, non-commelinid fibrous magnoliophyta biomass ; z, non-commelinid less fibrous magnoliophyta biomass ; *, non-commelinid high total soluble sugars magnoliophyta biomass ; □, pinophyta biomass ; ◇, ginkgophyta biomass ; +, non-spermatophyta biomass.

Figure 5. Principal component analysis of the relative hemicellulosic components of the various analyzed biomasses

Table 3. Relative percentage of the explained variance and loading vector of the principal component analysis of the relative hemicellulosic components

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5
<i>Relative percentage of the explained variance</i>	54.5	24.6	14.2	6.7	0.0
<i>Loading vector</i>					
Xylan	-0.584	-0.235	0.036	-0.074	0.772
Arabinan	0.042	0.869	0.217	0.312	0.316
Mannan	0.494	-0.332	-0.250	0.679	0.350
Galactan	0.520	0.154	-0.370	-0.643	0.396
Hemicellulosic glucan	0.378	-0.237	0.867	-0.154	0.158

PC: Principal component

Table 4. Correlations between the relative monosaccharidic components of hemicelluloses of the commelinid (n=211) and of non-commelinid magnoliophyta biomasses (n=99)

	Xylan	Arabinan	Mannan	Galactan	Hemicellulosic glucan
<i>Commelinid magnoliophyta</i>					
Xylan	/				
Arabinan	-0.90***	/			
Mannan	-0.21**	0.03	/		
Galactan	-0.83***	0.76***	-0.03	/	
Hemicellulosic glucan	-0.82***	0.59***	0.06	0.54***	/
<i>Non-commelinid magnoliophyta</i>					
Xylan	/				
Arabinan	-0.84***	/			
Mannan	-0.13	-0.27*	/		
Galactan	-0.86***	0.61***	0.16	/	
Hemicellulosic glucan	-0.06	-0.21*	0.05	-0.11	/

* p<0,050 ; ** p<0,010 ; *** p<0,001

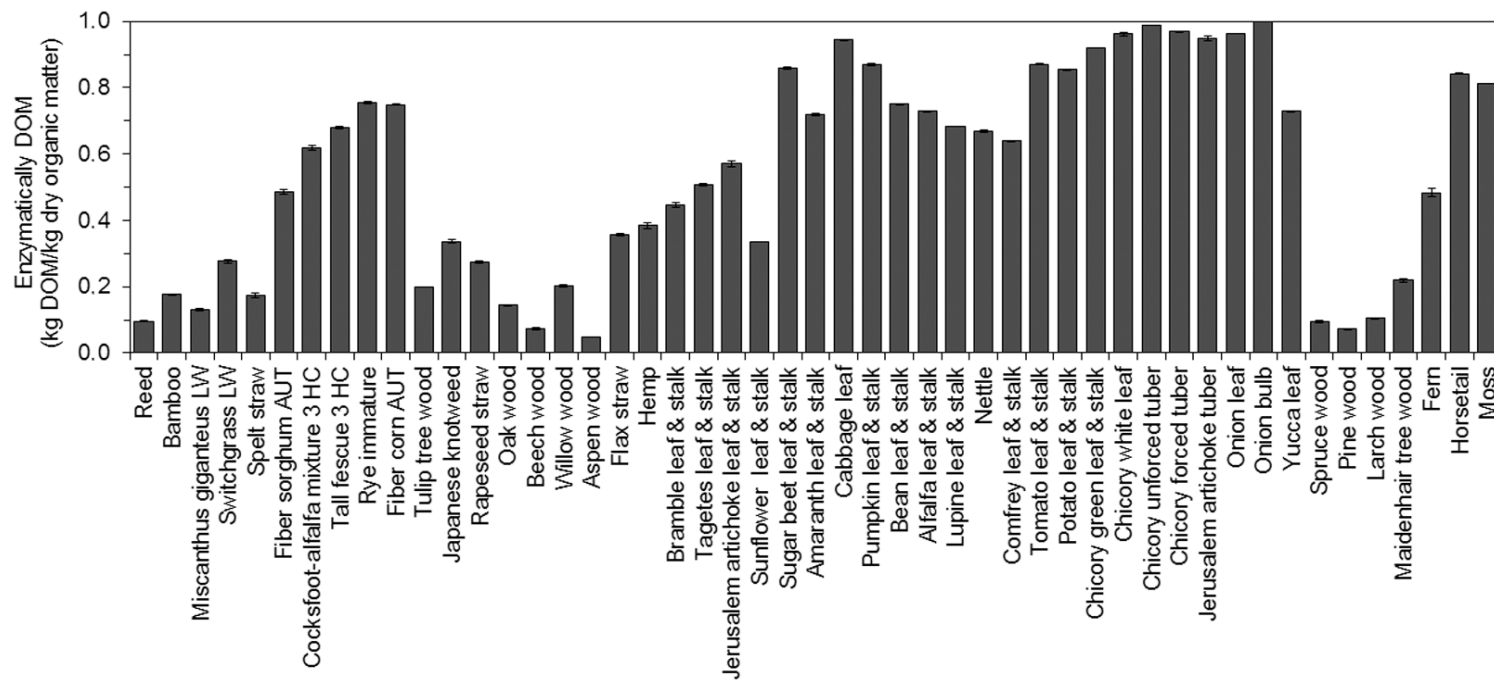
3.3. Biomass characteristics as guide in the selection of transformation technology

Enzymatically digestible organic matter

The enzymatically digestible organic matter (DOM) was used to assess the suitability of the analyzed biomasses for anaerobic digestion (biomethanation) without any pretreatment. For the purpose of our study, this method was considered much faster than determining the real biomethane potential, while the results can be correlated with anaerobic digestibility (De Boever et al., 1986; Lesteur et al., 2011). Figure 6 (details in Table A3 of the appendix) shows that investigated biomasses offer a wide range of enzymatically DOM per kg of dry organic matter. The biomasses with the highest enzymatically DOM are the less fibrous and the high total soluble sugars biomasses. This can be explained by their high total soluble sugars, starch and/or proteins content which are a part of the enzymatically DOM (De Boever et al., 1986). These biomasses are made of an important part of cells with high contents of non-structural components and less lignified cell walls (Figure

2). Biomasses with high enzymatically DOM have generally a high content of mineral compounds (Figures 2 and 6) because they are made of an important part of leaves which have much less lignified cell walls and cells rich in cytoplasm (containing the mineral salts). This content of mineral compounds brought to the anaerobic digestion is used by the microorganisms to digest the biomass.

The correlations between the enzymatic digestibility and the main chemical components are presented in Table 5 for commelinid biomasses and in Table 5 for non-commelinid magnoliophyta biomasses. They show that the enzymatically DOM has high significant positive and negative correlations with non-structural and structural components, respectively. Non-structural components are clearly more digestible than structural components.



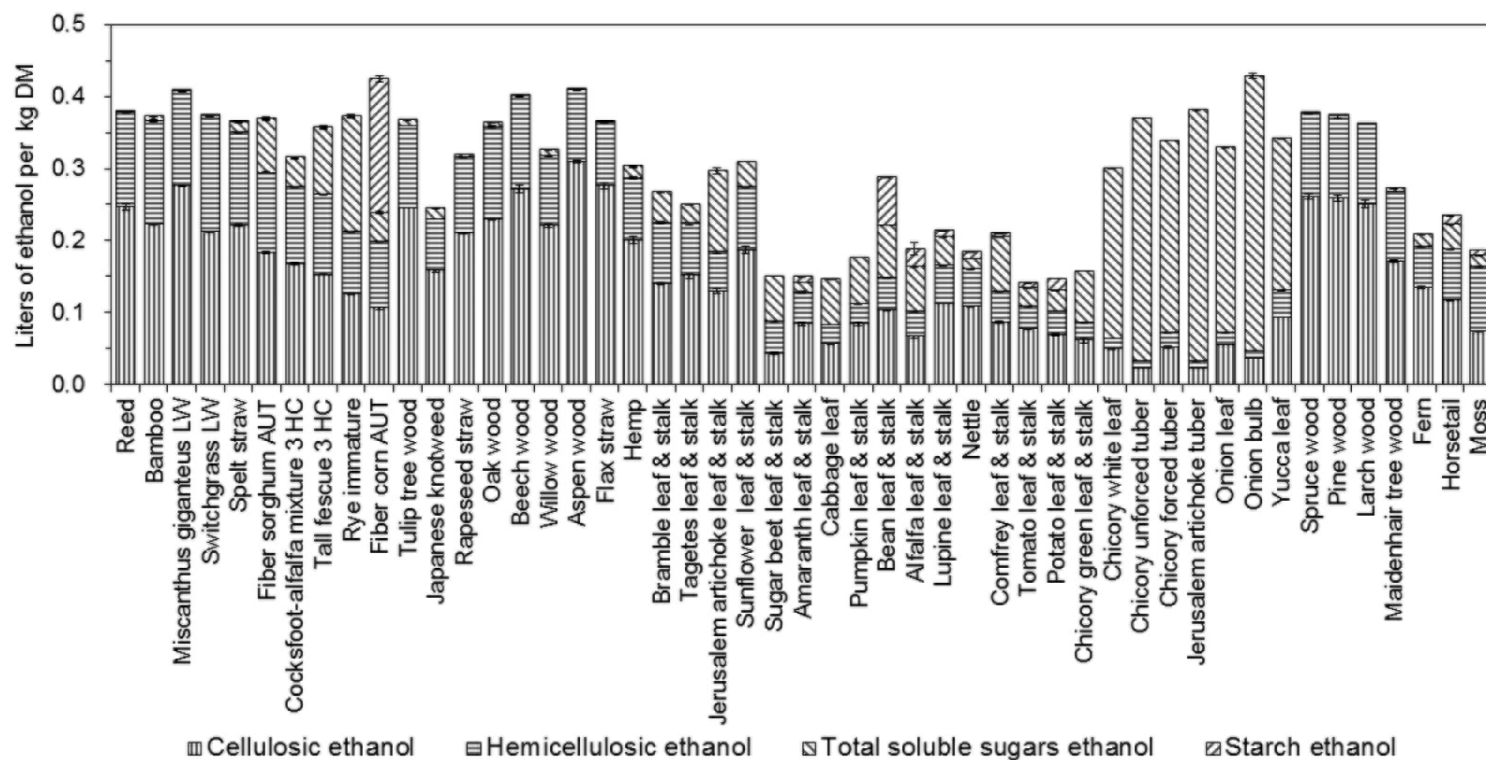
3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DOM: Digestible organic matter ; LW: Late winter

Figure 6. Enzymatically DOM of the various analyzed biomasses. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

Bioethanol

Figure 7 (details in Table A3 of the appendix) shows the calculated bioethanol production that can be expected from the analyzed biomasses. Bioethanol production from soluble carbohydrates and starch/fructanes of biomasses can be readily fermented with current technologies whereas bioethanol production from cellulose and hemicelluloses of biomasses need a pretreatment to be fermented. Without any pretreatment only 20% of the ethanol production from cellulose and hemicelluloses can be reached (Balat et al., 2008). A wide range of total bioethanol potential is observed in Figure 7. The biomasses with the highest total bioethanol potential are commelinid, non-commelinid fibrous magnoliophyta, non-commelinid high total soluble sugars magnoliophyta and pinophyta biomasses because of their high contents of structural and non structural carbohydrates (Figure 2). Commelinid fibrous, non-commelinid fibrous magnoliophyta, ginkgophyta and pinophyta biomasses (Figure 7) offer the structural carbohydrates bioethanol potential owing to their high contents of cellulose and hemicelluloses (Figure 2). Non-commelinid high total soluble sugars magnoliophyta biomasses offer the highest non-structural carbohydrates bioethanol potential (Figure 2). The total ethanol potential results mainly from the structural carbohydrates bioethanol, except for non-commelinid high total soluble sugars magnoliophyta biomasses, where the non-structural carbohydrates bioethanol also constitutes an important part of the total bioethanol (Figure 7).

There are highly significant positive and negative correlations between the structural components and, respectively, the bioethanol coming from structural carbohydrates and from non-structural carbohydrates (Table 5), as a direct consequence of the negative correlations of the later discussed in Table 2.



3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DM: Dry matter ; LW: Late winter

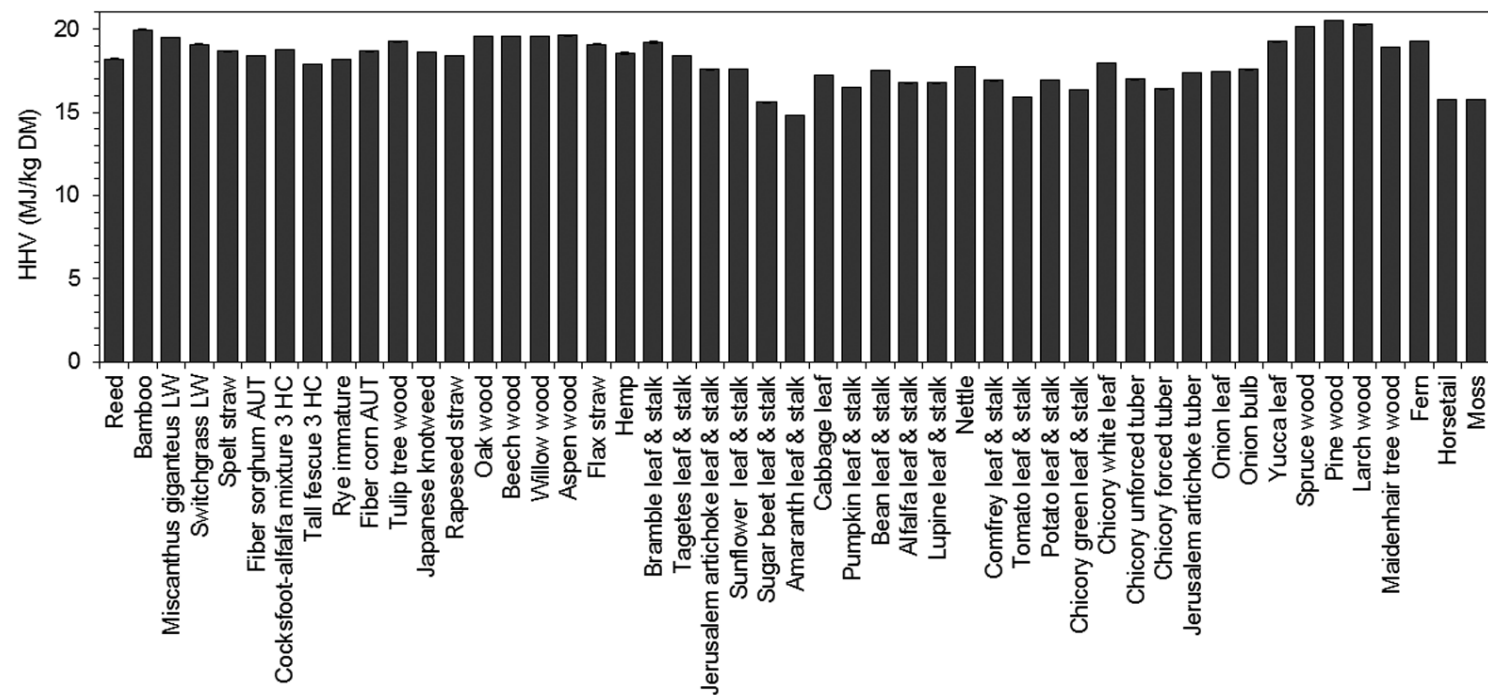
Figure 7. Potential bioethanol of the various analyzed biomasses. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

Thermal energy

The HHV was used to assess the suitability of the biomasses for conversion to thermal energy by combustion, independently of their humidity (that can be adjusted by drying, if required). Figure 8 (details in Table A3 of the appendix) shows that the HHV of all analyzed biomasses fall in a narrow range. HHV depends mainly on the total organic matter, which is the complement to mineral compounds (based on the correlation analysis of Table 5) for which a narrow range is also observed (Figure 2). Fibrous biomasses offer the highest HHV.

The correlations between the HHV and the main chemical components are presented in Table 5 for commelinid biomasses and in Table 5 for non-commelinid magnoliophyta biomasses. The highest significant correlation between the HHV and the main chemical components is the negative one with the mineral compounds. The relatively low content of lignin (HHV 25,10 MJ/kg dry lignin ; Klass, 2004) and of proteins (HHV 24,00 MJ/kg dry protein ; Klass, 2004) of the organic matter (complement of the mineral compounds), and the relatively low differences of HHV between the other individual organic compounds (monosaccharides 15,60 MJ/kg dry monosaccharide ; polysaccharides 17,50 MJ/kg dry polysaccharide ; Klass, 2004) can explain this correlation. Biomasses with a high HHV are mainly made of stems that have higher organic matter and more lignified cell walls. Biomasses with a low HHV are made of an important part of leaves that have cytoplasm-rich, less lignified cells.

There is also a high significant negative correlation between the HHV and the enzymatically DOM (Table 6) that is consistent with the negative influence of lignified structural components on the DOM (Table 5).



3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DM: Dry matter ; HHV: Higher heating value ; LW: Late winter

Figure 8. Higher heating value of the various analyzed biomasses in dry state. Error bars correspond to standard deviation of the mean.

Table 5. Correlations between the enzymatically DOM-bioethanol potential from structural carbohydrates-bioethanol potential from non-structural carbohydrates-higher heating value and the biomass main chemical components of commelinid (n=873) and of non-commelinid magnoliophyta biomasses (n=179)

	Cel.	Hem.	Lignin	Total soluble sugars	Proteins	Mineral compounds
<i>Commelinid magnoliophyta</i>						
Enzymatically DOM	-0.95***	-0.76***	-0.94***	0.69***	0.80***	0.38***
Bioethanol potential from structural carbohydrates	0.97***	0.82***	0.92***	-0.60***	-0.69***	-0.27***
Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	-0.89***	-0.80***	-0.80***	0.48***	0.43***	-0.04
Higher heating value	0.59***	0.48***	0.73***	-0.73***	-0.71***	-0.80***
<i>Non-commelinid magnoliophyta</i>						
Enzymatically DOM	-0.95***	-0.86***	-0.89***	0.70***	0.58***	0.64***
Bioethanol potential from structural carbohydrates	0.98***	0.89***	0.86***	-0.69***	-0.57***	-0.64***
Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	-0.69***	-0.65***	-0.66***	0.99***	-0.01	0.06
Higher heating value	0.68***	0.57***	0.72***	-0.45***	-0.33***	-0.74***

*** p<0.001

Cel.: Cellulose ; DOM: Digestible organic matter ; Hem.: Hemicelluloses

Table 6. Correlations between the enzymatically DOM, bioethanol potential from structural carbohydrates, bioethanol from non-structural carbohydrates and higher heating value of commelinid (n=873) and of non-commelinid magnoliophyta biomasses (n=176)

	Enzymatically DOM	Bioethanol potential from structural carbohydrates	Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	Higher heating value
<i>Commelinid magnoliophyta</i>				
Enzymatically DOM	/			
Bioethanol potential from structural carbohydrates	-0.96***	/		
Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	0.85***	-0.93***	/	
Higher heating value	-0.67***	0.62***	-0.41***	/
<i>Non-commelinid magnoliophyta</i>				
Enzymatically DOM	/			
Bioethanol potential from structural carbohydrates	-0.97***	/		
Bioethanol potential from non-structural carbohydrates	0.72***	-0.71***	/	
Higher heating value	-0.71***	0.68***	-0.47***	/

*** p<0.001

DOM: Digestible organic matter

4. Conclusions

The investigation of a wide diversity of plant types revealed a wide diversity of composition, at the level of both the main chemical components and the hemicelluloses. In spite of this diversity, the dry state higher heating value of these biomasses remained in a narrow range (16-20 MJ/kg_{DM}), mostly affected by the biomass organic matter (complement of the mineral compounds) content. The biomass enzymatic digestibility, used to predict the anaerobic digestibility without any pretreatment, ranges from 5 to 100% of the organic matter. Biomasses with lower structural carbohydrates, which correlates with lower lignification, appear better suited to digestion than fibrous biomasses. The high non-structural carbohydrates biomasses offer ethanol potentials in the range 0.1-0.3 l_{EtOH}/kg_{DM}. When considering the conversion of structural carbohydrates to ethanol, many

biomasses can offer ethanol potentials in the range 0.1-0.4 l_{EtOH}/kg_{DM}. The principal component analyses of the results reveal that biomass composition, at the level of both the main chemical components and the hemicelluloses, allow to cluster the samples into groups that correspond to phylogenetic groups: commelinid monocots, non-commelinid magnoliophyta and pinophyta biomasses. The clustering also distinguished fibrous and less fibrous biomasses. All these conclusions apply to a wide range of plant biomasses.

To assess more in the details the suitability of each biomass for various bioenergy or biorefining conversion or fractionation processes, its composition can be further analyzed based on the present paper.

Acknowledgements

This research was funded by the Walloon Agricultural Research Center (CRA-W) with the support of the Belgian Science Policy and by the ENERBIOM project (ENERBIOM project n°14GR23024 of the European territorial co-operation program in the context of INTERREG IV A « Grande Région » 2007-2013 n°CCI2007CB163PO064, co-financed by the FEDER-EU funds). The authors are grateful to the technicians of the BIOETHA2 and the ENERBIOM projects for their technical support.

References

- AOAC, 1990.** *Official methods of analysis*. 15th ed. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemist.
- Balat M., Balat H. & Oz C., 2008.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Sci.* **34**, 551-573.
- Buchholz K. & Seibel J., 2008.** Industrial carbohydrate biotransformations. *Carbohydrate Research* **343**, 1966-1979.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall, *In*: Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.
- Chandel A., Singh O. & Rao L., 2010.** Biotechnological Applications of Hemicellulosic Derived Sugars: State-of-the-Art, *In*: Singh, O. & Harvey, S., eds.

Sustainable biotechnology: sources of renewable energy. New York, USA: Springer, pp. 63-81.

da Costa Sousa L., Chundawat S., Balan V. & Dale, B., 2009. ‘Cradle-to-grave’ assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **20**, 1-9.

De Boever J., Cottyn B., Andries J., Buysse F. & Vanacker J., 1988. The Use of a Cellulase Technique to Predict Digestibility, Metabolizable and Net Energy of Forages. *Animal Feed Sci. and Technol.* **19**, 247-260.

De Boever J., Cottyn B., Buysse F. & Vanacker J., 1986. The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolisable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Sci. and Technol.* **14**, 203-214.

European Committee for Standardization, 2005. *CEN/TS 14918: Solid Biofuels - Method for the determination of calorific value*. Brussels, Belgium: European Committee for Standardization.

European Union, 2009. Commission Regulation No 152/2009. *Official Journal of the European Union* **L54**, 1-130.

European Union, 2003. Directive 2003/30/CE of the European parliament and of the council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport. *Official Journal of the European Union* **L123**, 42-46.

Ghysel F., Godin B., Flamin C., Delfosse P., Delcarte J. & Stilmant D., 2010. Valorisation énergétique des fourrages : comparaison de trois filières, enjeux et opportunités. *Fourrages* **203**, 163-173.

Godin, B., Agneessens, R., Gerin, P. & Delcarte, J., 2011. Composition of structural carbohydrates in biomass: Precision of a liquid chromatography method using a neutral detergent extraction and a charged aerosol detector. *Talanta* **85**, 2014-2026.

Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P. & Delcarte, J., 2010. Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de bioéthanol de deuxième génération *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**, 549-560.

Hamelinck C., van Hooijdonk & G., Faaij A., 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* **28**, 384-410.

- Hames B., 2009.** Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, *In*: Mielenz, J., eds. Biofuels: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* vol. 581. New York, USA: Humana Press, pp. 145-183.
- Ishii T., 1997.** Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* **127**, 111-127.
- Kamm B. & Kamm M., 2004.** Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 137-145.
- Lesteur M., Latrille E., Maurel V., Roger J., Gonzalez C., Junqua G. & Steyer J., 2011.** First step towards a fast analytical method for the determination of Biochemical Methane Potential of solid wastes by near infrared spectroscopy. *Bioresource Technol.* **102**(3), 2280-2288.
- McKendry P., 2002.** Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technol.* **83**, 37-46.
- Pauly M. & Keegstra K., 2008.** Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal* **54**, 559-568.
- Saidur R., Abdelaziz E., Demirbas A., Hossain M. & Mekhilef S., 2011.** A review on biomass as a fuel for boilers. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**, 2262-2289.
- Spatari S., Bagley D. & MacLean H., 2010.** Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. *Bioresource Technol.* **101**, 654-667.
- Van Soest P., 1973.** Collaborative Study of Acid-Detergent Fiber and Lignin. *J. of the AOAC* **56**, 781-784.
- Vogel J., 2008.** Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 301-307.

Appendix

Table A1. Chemical composition (mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses

	Cellulose (kg/kg DM)	Hemicelluloses (kg/kg DM)	Lignin (kg/kg DM)	Total soluble sugars (kg/kg DM)	Starch (kg/kg DM)	Proteins (kg/kg DM)	Mineral compounds (kg/kg DM)
Reed	0.409 ±0.008	0.258 ±0.002	0.094 ±0.001	0.002 ±0.001	0.000	0.026 ±0.001	0.075 ±0.000
Bamboo	0.370 ±0.002	0.282 ±0.004	0.147 ±0.001	0.010 ±0.001	0.000	0.039 ±0.001	0.014 ±0.000
Miscanthus giganteus	0.457 ±0.002	0.249 ±0.002	0.118 ±0.001	0.000	0.000	0.013 ±0.000	0.018 ±0.001
LW	0.352 ±0.003	0.306 ±0.002	0.077 ±0.001	0.000	0.000	0.045 ±0.002	0.050 ±0.002
Switchgrass LW	0.367 ±0.002	0.279 ±0.003	0.075 ±0.000	0.024 ±0.002	0.000	0.025 ±0.001	0.071 ±0.001
Spelt straw	0.305 ±0.003	0.222 ±0.001	0.048 ±0.001	0.126 ±0.005	0.000	0.069 ±0.002	0.065 ±0.001
Fiber sorghum AUT	0.278 ±0.002	0.223 ±0.003	0.043 ±0.001	0.069 ±0.003	0.000	0.111 ±0.004	0.091 ±0.001
Cocksfoot-alfalfa mixture 3 HC	0.253 ±0.002	0.213 ±0.001	0.035 ±0.000	0.157 ±0.003	0.000	0.098 ±0.001	0.100 ±0.001
Tall fescue 3 HC	0.208 ±0.001	0.204 ±0.001	0.019 ±0.001	0.270 ±0.006	0.000	0.106 ±0.002	0.072 ±0.001
Rye immature	0.176 ±0.002	0.181 ±0.001	0.024 ±0.000	0.068 ±0.002	0.293 ±0.006	0.069 ±0.001	0.041 ±0.001
Fiber corn AUT	0.407 ±0.000	0.228 ±0.001	0.104 ±0.002	0.012 ±0.001	0.000	0.013 ±0.000	0.022 ±0.000
Tulip tree wood	0.262 ±0.003	0.143 ±0.001	0.106 ±0.004	0.026 ±0.001	0.000	0.097 ±0.001	0.077 ±0.001
Japanese knotweed	0.348 ±0.001	0.212 ±0.002	0.119 ±0.002	0.007 ±0.000	0.000	0.036 ±0.001	0.067 ±0.000
Rapeseed straw	0.381 ±0.002	0.254 ±0.003	0.108 ±0.002	0.011 ±0.001	0.000	0.006 ±0.002	0.003 ±0.000
Oak wood	0.451 ±0.010	0.258 ±0.003	0.145 ±0.000	0.001 ±0.001	0.000	0.007 ±0.001	0.003 ±0.000
Beech wood	0.366 ±0.004	0.193 ±0.001	0.145 ±0.002	0.015 ±0.001	0.000	0.024 ±0.000	0.023 ±0.001
Willow wood	0.514 ±0.002	0.198 ±0.002	0.162 ±0.001	0.001 ±0.000	0.000	0.004 ±0.001	0.012 ±0.000
Aspen wood	0.459 ±0.008	0.177 ±0.004	0.131 ±0.000	0.003 ±0.001	0.000	0.053 ±0.001	0.035 ±0.000
Flax straw	0.333 ±0.008	0.134 ±0.003	0.083 ±0.001	0.027 ±0.003	0.000	0.080 ±0.004	0.082 ±0.002
Hemp	0.233 ±0.004	0.168 ±0.003	0.100 ±0.001	0.070 ±0.001	0.000	0.091 ±0.001	0.040 ±0.000
Bramble leaf & stalk	0.250 ±0.006	0.146 ±0.003	0.066 ±0.001	0.043 ±0.000	0.000	0.083 ±0.001	0.089 ±0.000
Tagetes	0.216 ±0.005	0.112 ±0.003	0.065 ±0.002	0.189 ±0.008	0.000	0.051 ±0.002	0.096 ±0.003
Jerusalem artichoke leaf & stalk	0.310 ±0.007	0.175 ±0.001	0.119 ±0.003	0.059 ±0.000	0.000	0.037 ±0.000	0.086 ±0.001
Sunflower leaf & stalk							

3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DM: Dry matter ; LW: Late winter

Table A1 (second part). Chemical composition (mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses

	Cellulose (kg/kg DM)	Hemicelluloses (kg/kg DM)	Lignin (kg/kg DM)	Total soluble sugars (kg/kg DM)	Starch (kg/kg DM)	Proteins (kg/kg DM)	Mineral compounds (kg/kg DM)
Sugar beet leaf & stalk	0.071 ±0.002	0.089 ±0.001	0.025 ±0.001	0.106 ±0.001	0.000	0.179 ±0.000	0.227 ±0.000
Amaranth	0.139 ±0.004	0.089 ±0.003	0.025 ±0.001	0.024 ±0.001	0.012 ±0.001	0.238 ±0.001	0.207 ±0.000
Cabbage leaf	0.094 ±0.003	0.053 ±0.000	0.013 ±0.001	0.106 ±0.001	0.000	0.231 ±0.002	0.166 ±0.000
Pumpkin leaf & stalk	0.140 ±0.004	0.055 ±0.000	0.032 ±0.001	0.109 ±0.001	0.000	0.246 ±0.001	0.169 ±0.001
Bean leaf & stalk	0.171 ±0.001	0.089 ±0.000	0.055 ±0.001	0.124 ±0.001	0.105 ±0.001	0.149 ±0.001	0.111 ±0.001
Alfalfa leaf & stalk	0.110 ±0.003	0.071 ±0.002	0.049 ±0.000	0.103 ±0.001	0.040 ±0.000	0.148 ±0.001	0.127 ±0.000
Lupine leaf & stalk	0.187 ±0.001	0.106 ±0.003	0.066 ±0.001	0.067 ±0.000	0.014 ±0.000	0.098 ±0.001	0.144 ±0.001
Nettle	0.181 ±0.001	0.102 ±0.002	0.052 ±0.000	0.026 ±0.001	0.014 ±0.000	0.162 ±0.001	0.158 ±0.000
Comfrey leaf & stalk	0.144 ±0.003	0.086 ±0.001	0.083 ±0.001	0.127 ±0.000	0.008 ±0.000	0.142 ±0.000	0.140 ±0.000
Tomato leaf & stalk	0.128 ±0.001	0.063 ±0.001	0.025 ±0.001	0.043 ±0.001	0.011 ±0.000	0.290 ±0.000	0.199 ±0.001
Potato leaf & stalk	0.115 ±0.002	0.066 ±0.001	0.038 ±0.001	0.048 ±0.000	0.025 ±0.001	0.182 ±0.001	0.186 ±0.000
Chicory green leaf	0.102 ±0.006	0.050 ±0.001	0.025 ±0.001	0.121 ±0.001	0.000	0.168 ±0.001	0.195 ±0.001
Chicory unforced tuber	0.038 ±0.000	0.020 ±0.001	0.006 ±0.000	0.567 ±0.002	0.000	0.073 ±0.001	0.052 ±0.000
Chicory white leaf	0.082 ±0.001	0.031 ±0.000	0.010 ±0.001	0.396 ±0.001	0.000	0.253 ±0.001	0.122 ±0.001
Chicory forced tuber	0.085 ±0.003	0.042 ±0.002	0.018 ±0.002	0.448 ±0.001	0.000	0.082 ±0.001	0.101 ±0.001
Jerusalem artichoke tuber	0.037 ±0.001	0.019 ±0.000	0.019 ±0.000	0.587 ±0.002	0.000	0.097 ±0.001	0.090 ±0.001
Onion leaf	0.091 ±0.000	0.035 ±0.001	0.016 ±0.001	0.432 ±0.001	0.000	0.103 ±0.001	0.082 ±0.001
Onion bulb	0.060 ±0.000	0.022 ±0.000	0.004 ±0.001	0.641 ±0.005	0.000	0.095 ±0.001	0.043 ±0.000
Yucca leaf	0.155 ±0.000	0.073 ±0.000	0.070 ±0.001	0.355 ±0.000	0.000	0.075 ±0.001	0.050 ±0.001
Spruce wood	0.434 ±0.005	0.239 ±0.001	0.248 ±0.002	0.000	0.000	0.008 ±0.002	0.008 ±0.000
Pine wood	0.430 ±0.007	0.237 ±0.005	0.271 ±0.001	0.004 ±0.001	0.000	0.006 ±0.001	0.006 ±0.001
Larch wood	0.416 ±0.008	0.231 ±0.000	0.266 ±0.003	0.002 ±0.001	0.000	0.012 ±0.001	0.005 ±0.000
Maidenhair tree wood	0.284 ±0.004	0.201 ±0.001	0.256 ±0.000	0.008 ±0.001	0.000	0.022 ±0.002	0.078 ±0.000

Table A1 (third part). Chemical composition (mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses

	Cellulose (kg/kg DM)	Hemicelluloses (kg/kg DM)	Lignin (kg/kg DM)	Total soluble sugars (kg/kg DM)	Starch (kg/kg DM)	Proteins (kg/kg DM)	Mineral compounds (kg/kg DM)
Fern	0.224 ±0.004	0.116 ±0.001	0.160 ±0.000	0.028 ±0.000	0.000	0.208 ±0.001	0.090 ±0.000
Horsetail	0.194 ±0.001	0.149 ±0.002	0.028 ±0.001	0.058 ±0.001	0.020 ±0.001	0.152 ±0.002	0.189 ±0.001
Moss	0.123 ±0.001	0.188 ±0.003	0.178 ±0.000	0.025 ±0.001	0.013 ±0.001	0.092 ±0.001	0.242 ±0.002

Table A2. Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses (mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses

	Xylan (kg/kg DM)	Arabinan (kg/kg DM)	Mannan (kg/kg DM)	Galactan (kg/kg DM)	Hemicellulosic glucan (kg/kg DM)
Reed	0.209 ±0.003	0.0214 ±0.0002	0.0034 ±0.0001	0.0061 ±0.0004	0.0176 ±0.0006
Bamboo	0.216 ±0.000	0.0189 ±0.0003	0.0042 ±0.0004	0.0066± 0.0005	0.0363 ±0.0040
Miscanthus giganteus LW	0.216 ±0.001	0.0210 ±0.0002	0.0058 ±0.0003	0.0046 ±0.0001	0.0121 ±0.0003
Switchgrass LW	0.235 ±0.002	0.0348 ±0.0002	0.0048 ±0.0003	0.0150 ±0.0003	0.0250 ±0.0004
Spelt straw	0.195 ±0.001	0.0242 ±0.0002	0.0060 ±0.0002	0.0079 ±0.0001	0.0207 ±0.0004
Fiber sorghum AUT	0.164 ±0.001	0.0247 ±0.0002	0.0054 ±0.0002	0.0060 ±0.0002	0.0173 ±0.0004
Cocksfoot-alfalfa mixture 3 HC	0.136 ±0.002	0.0309 ±0.0007	0.0064 ±0.0002	0.0165 ±0.0002	0.0210 ±0.0004
Tall fescue 3 HC	0.152 ±0.001	0.0305 ±0.0002	0.0051 ±0.0000	0.0106 ±0.0001	0.0200 ±0.0002
Rye immature	0.118 ±0.001	0.0196 ±0.0001	0.0043 ±0.0000	0.0066 ±0.0001	0.0208 ±0.0002
Fiber corn AUT	0.125 ±0.001	0.0271 ±0.0002	0.0039 ±0.0001	0.0091 ±0.0002	0.0170 ±0.0002
Tulip tree wood	0.159 ±0.001	0.0118 ±0.0004	0.0143 ±0.0002	0.0243 ±0.0002	0.0182 ±0.0007
Japanese knotweed	0.096 ±0.000	0.0037 ±0.0001	0.0083 ±0.0007	0.0162 ±0.0021	0.0187 ±0.0007
Rapeseed straw	0.155 ±0.000	0.0051 ±0.0002	0.0158 ±0.0017	0.0233 ±0.0001	0.0122 ±0.0002
Oak wood	0.209 ±0.002	0.0042 ±0.0001	0.0107 ±0.0006	0.0164 ±0.0001	0.0131 ±0.0003
Beech wood	0.191 ±0.004	0.0064 ±0.0001	0.0117 ±0.0001	0.0310 ±0.0021	0.0178 ±0.0012
Willow wood	0.132 ±0.002	0.0060 ±0.0002	0.0160 ±0.0002	0.0163 ±0.0006	0.0233 ±0.0013
Aspen wood	0.143 ±0.003	0.0036 ±0.0000	0.0201 ±0.0001	0.0135 ±0.0002	0.0178 ±0.0007
Flax straw	0.114 ±0.000	0.0035 ±0.0000	0.0184 ±0.0030	0.0271 ±0.0006	0.0140 ±0.0011
Hemp	0.102 ±0.001	0.0053 ±0.0002	0.0238 ±0.0003	0.0271 ±0.0005	0.0160 ±0.0003
Bramble leaf & stalk	0.100 ±0.001	0.0158 ±0.0002	0.0093 ±0.0001	0.0199 ±0.0006	0.0234 ±0.0026
Tagetes	0.097 ±0.003	0.0082 ±0.0001	0.0124 ±0.0003	0.0183 ±0.0000	0.0101 ±0.0008
Jerusalem artichoke leaf & stalk	0.068 ±0.001	0.0054 ±0.0002	0.0084 ±0.0002	0.0162 ±0.0003	0.0102 ±0.0003
Sunflower leaf & stalk	0.132 ±0.002	0.0037 ±0.0001	0.0103 ±0.0006	0.0211 ±0.0003	0.0075 ±0.0002

3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DM: Dry matter ; LW: Late winter

Table A2 (second part). Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses (mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses

	Xylan (kg/kg DM)	Arabinan (kg/kg DM)	Mannan (kg/kg DM)	Galactan (kg/kg DM)	Hemicellulosic glucan (kg/kg DM)
Sugar beet leaf & stalk	0.017 ±0.000	0.0404 ±0.0004	0.0047 ±0.0002	0.0231 ±0.0008	0.0037 ±0.0002
Amaranth	0.042 ±0.000	0.0084 ±0.0002	0.0072 ±0.0007	0.0251 ±0.0018	0.0061 ±0.0006
Cabbage leaf	0.023 ±0.000	0.0067 ±0.0002	0.0055 ±0.0008	0.0118 ±0.0002	0.0062 ±0.0000
Pumpkin leaf & stalk	0.026 ±0.001	0.0046 ±0.0002	0.0079 ±0.0001	0.0101 ±0.0003	0.0070 ±0.0009
Bean leaf & stalk	0.051 ±0.000	0.0054 ±0.0000	0.0075 ±0.0001	0.0130 ±0.0001	0.0124 ±0.0001
Alfalfa leaf & stalk	0.033 ±0.000	0.0124 ±0.0001	0.0058 ±0.0000	0.0107 ±0.0009	0.0096 ±0.0011
Lupine leaf & stalk	0.060 ±0.001	0.0087 ±0.0003	0.0075 ±0.0008	0.0197 ±0.0003	0.0097 ±0.0008
Nettle	0.055 ±0.001	0.0061 ±0.0001	0.0074 ±0.0009	0.0217 ±0.0016	0.0120 ±0.0007
Comfrey leaf & stalk	0.038 ±0.001	0.0098 ±0.0003	0.0113 ±0.0001	0.0184 ±0.0009	0.0090 ±0.0006
Tomato leaf & stalk	0.029 ±0.000	0.0043 ±0.0000	0.0070 ±0.0010	0.0150 ±0.0000	0.0070 ±0.0002
Potato leaf & stalk	0.029 ±0.001	0.0066 ±0.0001	0.0050 ±0.0002	0.0109 ±0.0004	0.0137 ±0.0005
Chicory green leaf	0.017 ±0.000	0.0048 ±0.0001	0.0086 ±0.0003	0.0154 ±0.0014	0.0043 ±0.0003
Chicory unforced tuber	0.006 ±0.000	0.0048 ±0.0001	0.0020 ±0.0003	0.0053 ±0.0002	0.0018 ±0.0000
Chicory white leaf	0.011 ±0.000	0.0035 ±0.0001	0.0051 ±0.0001	0.0086 ±0.0003	0.0030 ±0.0000
Chicory forced tuber	0.013 ±0.000	0.0079 ±0.0003	0.0044 ±0.0003	0.0110 ±0.0014	0.0055 ±0.0001
Jerusalem artichoke tuber	0.004 ±0.000	0.0050 ±0.0001	0.0019 ±0.0001	0.0060 ±0.0000	0.0018 ±0.0003
Onion leaf	0.015 ±0.000	0.0033 ±0.0001	0.0053 ±0.0010	0.0078 ±0.0002	0.0031 ±0.0002
Onion bulb	0.006 ±0.000	0.0020 ±0.0000	0.0023 ±0.0002	0.0099 ±0.0002	0.0021 ±0.0002
Yucca leaf	0.047 ±0.000	0.0077 ±0.0000	0.0033 ±0.0000	0.0117 ±0.0000	0.0038 ±0.0002
Spruce wood	0.060 ±0.000	0.0144 ±0.0002	0.1027 ±0.0009	0.0232 ±0.0001	0.0386 ±0.0000
Pine wood	0.056 ±0.000	0.0160 ±0.0000	0.1083 ±0.0012	0.0256 ±0.0001	0.0312 ±0.0039
Larch wood	0.053 ±0.001	0.0146 ±0.0001	0.1041 ±0.0017	0.0236 ±0.0000	0.0354 ±0.0027
Maidenhair tree wood	0.070 ±0.001	0.0168 ±0.0003	0.0498 ±0.0005	0.0476 ±0.0000	0.0171 ±0.0001

**Table A2 (third part). Absolute monosaccharidic composition of hemicelluloses
(mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses**

	Xylan (kg/kg DM)	Arabinan (kg/kg DM)	Mannan (kg/kg DM)	Galactan (kg/kg DM)	Hemicellulosic glucan (kg/kg DM)
Fern	0.046 ±0.000	0.0057 ±0.0000	0.0315 ±0.0001	0.0169 ±0.0002	0.0156 ±0.0012
Horsetail	0.012 ±0.000	0.0065 ±0.0000	0.0784 ±0.0013	0.0209 ±0.0008	0.0314 ±0.0003
Moss	0.029 ±0.000	0.0191 ±0.0002	0.0439 ±0.0004	0.0678 ±0.0024	0.0284 ±0.0004

Table A3. Enzymatically DOM, bioethanol potential and higher heating value (mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses

	Enzymatically DOM (kg DOM/kg dry organic matter)	Liters of ethanol per kg DM	Higher heating value (MJ/kg DM)
Reed	0.096±0.001	0.379±0.000	18.2±0.0
Bamboo	0.177±0.002	0.373±0.001	19.9±0.0
Miscanthus giganteus LW	0.130±0.004	0.408±0.000	19.5±0.0
Switchgrass LW	0.277±0.005	0.372±0.000	19.1±0.0
Spelt straw	0.174±0.008	0.365±0.001	18.7±0.0
Fiber sorghum AUT	0.485±0.007	0.369±0.003	18.4±0.0
Cocksfoot-alfalfa mixture 3 HC	0.618±0.007	0.315±0.002	18.8±0.0
Tall fescue 3 HC	0.681±0.004	0.357±0.002	17.9±0.0
Rye immature	0.755±0.003	0.373±0.003	18.2±0.0
Fiber corn AUT	0.750±0.003	0.425±0.004	18.7±0.0
Tulip tree wood	0.200±0.000	0.367±0.001	19.2±0.0
Japanese knotweed	0.337±0.007	0.245±0.001	18.6±0.0
Rapeseed straw	0.274±0.004	0.320±0.000	18.4±0.0
Oak wood	0.144±0.003	0.364±0.000	19.6±0.0
Beech wood	0.074±0.005	0.401±0.000	19.6±0.0
Willow wood	0.202±0.004	0.326±0.000	19.6±0.0
Aspen wood	0.048±0.001	0.409±0.000	19.6±0.0
Flax straw	0.357±0.004	0.366±0.001	19.1±0.0
Hemp	0.385±0.008	0.303±0.002	18.6±0.1
Tagetes	0.508±0.007	0.249±0.000	18.4±0.0
Bramble leaf & stalk	0.448±0.004	0.267±0.000	19.2±0.0
Jerusalem artichoke leaf & stalk	0.571±0.010	0.297±0.005	17.6±0.0
Sunflower leaf & stalk	0.335±0.001	0.310±0.000	17.6±0.0
Sugar beet leaf & stalk	0.860±0.005	0.150±0.000	15.6±0.0
Amaranth	0.718±0.004	0.150±0.001	14.8±0.0
Cabbage leaf	0.944±0.002	0.146±0.000	17.2±0.0
Pumpkin leaf & stalk	0.870±0.004	0.177±0.000	16.5±0.0
Bean leaf & stalk	0.750±0.000	0.288±0.001	17.5±0.0
Alfalfa leaf & stalk	0.728±0.000	0.189±0.009	16.8±0.0
Lupine leaf & stalk	0.683±0.000	0.214±0.000	16.8±0.0
Nettle	0.669±0.003	0.184±0.001	17.7±0.0
Comfrey leaf & stalk	0.639±0.002	0.210±0.001	16.9±0.0
Tomato leaf & stalk	0.870±0.002	0.141±0.001	15.9±0.0
Potato leaf & stalk	0.855±0.002	0.147±0.000	17.0±0.0
Chicory green leaf	0.920±0.001	0.158±0.000	16.4±0.0

3HC: 3 Harvest cycles per year ; AUT: autumn ; DM: Dry matter ; DOM: Digestible organic matter ; LW: Late winter

Table A3 (second part). Enzymatically DOM, bioethanol potential and higher heating value (mean and standard deviation of the mean) of the various analyzed biomasses

	Enzymatically DOM (kg DOM/kg dry organic matter)	Liters of ethanol per kg DM	Higher heating value (MJ/kg DM)
Chicory unforced tuber	0.988±0.006	0.370±0.001	17.0±0.0
Chicory white leaf	0.962±0.000	0.300±0.000	18.0±0.0
Chicory forced tuber	0.969±0.001	0.339±0.001	16.4±0.0
Jerusalem artichoke tuber	0.949±0.007	0.382±0.001	17.4±0.0
Onion leaf	0.963±0.000	0.329±0.000	17.5±0.0
Onion bulb	0.999±0.000	0.429±0.003	17.6±0.0
Yucca leaf	0.729±0.003	0.342±0.000	19.3±0.0
Spruce wood	0.096±0.004	0.377±0.000	20.2±0.0
Pine wood	0.072±0.000	0.375±0.001	20.5±0.0
Larch wood	0.105±0.003	0.363±0.001	20.3±0.0
Maidenhair tree wood	0.220±0.006	0.273±0.001	18.9±0.0
Fern	0.484±0.014	0.209±0.000	19.3±0.0
Horsetail	0.843±0.001	0.235±0.001	15.8±0.0
Moss	0.813±0.001	0.187±0.000	15.8±0.0

Discussion générale

1. Dosage de la cellulose et des hémicelluloses

La valorisation optimale des biomasses végétales en énergie exige de connaître leur composition en polymères structuraux (Kamm & Kamm, 2004 ; Kamm & Kamm, 2007). Ce point est d'autant plus important pour la cellulose et les hémicelluloses car ce sont des polysaccharides structuraux prépondérants de ces biomasses (Carpita et al., 2000). Les teneurs en ces deux polysaccharides structuraux sont utilisées pour évaluer le potentiel en bioéthanol (Spatari et al. 2010). Le problème pour l'analyse de ces deux constituants dans le domaine de la valorisation des biomasses végétales en énergie et en bioproduits réside dans le fait qu'il existe différentes méthodes de dosage venant de domaines d'applications connexes (Southgate et al., 1995 ; Sluiter et al., 2010). Chacune de ces méthodes est fondée sur une ou plusieurs hypothèses et néglige des facteurs qui n'ont pas d'intérêt dans le domaine d'application pour lequel elle a été optimisée. Nous avons donc réalisé une analyse de la littérature comparant l'intérêt et les limitations de ces diverses méthodes dosant la cellulose et les hémicelluloses (Partie 1 - Chapitres 3 et 4). Comme, dans le domaine des biomasses végétales à vocation énergétique, une bonne connaissance des teneurs en cellulose et en hémicelluloses est nécessaire, il faut les mesurer avec un degré élevé d'exactitude (Partie 1 - Chapitres 3 et 4). Pour ce faire, ces deux polymères doivent être mesurés d'après leurs monomères, c'est-à-dire leurs monosaccharides (Partie 1 - Chapitres 3 et 4). A cet effet, nous avons mis au point la méthode NDE-SAH-LC-CAD (Partie 2 - Chapitre 5).

1.1. La méthode NDE-SAH-LC-CAD

La méthode NDE-SAH-LC-CAD possède les caractéristiques suivantes (Partie 2 - Chapitre 5) :

- L'extraction des constituants non-lignocellulosiques au détergent neutre de Van Soest (NDE) permet d'éliminer les interférences venant des hydrates de carbone non-cellulosiques et non-hémicellulosiques (Partie 2 - Chapitre 5) ;
- L'hydrolyse à l'acide sulfurique (SAH) de la cellulose et des hémicelluloses en monosaccharides. Nous avons optimisé cette hydrolyse afin d'atteindre un compromis entre l'hydrolyse totale de ces deux polysaccharides en monosaccharides et une dégradation minimale des monosaccharides libérés (Partie 2 - Chapitre 5 - Figure 3) ;
- La séparation des monosaccharides issus de l'hydrolyse acide de la cellulose et des hémicelluloses par chromatographie liquide (LC) classique. Cette séparation est optimale car la plus faible résolution entre les deux pics chromatographiques de ces monosaccharides est de 1,51. Il s'agit de la résolution entre L-arabinose et D-mannose (Partie 2 - Chapitre 5 - Figure 1). L'avantage de ce type de système de chromatographie liquide est qu'il ne nécessite pas de pompes en résine et qu'il peut être utilisé pour des applications complètement différentes ;
- La quantification des monosaccharides libérés par l'hydrolyse acide par un détecteur d'aérosol chargé (CAD) (Partie 2 - Chapitre 5 - Figures 4 et 5).

Il en résulte une méthode appropriée pour la quantification de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses végétales. Dans cette méthode NDE-SAH-LC-CAD, la teneur en cellulose correspond à la teneur en glucane cellulosique. Ce terme correspond au contenu en D-glucose de la cellulose et il tient compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités de D-glucose s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de D-glucose, et non en D-glucose). La teneur en hémicelluloses correspond à la somme des teneurs en xylane, en arabinane, en glucane hémicellulosique, en mannane et en galactane. Ces termes sont utilisés pour exprimer le contenu en chaque monosaccharide des hémicelluloses et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation de

chaque monosaccharide s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère de chaque monosaccharide, et non en monosaccharides libres).

Pour prendre en compte la dégradation des monosaccharides venant des de cellulose et des hémicelluloses, il est nécessaire de traiter en parallèle aux échantillons analysés un mélange de référence standard de monosaccharides. Il serait préférable d'utiliser des oligosaccharides ou de la cellulose et des hémicelluloses comme standards au lieu des monosaccharides standards. Cela n'est pas réalisable car ils n'en existent aucun de techniquement adéquat et commercialement disponible (Willför et al., 2009).

Cette méthode permet également de donner la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses. La valorisation des hémicelluloses nécessite cette connaissance car les hémicelluloses sont des polymères constitués de différents monosaccharides, le D-xylose, le L-arabinose, le D-glucose, le D-mannose et le D-galactose (Carpita et al., 2000). Ce n'est pas le cas pour la cellulose car ce polymère est uniquement constitué d'un seul type de monosaccharide, le D-glucose (Carpita et al., 2000).

Nous avons montré que la méthode NDE-SAH-LC-CAD est précise (Partie 2 - Chapitre 5). Pour les niveaux de concentration élevée (teneur $\geq 0,010$ kg/kg MS), le coefficient de variation intra-laboratoire est situé entre 1,3% et 4,3%, sauf pour le D-galactose dont la quantification est moins précise (le coefficient de variation intra-laboratoire est de 5,5%). Pour les niveaux de concentration basse (teneur $< 0,010$ kg/kg MS), le coefficient de variation intra-laboratoire est situé entre 5,6% et 7,4%. La précision de la méthode NDE-SAH-LC-CAD est donc meilleure pour des niveaux de concentration élevée par rapport aux niveaux de concentration basse. Ce type d'effet a également observé par Horwitz (Boyer et al., 1985).

Les caractéristiques et la précision de la méthode NDE-SAH-LC-CAD lui permettent de mesurer les teneurs en cellulose et en hémicelluloses avec un degré élevé d'exactitude. Cette méthode est applicable à une grande diversité de biomasses végétales. Nous l'avons utilisée pour 461 échantillons couvrant 49 espèces végétales dont les origines phylogénétiques sont très variées (Partie 2 - Chapitre 6 ; Partie 8 - Chapitres 9).

1.2. Comparaison de la méthode NDE-SAH-LC-CAD à celle de Van Soest

Afin de comparer la méthode NDE-SAH-LC-CAD à une méthode de référence, nous avons mis en parallèle les résultats de notre méthode et de ceux de la méthode de Van Soest (Partie 2 - Chapitre 6- Figure 2). Nous avons observé que la méthode de Van Soest surestime les teneurs en cellulose et en hémicelluloses, par rapport à la méthode NDE-SAH-LC-CAD (Partie 2 - Chapitre 6- Figures 1 et 2), sauf pour la teneur en hémicelluloses dans les biomasses angiospermes non-commélinoides qu'elle sous-estime (Partie 2 - Chapitre 6- Figure 2). Ces différences s'expliquent par le fait que la méthode NDE-SAH-LC-CAD est basée sur l'analyse en monosaccharides de la cellulose et des hémicelluloses alors que la méthode de Van Soest est basée sur les fractions suivantes (Partie 2 - Chapitre 6) :

- NDF, fraction de fibres insolubles au détergent neutre principalement composée de cellulose, des hémicelluloses et de lignine ;
- ADF, fraction de fibres insolubles au détergent acide principalement composée de cellulose et de lignine ;
- ADL, une fraction correspondant à la lignine insoluble en milieu acide.

Ces fractions permettent de calculer les teneurs en cellulose (ADF-ADL) et en hémicelluloses (NDF-ADF). Ces estimations sont entachées d'un biais car des constituants non-(hémi)-cellulosiques sont également présents ou absents dans ces fractions (Partie 2 - Chapitre 6) :

- Le résidu NDF contient des protéines (Theander & Westerlund, 1993 ; Jung 1997) ;
- Le résidu ADF contient des pectines lorsque la biomasse (comme les angiospermes non-commélinoides) possède une teneur élevée en pectines (Jung, 1997 ; Jung et al., 2004 ; Ampuero, 2008) ;
- Le résidu ADF contient des hémicelluloses (Morrison, 1980 ; confirmé au Chapitre 2 - Partie 6) ;
- Le résidu ADL ne contient pas la lignine soluble en milieu acide, qui est plus facilement hydrolysable dans les biomasses commélinoides (Jung, 1997).

En conséquence, nous observons que pour la teneur en cellulose, en moyenne par rapport à la méthode NDE-SAH-LC-CAD, la méthode de Van Soest la surestime de 15,3% pour les biomasses commélinoides et de 34,7% pour les biomasses angiospermes non-commélinoides. En ce qui concerne la teneur en hémicelluloses, en moyenne par rapport à la méthode NDE-SAH-LC-CAD, la méthode de Van Soest la surestime de 9,5% pour les biomasses commélinoides et la sous-estime de 20,0% pour les biomasses angiospermes non-commélinoides. L'ampleur de ces biais indique qu'il est primordial de savoir avec quelle méthode la cellulose et les hémicelluloses sont quantifiées. Cette donnée est essentielle pour les filières de valorisation des biomasses pour estimer correctement les potentialités liées à l'utilisation de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses.

1.3. Corrélations entre la méthode NDE-SAH-LC-CAD et celle de Van Soest

Nous avons montré que les résultats qui seraient obtenus par la méthode NDE-SAH-LC-CAD peuvent néanmoins être prédits à partir de la méthode de Van Soest corrigés d'un biais et transformés par des équations (Partie 2 - Chapitre 6). Ces équations sont choisies en fonction de la nature phylogénétique de la biomasse analysée. De ce fait, nous pouvons désormais nous passer de la méthode NDE-SAH-LC-CAD. L'intérêt de ceci réside dans le fait que, par rapport à la méthode NDE-SAH-LC-CAD, la méthode de Van Soest est plus rapide, moins chère et est une méthode de référence pour estimer les teneurs en cellulose et en hémicelluloses mais elle est entachée d'un certain biais comme expliqué précédemment (au point 1.2). Notons que ces équations peuvent probablement être utilisées pour des biomasses végétales semblables à celles analysées lors de cette thèse. Pour appliquer ces équations, il faut veiller à rester entre les limites de la gamme de concentration de la variable permettant de la prédiction : de 0,121 à 0,555 $\text{kg}_{\text{Cellulose Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ et de 0,130 à 0,379 $\text{kg}_{\text{Hémicelluloses Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ pour les biomasses commélinoides, et de 0,053 à 0,660 $\text{kg}_{\text{Cellulose Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ et de 0,016 à 0,218 $\text{kg}_{\text{Hémicelluloses Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ pour les biomasses angiospermes non-commélinoides. Néanmoins, il sera nécessaire de réaliser l'analyse chimique par les méthodes NDE-SAH-LC-CAD et de Van

Soest pour confirmer l'utilisation de ces équations pour les prédictions faites sur ces nouvelles biomasses.

Dans le domaine des biomasses à vocation énergétique (par exemple pour la production de biocombustibles liquides de type alcool), nous pouvons donc nous satisfaire des prédictions données par nos équations de conversion des résultats de la méthode de Van Soest afin de classer avec une exactitude élevée les échantillons de biomasses en fonction de leurs teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en xylane. Néanmoins, l'avantage de la méthode NDE-SAH-LC-CAD est d'également donner la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses (Partie 2 - Chapitres 5 et 6). Comme les hémicelluloses sont constituées de différents monosaccharides, cette méthode est nécessaire pour avoir une meilleure compréhension concernant la conversion des hémicelluloses en biocombustibles liquides de type alcool (Partie 2 - Chapitre 6) (comme expliqué au point 2.1.).

1.4. Conclusions

La méthode NDE-SAH-LC-CAD s'avère appropriée pour le dosage de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses végétales en vue de les valoriser en énergie. Elle permet de quantifier ces deux polymères avec un degré élevé d'exactitude. Pour prendre en compte la dégradation des monosaccharides venant des de cellulose et des hémicelluloses, il est nécessaire de traiter en parallèle aux échantillons analysés un mélange de référence standard de monosaccharides.

En comparant la méthode NDE-SAH-LC-CAD et la méthode de Van Soest, nous avons montré que les résultats de la méthode NDE-SAH-LC-CAD peuvent néanmoins être prédits à partir de la méthode de Van Soest corrigés d'un biais et transformés par des équations. Ces équations sont choisies en fonction de la nature phylogénétique de la biomasse analysée. La méthode NDE-SAH-LC-CAD offre également l'avantage de pouvoir réaliser l'analyse en monosaccharides des hémicelluloses.

Notons que, pour la suite de la discussion générale, nous parlerons toujours des teneurs en cellulose et en hémicelluloses données par la méthode NDE-SAH-LC-CAD.

2. Composition chimique des biomasses végétales et leurs aptitudes aux conversions énergétiques

Nous avons acquis les connaissances de la composition chimique (y compris l'analyse en monosaccharides dans les hémicelluloses) et les aptitudes aux conversions énergétiques d'une grande diversité phylogénétique de biomasses végétales à maturités (Partie 3 - Chapitre 9). Il est nécessaire d'élargir nos connaissances à l'ensemble des biomasses végétales de façon à pouvoir les classer par catégorie correspondant chacune à des filières de valorisation énergétique qui leur conviennent le plus. Pour ce faire, nous avons dû utiliser notre méthode NDE-SAH-LC-CAD pour quantifier la cellulose, les hémicelluloses et la composition des hémicelluloses avec un degré élevé d'exactitude.

2.1. Classement des biomasses végétales

Nous avons mis en évidence que la grande diversité de composition chimique rencontrée dans les biomasses végétales à maturités peut se structurer en groupes ayant des liens avec l'origine phylogénétique (commélinoïde, angiosperme non-commélinoïde et gymnosperme) et leur teneur en fibres (niveau bas et haut) (Partie 3 - Chapitre 9). Les fibres correspondent à la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Le classement de cette grande diversité de biomasses en groupes présentant des propriétés chimiques similaires permet de simplifier l'orientation de celles-ci vers les filières de conversion énergétique adéquates. Pour mettre ces groupes en évidence, nous nous sommes basés sur une analyse en composantes principales appliquée à l'ensemble des compositions chimiques de biomasses végétales étudiées. Les biomasses végétales utilisées ont été récoltées en fin de croissance ou après un séchage hivernal sur pied. Comme l'état physiologique a un impact sur les propriétés chimiques de la biomasse végétale (l'explication se trouve au point 3.1.), ces groupes ne sont que d'application pour les états physiologiques considérés dans la présente analyse. Vu la diversité et la quantité de biomasses utilisées pour construire ces groupes de biomasses, ils peuvent être extrapolés à des biomasses semblables récoltées à un état physiologique équivalent.

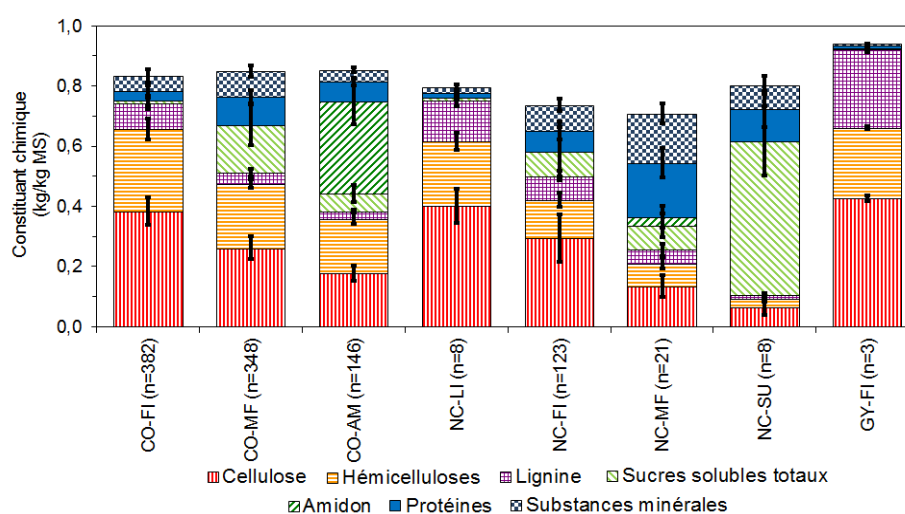
Analyse en composantes principales de la composition chimique

Les groupes formés par la première et la troisième composante de l'analyse en composantes principales de la composition chimique (c'est-à-dire des teneurs en principaux constituants chimiques) sont les suivants (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3) (Figure 1) :

- Biomasses commélinoïdes fibreuses (CO-FI) comme le miscanthus, le panic érigé, la paille d'épeautre, le roseau et le bambou. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont la cellulose et les hémicelluloses (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3) (Figure 1).
- Biomasses commélinoïdes moins fibreuses (CO-MF) comme la fétuque élevée, le dactyle, le seigle immature et le sorgho fibre, et les commélinoïdes riches en amidon (CO-AM) comme le maïs fibre. Les principaux constituants chimiques de ces deux groupes de biomasses sont la cellulose et les hémicelluloses ainsi que les sucres solubles pour les biomasses CO-MF et que l'amidon pour les biomasses CO-AM (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3) (Figure 1).
- Biomasses angiospermes non-commélinoïdes ligneuses (NC-LI) comme le bois de saule, de peuplier, de hêtre et de chêne, et les angiospermes non-commélinoïdes fibreuses (NC-FI) comme le chanvre, les fanes de topinambour, et la paille de colza, de lin et de tournesol. Les principaux constituants chimiques de ces deux groupes de biomasses sont la cellulose, les hémicelluloses ainsi que la lignine pour les NC-LI, et que les substances minérales et/ou la lignine pour les biomasses NC-FI (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3) (Figure 1).
- Biomasses angiospermes non-commélinoïdes moins fibreuses (NC-MF), comme les orties et les fanes de pomme de terre, de luzerne et de tomate. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont les protéines et les substances minérales (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3) (Figure 1).
- Biomasses angiospermes non-commélinoïdes riches en sucres solubles (NC-SU), comme les racines de chicon, les tubercules de topinambour et les bulbes d'oignon. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont les sucres solubles suivis de loin par les protéines et les substances minérales (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3) (Figure 1).
- Biomasses gymnospermes fibreuses (GY-FI) comme le bois d'épicéa, de pin et de mélèze. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont la

cellulose, les hémicelluloses et la lignine (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3) (Figure 1).

La composition chimique de chaque groupe de biomasse à maturité est reprise de manière quantitative à la Figure 1 et dans le Tableau A1 en annexe, et qualitative dans le Tableau 1. Une très faible variabilité est observée pour le groupe GY-FI car il n'est constitué que de trois biomasses (bois d'épicéa, de pin et de mélèze). Nous n'avons pas analysé la teneur en lipides car elles constituent une fraction négligeable des constituants des biomasses étudiées.



AM : Riche en amidon ; CO : Commélinéoïdes ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinéoïdes ; SU : Riche en sucres solubles

Figure 1. Composition chimique (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

Tableau 1. Composition chimique des différents groupes de biomasses à maturités

Type de biomasse	Teneur en cel. (kg/kg MS)	Teneur en hém. (kg/kg MS)	Teneur en lignine (kg/kg MS)	Teneur en sucres solubles totaux (kg/kg MS)	Teneur en protéines (kg/kg MS)	Teneur en substances minérales (kg/kg MS)
CO-FI	Extrém. élevée	Extrém. élevée	Faible	Extrém. faible	Très faible	Faible
CO-MF	Très élevée	Très élevée	Très faible	Très élevée	Interméd.	Elevée
CO-AM*	Interméd.	Elevée	Extrém. faible	Faible	Faible	Très faible
NC-LI	Extrém. élevée	Très élevée	Très élevée	Extrém. faible	Extrém. faible	Extrém. faible
NC-FI	Très élevée	Interméd.	Faible	Faible	Faible	Elevée
NC-MF	Faible	Très faible	Très faible	Faible	Extrém. élevée	Extrém. élevée
NC-SU	Très faible	Extrém. faible	Extrém. faible	Extrém. élevée	Interméd.	Elevée
GY-FI	Extrém. élevée	Très élevée	Extrém. élevée	Extrém. faible	Extrém. faible	Extrém. faible
Légende						
Extrém. faible	< 0,05	< 0,04	< 0,03	< 0,03	< 0,03	< 0,02
Très faible	0,05 à 0,10	0,04 à 0,08	0,03 à 0,06	0,03 à 0,06	0,03 à 0,06	0,02 à 0,04
Faible	0,10 à 0,15	0,08 à 0,12	0,06 à 0,09	0,06 à 0,09	0,06 à 0,09	0,04 à 0,06
Interméd.	0,15 à 0,20	0,12 à 0,16	0,09 à 0,12	0,09 à 0,12	0,09 à 0,12	0,06 à 0,08
Elevée	0,20 à 0,25	0,16 à 0,20	0,12 à 0,15	0,12 à 0,15	0,12 à 0,15	0,08 à 0,10
Très élevée	0,25 à 0,30	0,20 à 0,24	0,15 à 0,18	0,15 à 0,18	0,15 à 0,18	0,10 à 0,12
Extrém. élevée	≥ 0,30	≥ 0,24	≥ 0,18	≥ 0,18	≥ 0,18	≥ 0,12

*, Les biomasses CO-AM possèdent également une teneur élevée en amidon
 AM : Riche en amidon ; cel : Cellulose ; CO : Commélinoides ; Extrém. : Extrêmement ;
 FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; Hém. : Hémicelluloses ; Interméd. : Intermédiaire ;
 LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ;
 SU : Riche en sucres solubles

Le clivage entre ces groupes s'explique par l'importante variabilité expliquée par la première et la troisième composante principale (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3, et Tableaux 1 et 2) :

- La première composante permet le clivage entre les biomasses fibreuses et les moins fibreuses. Ce clivage s'explique par l'importante corrélation de cette composante, qui est positive avec les teneurs en constituants structuraux (cellulose, hémicelluloses et lignine) mais elle est négative avec les teneurs en

constituants non-structuraux. Les teneurs de ces deux constituants sont corrélées négativement car ces constituants sont complémentaires dans la matière organique (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2). Les biomasses fibreuses ont une part importante de tiges dont les parois cellulaires sont plus lignifiées (riches en parois secondaires) et contiennent plus de fibres (cellulose, hémicelluloses et lignine) (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2). A l'inverse, les biomasses moins fibreuses ont une part importante de feuilles dont les parois primaires sont plus riches en pectines, les parois secondaires sont moins lignifiées et dont les cytoplasmes cellulaires ont probablement des teneurs élevées en constituants non-structuraux et en substances minérales (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2).

- La troisième composante permet le clivage entre les biomasses commélinoides et angiospermes non-commélinoides. Ce clivage s'explique par l'importante corrélation de cette composante avec la teneur en hémicelluloses. Les biomasses commélinoides sont connues pour leur teneur plus élevée en hémicelluloses (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2) et leur teneur plus faible en pectines par rapport aux biomasses angiospermes non-commélinoides (Carpita et al. 2000). Dans les biomasses angiospermes non-commélinoides, les pectines se substituent aux hémicelluloses (Carpita et al. 2000).

La deuxième composante explique également une variabilité importante (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3, et Tableau 1). Elle est fortement corrélée avec la teneur en substances minérales (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3, et Tableau 2). Néanmoins, elle ne permet pas le clivage entre les biomasses commélinoides et angiospermes non-commélinoides, lequel est basé sur la teneur en hémicelluloses. De ce fait, cette composante n'a pas été retenue pour la présente analyse. Par contre, tout comme la première composante, elle permet le clivage entre les biomasses fibreuses et les moins fibreuses car la teneur substances minérales est corrélée positivement avec les constituants non-structuraux et négativement avec les constituants structuraux (cellulose, hémicelluloses et lignine) (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3, et Tableaux 1 et 2). Ce clivage s'explique comme pour celui entre les biomasses fibreuses et les moins fibreuses au niveau de la première composante principale. Ce clivage est moins significatif qu'avec la première composante principale, cette dernière expliquant bien plus de variabilité.

Notons que la teneur en lignine permet de distinguer les biomasses moins évoluées (gymnospermes) de celles qui les sont plus évoluées (angiospermes) (Figure 1).

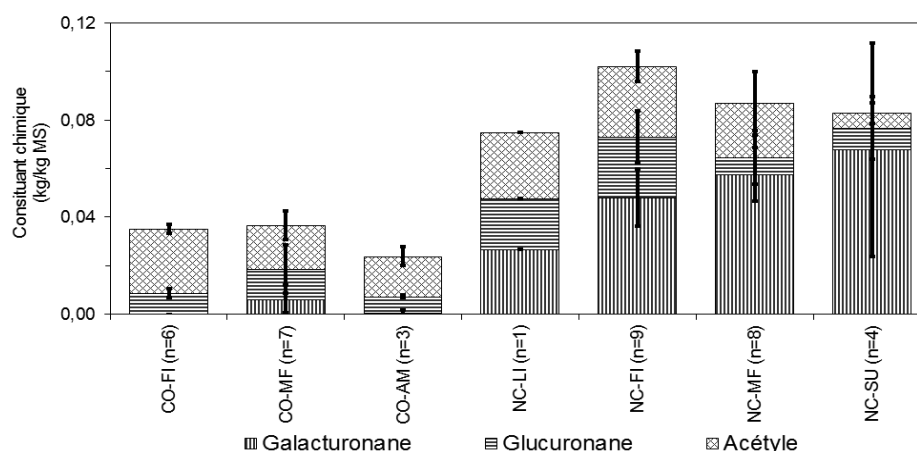
Remarque

Remarquons qu'une fraction de 0,06 à 0,26 kg/kg MS de constituants non-identifiés est observée au niveau du profil de la composition chimique des biomasses végétales à maturités (Figure 1 ; Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2). Cette fraction est vraisemblablement composée d'hydrates de carbone (comme les pectines), de lignine soluble en milieu acide, d'acides organiques, d'alcools, de pigments et de lipides, comme le suggère Hames (2009).

Sur un ou plusieurs échantillons des groupes de biomasse végétale à maturité (à l'exception de celui des gymnospermes fibreux), nous avons dosé trois constituants mineurs (Figure 2 et Tableau A5 en annexe): les teneurs en galacturonane, en glucuronane et en acétyle. Galacturonane est le terme utilisé pour exprimer le contenu en acide D-galacturonique des pectines et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités d'acide D-galacturonique s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère d'acide D-galacturonique, et non en d'acide D-galacturonique). Ce constituant est un indicateur de la teneur en pectines car elles sont composées d'environ 70% d'acide D-galacturonique (Mohnen, 2008). Glucuronane est le terme utilisé pour exprimer le contenu en acide D-glucuronique dans les hémicelluloses. Il peut également se retrouver dans d'autres polysaccharides comme les pectines, les gommes et les mucilages. Ce terme permet également de tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités d'acide D-glucuronique s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère d'acide D-glucuronique, et non en d'acide D-glucuronique). Dans les hémicelluloses, les résidus d'acide D-glucuronique sont liés à la chaîne principale des hémicelluloses de type glucuronoarabinoxylane (Carpita et al., 2000 ; Southgate, 1995). Acétyle est le terme utilisé pour exprimer le contenu en acide acétique des hémicelluloses et des pectines et tenir compte, dans la communication des résultats gravimétriques, que la polymérisation des unités d'acide acétique s'accompagne de la perte d'une molécule

d'eau (résultats gravimétriques exprimés en polymère d'acide acétique, et non en d'acide acétique). Nous avons quantifié ces trois constituants en adaptant la méthode de Garna et al. (2006). Ce dosage consiste en une extraction au méthanol 80% (v:v) et une extraction à l'acétone, suivie d'une hydrolyse à l'acide sulfurique 0,4 N pendant 48h à 80°C et d'une hydrolyse par des pectinases (Viscozyme L dans un tampon formiate à pH 5) pendant 24h à 50°C pour quantifier ces trois molécules par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV.

Ce dosage montre que, dans les biomasses commélinoides (riches en hémicelluloses), il y a très peu de pectines, de 0,000 à 0,006 kg_{Galacturonane}/kg MS (Figure 2 et Tableau A5 en annexe), par rapport aux biomasses non-commélinoides angiospermes (pauvres en hémicelluloses) où il y a beaucoup plus de pectines, de 0,027 à 0,068 kg_{Galacturonane}/kg MS (Figure 2 et Tableau A5 en annexe). Ces analyses ont montré que, au niveau de la composition chimique, la teneur en galacturonane est le mieux corrélée à la teneur en hémicelluloses (Corrélation de -0,816 ; $p < 0,001$; $n=38$). Ces résultats sur les pectines et ceux de la composition chimique des biomasses végétales à maturités confirment le clivage phylogénétique par la composition chimique entre les biomasses commélinoides et non-commélinoides angiospermes. Les biomasses commélinoides sont plus riches en hémicelluloses, qui se substituent aux pectines, par rapport aux biomasses angiospermes non-commélinoides plus riches en pectines, qui se substituent aux hémicelluloses. Cette quantification nous montre également que le glucuronane (de 0,007 à 0,025 kg_{Glucuronane}/kg MS) et l'acétyl (de 0,006 à 0,027 kg_{Acétyl}/kg MS) font partie de la fraction de constituants non-identifiés.



AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Figure 2. Constituants chimiques mineurs (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

Analyse en composantes principales de la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses

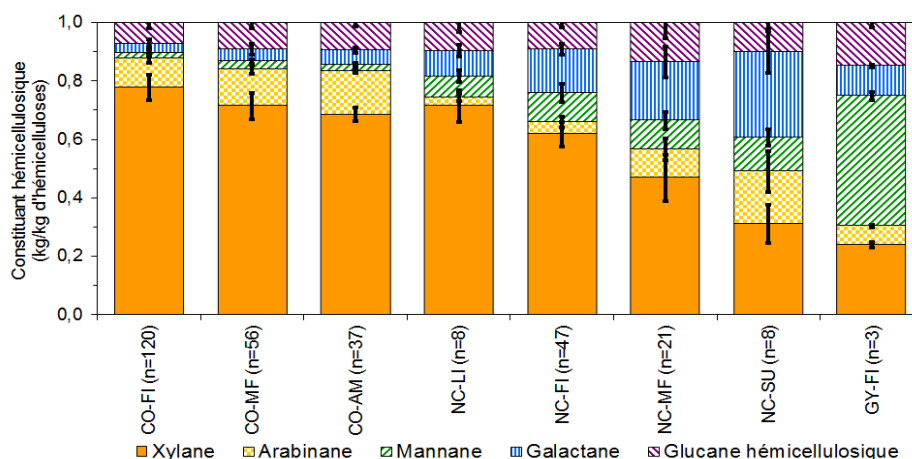
Les principaux groupes phylogénétiques se retrouvent également avec la première et la troisième composante de l'analyse en composantes principales de la composition relative en monosaccharides dans les hémicelluloses. Ces groupes sont les suivants les (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5) (Figure 3) :

- Biomasses commélinoides où les teneurs relatives en monomères dans les hémicelluloses sont, en ordre décroissant d'importance, le xylane, l'arabinane, le glucane hémicellulosique, le galactane et le mannane (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5 haut). Les commélinoides sont connues pour leurs teneurs élevées en arabinoxylane et en β -glucane par rapport aux angiospermes non-commélinoides (Carpita et al., 2000). Il y a une tendance du groupe des commélinoides à se diviser entre les biomasses fibreuses et les moins fibreuses.
- Biomasses angiospermes non-commélinoides où la teneur relative en xylane+arabinane dans les hémicelluloses est moindre et la teneur relative en glucane hémicellulosique+galactane+mannane dans les hémicelluloses est plus élevée par rapport aux biomasses commélinoides (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5 haut). Les angiospermes non-commélinoides sont connues pour leurs teneurs

élevées en xyloglucane et en mannane par rapport aux commélinoides (Carpita et al., 2000). Il y a une tendance du groupe des angiospermes non-commélinoides à se diviser entre biomasses fibreuses, moins fibreuses et riches en sucres solubles (qui correspondent au glucose, au fructose, au saccharose et aux fructanes). Cette subdivision correspond à des teneurs relatives en arabinane et en galactane dans les hémicelluloses croissantes, exceptée pour les fanes de betteraves qui possèdent une teneur relative en arabinane très élevée dans les hémicelluloses.

- Biomasses gymnospermes où les teneurs relatives en mannane dans les hémicelluloses sont plus élevées par rapport aux biomasses angiospermes (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5 haut). Les gymnospermes sont connus pour cela (Carpita et al., 2000). La teneur en mannane permet de distinguer les biomasses les moins évoluées (gymnospermes) de celles qui sont plus évoluées (angiospermes). (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5 haut).

La composition relative en monosaccharides dans les hémicelluloses de chaque groupe de biomasse à maturité est reprise de manière quantitative à la Figure 3 et dans le Tableau A2 en annexe, et qualitative dans le Tableau 2. Une très faible variabilité est observée pour le groupe GY-FI car il n'est constitué que de trois biomasses (bois d'épicéa, de pin et de mélèze).



AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Figure 3. Composition relative en monosaccharides dans les hémicelluloses (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturité

Tableau 2. Composition relative en monosaccharides dans les hémicelluloses des différents groupes de biomasses à maturité

Type de biomasse	Teneur relative en xylane	Teneur relative en arabinane	Teneur relative en mannane	Teneur relative en galactane	Teneur relative en glucane hémicellulosique
Nombre de carbone du monosaccharide	5	5	6	6	6
CO-FI	Extrém. élevée	Intermédi.	Extrém. faible	Extrém. faible	Faible
CO-MF	Très élevée	Elevée	Extrém. faible	Très faible	Intermédi.
CO-AM	Très élevée	Elevée	Extrém. faible	Très faible	Intermédi.
NC-LI	Très élevée	Très faible	Faible	Faible	Intermédi.
NC-FI	Elevée	Très faible	Intermédi.	Intermédi.	Intermédi.
NC-MF	Intermédi.	Intermédi.	Intermédi.	Très élevée	Elevée
NC-SU	Très faible	Très élevée	Intermédi.	Extrém. élevée	Intermédi.
GY-FI	Extrém. faible	Faible	Extrém. élevée	Faible	Elevée

Légende					
Extrém. faible	< 0,25	< 0,03	< 0,03	< 0,04	< 0,03
Très faible	0,25 à 0,35	0,03 à 0,06	0,03 à 0,06	0,04 à 0,08	0,03 à 0,06
Faible	0,35 à 0,45	0,06 à 0,09	0,06 à 0,09	0,08 à 0,12	0,06 à 0,09
Intermédi.	0,45 à 0,55	0,09 à 0,12	0,09 à 0,12	0,12 à 0,16	0,09 à 0,12
Elevée	0,55 à 0,65	0,12 à 0,15	0,12 à 0,15	0,16 à 0,20	0,12 à 0,15
Très élevée	0,65 à 0,75	0,15 à 0,18	0,15 à 0,18	0,20 à 0,24	0,15 à 0,18
Extrém. élevée	≥ 0,75	≥ 0,18	≥ 0,18	≥ 0,24	≥ 0,18

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; Extrém. : Extrêmement ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; Intermédi. : Intermédiaire ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Le clivage entre ces groupes reflète l'importante variabilité expliquée par la première et la deuxième composante principale (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5, et Tableaux 3 et 4) :

- La première composante permet le clivage entre les biomasses commélinoides, angiospermes non-commélinoides et les gymnospermes. Ce clivage s'explique par l'importante corrélation négative de cette composante avec la teneur relative en xylane dans les hémicelluloses mais positive avec les teneurs relatives en galactane et en mannane dans les hémicelluloses. Les teneurs en xyloglucane

(contenant également du galactane) et en mannane (contenant également du galactane et du glucane hémicellulosique) sont connues pour être élevées dans les biomasse non-commélinoides par aux biomasses commélinoides (Carpita et al., 2000). Par contre, la teneur en arabinoxylane est connue pour être faible dans les biomasse non-commélinoides par rapport aux biomasses commélinoides (Carpita et al., 2000). Les biomasses gymnospermes sont séparées des biomasses du fait de leur teneur particulière élevée en mannane. La subdivision tendant à se former entre les biomasses fibreuses et les moins fibreuses s'explique également par les différences entre les teneurs des différents types d'hémicelluloses. L'étude de la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses en fonction de la maturité de la biomasse (Partie 3 - Chapitre 8 - Point 3.2.) nous a indiqué que la teneur relative xylane dans les hémicelluloses est plus élevée dans les biomasses fibreuses, qui sont riches en parois secondaires plus lignifiées, par rapport aux biomasses moins fibreuses. La teneur relative en glucane hémicellulosique est plus élevée dans les biomasses moins fibreuses, qui sont riches en parois primaires, par rapport aux biomasses fibreuses. Cela s'explique probablement par des teneurs relatives en β -glucane et en xyloglucane dans les hémicelluloses plus élevées dans les parois primaires et par une teneur relative en arabinoxylane dans les hémicelluloses plus élevée dans les parois secondaires.

- La deuxième composante permet également le clivage entre les biomasses commélinoides et les non-commélinoides. Ce clivage s'explique par l'importante corrélation de cette composante avec la teneur relative en arabinane dans les hémicelluloses. Les biomasses commélinoides sont connues pour leur teneur en arabinoxylane plus élevée par rapport aux biomasses non-commélinoides (Carpita et al., 2000). Nous observons que la subdivision tendant à se former entre les biomasses fibreuses et les moins fibreuses s'explique également par la teneur relative en arabinane dans les hémicelluloses. L'arabinoxylane est plus substitué dans les parois primaires que dans les parois secondaires plus lignifiées (Carpita et al., 2000).

La troisième composante principale explique également une variabilité importante (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5, et Tableau 3). Elle est corrélée avec la teneur relative en glucane dans les hémicelluloses. Ce paramètre tend également à

discriminer les biomasses fibreuses de celles qui sont moins fibreuses mais dans une moindre mesure que la première et la deuxième composante principale.

Le classement de cette grande diversité de biomasses végétales à maturités en groupes présentant une composition des hémicelluloses similaires permet d'orientation celles-ci vers les filières de conversion des hémicelluloses adéquates. Pour la filière de conversion des hémicelluloses en biocombustibles liquides de type alcool (comme l'éthanol et le butanol), ces groupes permettent d'orienter le choix des cocktails enzymatique à appliquer pour l'hydrolyse des hémicelluloses en monosaccharides ainsi que des microorganismes à utiliser pour la fermentation en alcool de ces monosaccharides. En général, les hémicelluloses sont principalement constituées de monosaccharides à cinq carbones (D-xylose et L-arabinose). Pour hydrolyse des hémicelluloses, il faut donc veiller à en optimiser l'hydrolyse par les xylanases et les arabinases ; sauf les arabinases pour les biomasses NC-LI et NC-FI. Ces deux groupes de biomasses possèdent des hémicelluloses constituées de très peu d'arabinane (Figure 3). Pour la fermentation des monosaccharides issus des hémicelluloses, il faut choisir des microorganismes permettant une fermentation alcoolique optimale du D-xylose et de L-arabinose ; sauf la fermentation du L-arabinose pour les biomasses NC-LI et NC-FI (comme expliqué pour les arabinases). Par contre, pour les biomasses GY-FI, il faut suivre une stratégie différente car elles possèdent des hémicelluloses principalement constituées de mannane (un monosaccharide à six carbones). Il faut donc veiller à optimiser l'hydrolyse des hémicelluloses par les mannases et de choisir des microorganismes permettant une fermentation alcoolique optimale du mannose.

Notons que, vu la faible teneur en hémicelluloses des biomasses commélinoides non ligneuses (c'est-à-dire les biomasses NC-FI, NC-MF et NC-SU) (Figure 1 et Tableau A1 en annexe), une valorisation spécifique de leurs hémicelluloses n'est pas probablement pas opportune. C'est certainement le cas pour les NC-SU dont la teneur en hémicelluloses est extrêmement faible (0,029 d'hémicelluloses kg/kg MS).

Classement des biomasses végétales immatures

En positionnant les biomasses végétales immatures dans les graphiques des scores des deux analyses en composantes (Partie 3 - Chapitre 9 - Figures 3 et 5), nous observons que seuls les stades de maturité les plus précoces sortent du groupe de biomasse auquel la biomasse appartient. Pour le sorgho fibre, la fétuque élevée, le dactyle et le panic érigé, cela concerne uniquement le premier stade de maturité (Partie 3 - Chapitre 8). Pour l'épeautre, le maïs fibre, le chanvre et le topinambour (partie aérienne), cela concerne les deux premiers stades de maturité (Partie 3 - Chapitre 8). Toutefois, ces biomasses immatures commélinoides et non-commélinoides angiospermes restent à proximités de leur groupe phylogénétique respectif.

Sur le graphique des scores de l'analyse en composantes principales de la composition chimique (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3), ces biomasses immatures se déplacent en diagonale montante vers la gauche par rapport à leur groupe d'appartenance. Ce déplacement s'explique par des teneurs moins élevées en constituants structuraux (surtout en lignine) et des teneurs plus élevées en constituant non-structuraux (surtout en protéines et en substances minérales) dans ces biomasses moins fibreuses comme expliqué pour le clivage entre les biomasses fibreuses et moins fibreuses. Ces biomasses immatures de chanvre et de topinambour se trouvent dans le groupe des angiospermes non-commélinoides moins fibreuses. Ces biomasses immatures commélinoides forment un nouveau groupe.

Sur le graphique des scores de l'analyse en composantes principales de la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 5), ces biomasses immatures se déplacent en diagonale descendante vers la droite par rapport à leur groupe d'appartenance. Ce déplacement s'explique par des teneurs relatives en xylane et en glucane dans les hémicelluloses, respectivement, moins et plus élevées dans ces biomasses moins fibreuses comme expliqué pour le clivage tendant à se former entre les biomasses fibreuses et moins fibreuses. Ces biomasses immatures de chanvre et de topinambour se trouvent dans le groupe des angiospermes non-commélinoides moins fibreuses. Ces biomasses immatures commélinoides restent très proches de leur groupe d'appartenance.

2.2. Aptitudes des biomasses végétales à être converties en énergie

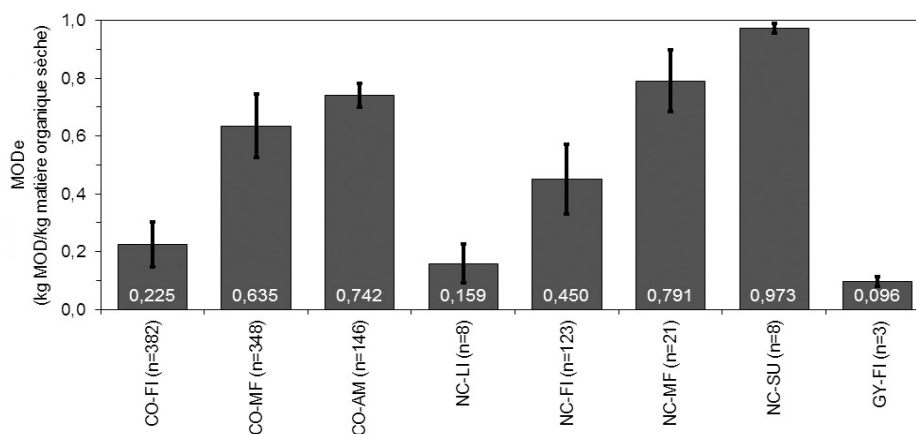
Nous avons également évalué les aptitudes des groupes de biomasses définis précédemment (au point 2.1.) à être converties en 3 vecteurs énergétiques (Partie 3 - Chapitre 9). Pour ce faire, nous avons quantifié expérimentalement la digestibilité enzymatique de la matière organique (pris comme indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse) et le pouvoir calorifique supérieur de ces biomasses (pris comme indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse). Nous avons aussi prédit leur potentiel de production de bioéthanol (sur base de leur composition en hydrates de carbone structuraux et non structuraux).

Matière organique digestible enzymatiquement

Pour la matière organique digestible enzymatiquement (MODE) (pris comme indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse), nous observons une gamme importante de valeurs (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 6) (Figure 4 et Tableau A3 en annexe). Elle s'étend de 5 à 100% de la matière organique. Les biomasses ayant des faibles teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine possèdent les MODE les plus élevées (Partie 3 - Chapitre 9 - Tableau 5 - Figures 2 et 7). Ceci s'explique par la présence de teneurs élevées en sucres solubles, en amidon et/ou en protéines, qui font parties de la MODE, et par la digestibilité nettement moins importante de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine par rapport aux constituants non-structuraux (De Boever et al., 1986). Ces biomasses moins fibreuses comportent une part importante de feuilles, elles sont constituées de nombreuses cellules riches en cytoplasme avec des teneurs élevées en composants non-structuraux, des parois cellulaires moins lignifiées et plus riches en pectines (Partie 3- Chapitre 9 - Point 3.4.). Les biomasses avec des MODE élevée ont généralement une teneur élevée en substances minérales (Figures 1 et 5) car elles sont constituées d'une partie importante de feuilles comme expliqué ci-dessus. Cette teneur en composés minéraux apportée à la digestion anaérobie est utilisée par les microorganismes pour digérer la biomasse.

Parmi les groupes de biomasses à maturités définis, celui avec la MODe la plus élevée est le groupe NC-SU (biomasses très riches en sucres solubles) suivi des groupes NC-MF (biomasses très riches en protéines), CO-AM (biomasses très riches en amidon) et CO-MF (biomasses riches en sucres solubles) (Figures 1 et 3). Les biomasses de ces groupes présentent une aptitude favorable à être convertie par digestion anaérobie sans prétraitement car leur MODe est élevée (Figures 3). Elles ont des teneurs importantes en constituants non-structuraux facilement digestibles. Par contre, les biomasses des groupes GY-FI, NC-LI et CO-FI possèdent une aptitude très peu favorable à être transformée par digestion anaérobie sans prétraitement car leur MODe est très basse (Figure 4). Elles ont des teneurs importantes en constituants structuraux (cellulose, hémicelluloses et lignine) (Figure 1) qui sont difficilement digestibles. Une très faible variabilité est observée pour le groupe GY-FI car il n'est constitué que de trois biomasses (bois d'érable, de pin et de mélèze). Nous pouvons considérer que la MODe correspond à un niveau minimum identifiable pour la digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse car cette conversion biologique digère au moins autant que les enzymes utilisées dans la méthode utilisée pour doser la MODe.

La discussion concernant l'aptitude des biomasses à être convertie par digestion anaérobie sans prétraitement est approfondie aux points 4 et 5.2.



AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MODe : Matière organique digestible enzymatiquement ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

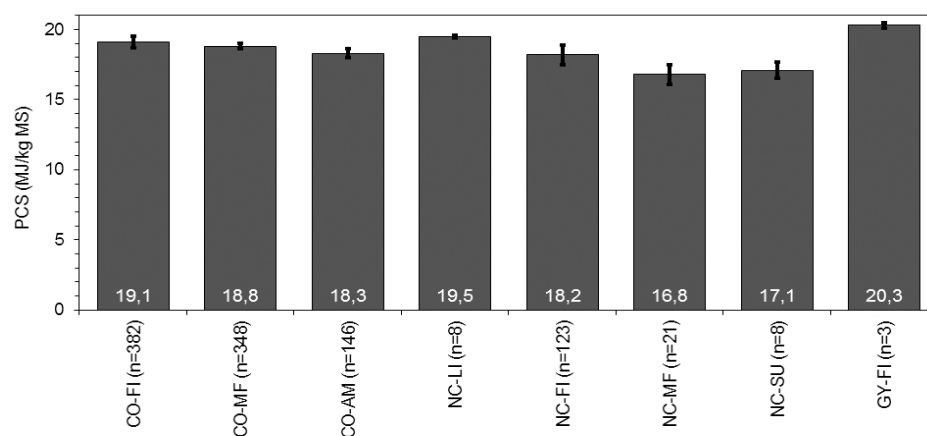
Figure 4. MODe (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

Pouvoir calorifique supérieur

Pour le pouvoir calorifique supérieur (PCS ; pris comme indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse), malgré la grande diversité de biomasses, nous observons une gamme peu étendue, de 16 à 20 MJ/kg MS (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 8) (Figure 5 et Tableau A3 en annexe). Cela s'explique par le fait que le PCS dépend principalement de la matière organique (qui est le complément des substances minérales) dont la teneur observée est peu variable (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2) et dont la composition chimique n'influence que très peu le PCS (Partie 3 - Chapitre 9 - Point 3.6.). Pour les biomasses oléagineuses, la composition chimique a impact sur le PCS car il dépend de leur teneur en lipides qui ont un PCS très élevé (Ballerini et al., 2006). Ce type de biomasse n'a pas été analysé lors de cette thèse. Les biomasses riches en lignine offrent un PCS légèrement plus élevé car la lignine possède un PCS spécifique plus élevé que les autres constituants mesurés (Partie 3 - Chapitre 9 - Point 3.6.). Ces biomasses sont constituées d'une part importante de tiges qui ont une teneur élevée en matière organique et des parois secondaires plus lignifiées (Partie 3- Chapitre 9 - Point 3.6.).

Parmi les groupes de biomasses à maturités définis, celui avec le PCS le plus élevé est le groupe GY-FI (biomasses très riches en matière organique ainsi qu'en lignine) suivi des groupes NC-LI (biomasses riches en matière organique ainsi qu'en lignine) et CO-FI (biomasses riches en matière organique) (Figures 1 et 5). Les biomasses de ces groupes présentent une aptitude favorable à être convertie par combustion après déshydratation car leur PCS est élevé (Figures 4). Elles ont des teneurs élevées en matière organique et en lignine. De ce fait, la production de mâchefers, pouvant être problématique lors de la combustion, est moindre car la teneur en substances minérales est faible dans ces biomasses (l'explication se trouve au point 5.2.). Les biomasses de ces groupes possèdent également une faible teneur en azote car leur teneur en protéines est faible (Figure 1) Cette moindre teneur en azote est bénéfique car, lors de la combustion, cela évite la présence d'acides (comme l'acide nitrique) dans l'unité de transformation et de puissants gaz à effet de serre (les oxydes d'azote) dans les fumées (Defossez, 2009).

La discussion concernant l'aptitude des biomasses à être convertie par combustion est approfondie aux points 4 et 5.2.



AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; PCS : Pouvoir calorifique supérieur ; SU : Riche en sucres solubles

Figure 5. Pouvoir calorifique supérieur (représenté par les barres) des différents groupes de biomasses à maturités

Potentiel en bioéthanol

Pour le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux (cellulose et hémicelluloses dont la transformation en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse) et non-structuraux (sucres solubles et amidon), nous observons des gammes modérément étendues, respectivement, de 0,15 à 0,4 $l_{\text{ethanol}}/\text{kg MS}$, de 0,1 à 0,4 $l_{\text{ethanol}}/\text{kg MS}$ et de 0,1 à 0,3 $l_{\text{ethanol}}/\text{kg MS}$ (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 7) (Figure 6 et Tableau A4 en annexe). Le groupe des biomasses à maturités ayant le potentiel en bioéthanol total (issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux) le plus élevé est celui des biomasses CO-AM suivi des groupes CO-FI, NC-LI, CO-MF, NC-CO, GY-FI et NC-SU (Figure 5). En général, le potentiel en bioéthanol total dépend principalement des teneurs en cellulose et en hémicelluloses, excepté pour les groupes des biomasses NC-SU et CO-AM (Figure 5). Pour le groupe NC-SU (biomasses très riches en sucres solubles), le bioéthanol issu des hydrates de carbone non-structuraux représente la partie la plus importante du bioéthanol total (Figure 6). Pour le groupe CO-AM (biomasses très riches en amidon), le bioéthanol issu des hydrates de carbone non-structuraux représente environ la moitié du bioéthanol total (Figure 5). Pour les groupes de biomasses GY-FI, NC-LI et les plus fibreuses CO-FI (comme le miscanthus en fin d'hiver et le bambou), la production de bioéthanol issu des

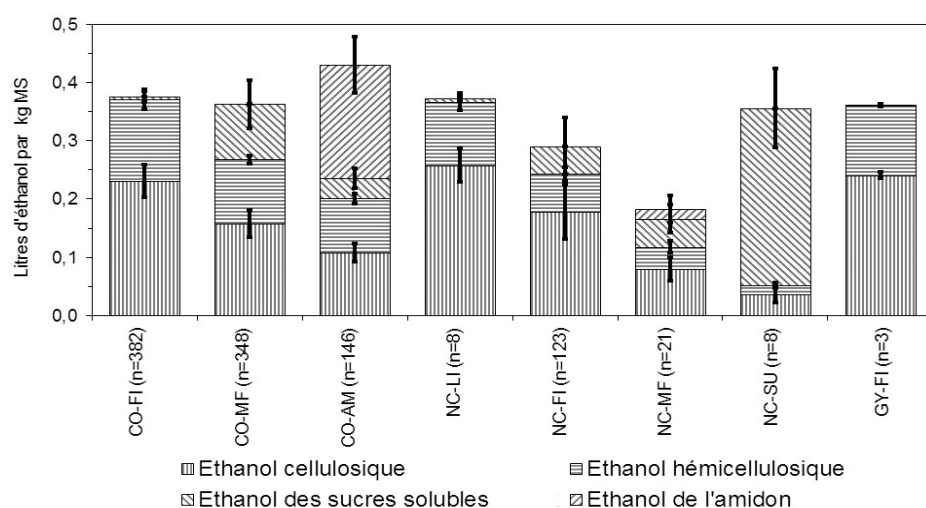
hydrates de carbone structuraux nécessite un prétraitement plus intense du fait de leur haute teneur en lignine (l'explication se trouve au point 5.2.). Sans prétraitement, la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux n'atteint que 20% de son potentiel (Balat et al., 2008). Une très faible variabilité est observée pour le groupe GY-FI car il n'est constitué que de trois biomasses (bois d'épicéa, de pin et de mélèze).

Pour la production de bioéthanol par fermentation éthanolique, il faut s'assurer que la teneur en éthanol du liquide après fermentation est assez élevée car l'énergie nécessaire à la distillation de l'éthanol contenu dans ce liquide augmente très fortement avec la diminution de leur teneur en éthanol (Galbe et al., 2007) (voir le point 5.2.). Pour que le coût énergétique nécessaire à la distillation ne soit pas rédhibitoire, il faut que la teneur en matière sèche et la teneur de chaque hydrate de carbone à fermenter soient assez élevées. Il est généralement considéré que la teneur en éthanol doit être d'au moins 3 à 4% (v/v) d'éthanol pour que le coût énergétique de distillation du liquide après fermentation soit raisonnable (Galbe et al., 2007).

Comme la fermentation éthanolique des biomasses valorise les hydrates de carbone, les autres constituants chimiques de la biomasse seront encore présents en sortie de cette production. Les effluents solides issus de la fermentation éthanolique seront riches en matières organiques (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Pour les biomasses GY-FI, NC-LI et CO-FI, ces effluents de constituants très peu solubles seront plutôt riches en constituants peu digestibles (principalement la lignine) car elles sont riches en ces constituants (Figure 1). Les effluents solides issus de la fermentation éthanolique de ces biomasses seront donc probablement favorables à être utilisés en combustion après déshydratation. Ce séchage est nécessaire car ces effluents auront une teneur élevée en eau qui est responsable de la perte importante d'énergie nette disponible à la combustion (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Pour les autres groupes de biomasses, les effluents solides seront également composés de constituants digestibles (comme les protéines) car elles sont riches en ces constituants (Figure 1). Les effluents solides issus de la fermentation éthanolique de ces biomasses seront donc probablement favorables à être utilisés en combustion après déshydratation et en digestion anaérobie sans prétraitement. Pour les effluents liquides issus de la fermentation éthanolique, comme ils seront composés de constituants solubles, ils seront très digestibles et

donc favorables à une conversion par digestion anaérobie sans prétraitement. Néanmoins, vu la quantité et la teneur élevée en eau à la sortie de la production de bioéthanol, les effluents liquides seront très dilués par l'eau (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007). Notons que les effluents solides et liquides issus de la fermentation éthanolique peuvent également être utilisés pour d'autres valorisations que celles en énergie. Ils peuvent, par exemple, être utilisés pour la production de bioproduits et d'aliment pour animaux (Kamm et al., 2004 ; Kamm et al., 2007).

La discussion concernant le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux est approfondie aux points 4 et 5.2.



AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Figure 6. Potentiel en bioéthanol (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

2.3. Conclusions

La détermination de la composition chimique de biomasses végétales à maturités et d'origines phylogénétiques variées a montré que chacune d'entre elles possèdent une composition distincte. Néanmoins, notre analyse en composantes principales appliquée à l'ensemble de la composition chimique de biomasses végétales à maturités, nous a permis de mettre en évidence que ces biomasses peuvent se structurer en groupes présentant des propriétés chimiques similaires. Ces groupes sont liés à leur origine phylogénétique (commélinoïde, angiosperme non-

commélinéoïde et gymnosperme) et à leur teneur en fibres (niveau bas et haut). Le classement de ces biomasses permet de simplifier l'orientation de celles-ci vers les filières de conversion énergétique adéquates. Par une analyse en composantes principales, nous avons mis en évidence que les variables discriminantes des biomasses végétales à maturités :

- Les biomasses commélinéoïdes se distinguent des biomasses angiospermes non-commélinéoïdes par des teneurs élevées en xylane+arabinane dans les hémicelluloses, et en hémicelluloses totales ;
- Les biomasses gymnospermes se distinguent des biomasses plus évoluées (les angiospermes) par des teneurs très élevées en mannane dans les hémicelluloses et en lignine ;
- La teneur en substances minérales contribue fortement au clivage entre les biomasses fibreuses et moins fibreuses, probablement en lien avec le contenu cytoplasmique (contenant les sels minéraux) plus élevé des biomasses moins fibreuses.

Nous observons que l'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse (la MODe) et le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux (dont la transformation en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse) et non-structuraux des biomasses s'étendent sur des gammes étendues et dépendent fortement de la composition chimique. L'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse diminue avec l'augmentation des constituants les moins digestibles, à savoir : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. En général, le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux dépend principalement des teneurs en cellulose et en hémicelluloses, excepté pour les biomasses non-commélinéoïdes riches en sucres solubles, non-commélinéoïdes moins fibreuses et commélinéoïdes riches en amidon. Par contre, l'indicateur du potentiel d'une biomasse en combustion après sa déshydratation (le PCS) est peu variable avec la biomasse et ne dépend que de la teneur en matière organique. Il augmente avec la teneur en matière organique (qui est le complément des substances minérales). Notons que, pour les biomasses oléagineuses, la composition chimique a impact sur le PCS car il dépend de leur teneur en lipides qui ont un PCS très élevé. Ce type de biomasse n'a

pas été analysé lors de cette thèse donc ces conclusions ne peuvent pas s'appliquer à cette biomasse.

3. Composition chimique de biomasses fibreuses et leurs aptitudes aux conversions énergétiques

Il nous paraît particulièrement important d'approfondir l'étude de la composition chimique des espèces végétales fibreuses et leurs aptitudes aux conversions énergétiques car leur intérêt en tant que source d'énergie est manifeste et grandissant (ENERBIOM, 2012). Il convient donc d'explorer ces aspects afin d'évaluer la variabilité de leur composition chimique et leurs aptitudes aux conversions énergétiques en fonction de son état physiologique (Partie 3 - Chapitre 7) ainsi que de l'année, du site, de la variété et du niveau de fertilisation azotée (Partie 3 - Chapitre 8). Le choix des biomasses fibreuses étudiées est expliqué à la Partie 1 - Chapitre 1.

3.1. Influence de la maturité sur les propriétés chimiques de biomasses fibreuses

L'état physiologique de la biomasse est un paramètre important à prendre en compte pour sa valorisation. En effet, pour chaque biomasse fibreuse issue des essais agronomiques, nous avons montré que sa composition chimique et ses aptitudes aux conversions énergétiques dépendent de son état physiologique (Partie 3 - Chapitre 8 - Figures 2 haut, 3 haut, 3 bas, 4 haut, 5 haut et 6 haut). L'intérêt de cette étude est d'analyser des états physiologiques très contrastés afin de tester si pour certaines d'entre eux, ces biomasses fibreuses possèdent des propriétés chimiques plus favorables pour certaines valorisations énergétiques. Habituellement, les études de ce type se limitent seulement à des prélèvements très proches de la période de récolte normale, à la mesure du rendement en matière sèche par hectare et à la teneur en matière sèche (MS).

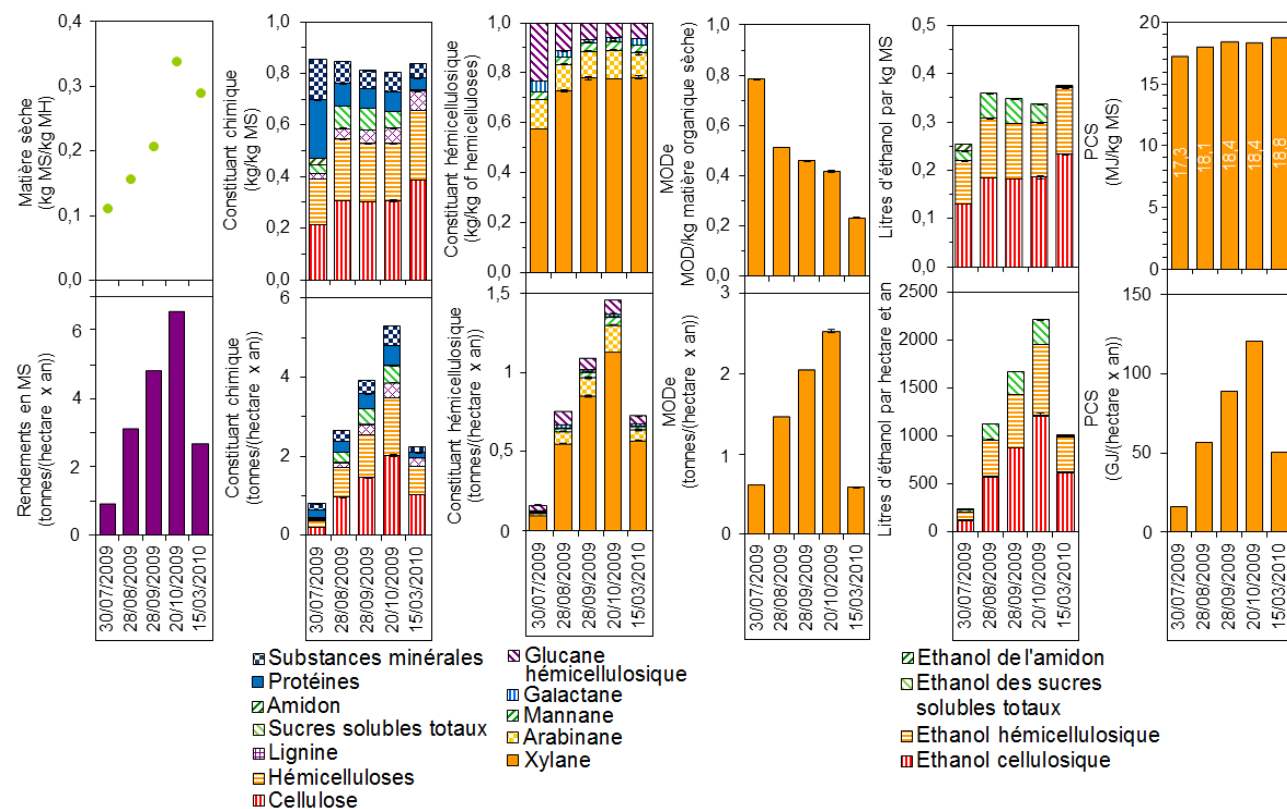
Une importante diminution de la MODe (pris comme indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse) avec la maturation est généralement observée (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 4 haut). Elle s'explique par la forte augmentation des teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine, qui sont peu digestibles, au cours de la croissance de la plante et du séchage hivernal (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut). Puisque nous avons considéré la plante entière, le maïs fibre ne suit pas cette tendance (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 4 haut) car, lors de sa croissance, de l'amidon (qui est digestible) (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut) apparaît au niveau de son épi. La part d'amidon étant une fraction importante de la plante, elle dilue les teneurs des autres constituants chimiques.

La faible augmentation du PCS (pris comme indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse) avec la maturation (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 6 haut) s'explique par la faible augmentation de la matière organique (qui est le complément des substances minérales) (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut) et par le fait que la composition chimique n'influence que très peu le PCS (Partie 3 - Chapitre 9 - Point 3.6.). Les teneurs des principaux constituants organiques évoluent différemment en fonction de l'état physiologique (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut) mais les PCS spécifiques à chaque constituant ne diffèrent pas assez pour que le PCS de la plante évolue fortement (Partie 3 - Chapitre 9 - Point 3.6.).

L'augmentation modérée du potentiel en bioéthanol total (issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux) avec la maturation (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 5 haut) s'explique également par l'augmentation, au cours de croissance de la plante et du séchage hivernal, des teneurs en cellulose et en hémicelluloses (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut). Ces deux polysaccharides permettent la production d'éthanol par fermentation éthanolique après hydrolyse (Spatari et al., 2010). Pour le maïs fibre, l'augmentation du potentiel en bioéthanol total (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 5 haut) s'explique par l'augmentation de la teneur en amidon, comme expliqué ci-dessus. Cette teneur importante en amidon dilue la teneur en fibres et permet au maïs fibre de posséder un potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone non-structuraux légèrement plus important que celui issu des hydrates de carbone structuraux (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 5 haut).

Pour la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses, au cours de la maturation de la plante et du séchage hivernal, la teneur relative en xylane dans les hémicelluloses augmente alors que la teneur relative en glucane dans les hémicelluloses diminue (Partie 3 - Chapitre 8 - Point 3.2.). En plus, pour les biomasses angiospermes non-commélinoides, une diminution des teneurs relatives en mannane dans les hémicelluloses est observée (Partie 3 - Chapitre 8 - Point 3.2.). Pour le maïs fibre, ces évolutions ne sont pas observées car de l'amidon apparait au niveau de son épi au cours de sa croissance (Partie 3 - Chapitre 8 - Point 3.2.), comme expliqué ci-dessus.

L'évolution de la MODE, du PCS, du potentiel en bioéthanol et de la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses est illustrée pour le sorgho fibre à la Figure 7.



MODE : Matière organique digestible enzymatiquement ; MH : Matière humide ; MS : Matière sèche ; PCS : Pouvoir calorifique supérieur

Figure 7. Composition chimique, aptitudes aux conversions énergétiques, rendement en matière sèche et teneur en matière sèche du sorgho fibre au cours de sa maturation

Les évolutions des propriétés chimiques des biomasses fibreuses étudiées (Partie 3 - Chapitre 8 - Figures 2 haut et 3 bas, 4 haut, 5 haut et 6 haut) s'expliquent généralement par la maturation de la plante au cours de laquelle ses parois primaires se lignifient et s'appauvrissent en pectines qui se chargent positivement dans les organes différenciés ; ses parois secondaires s'épaississent, se lignifient et s'enrichissent en arabinoxylane (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008) ; la part de feuilles diminue et la part de tiges augmente (Hatfield et al., 2007 ; Nizami et al., 2009). Cette évolution s'accélère généralement lors du séchage hivernal sur pied (Partie 3 - Chapitre 8 - Figures 2 haut, 3 haut, 3 bas, 4 haut, 5 haut et 6 haut) car, durant cette période, les feuilles chutent et, pour les plantes pérennes, les nutriments des tiges et/ou des feuilles sont transloqués vers les rhizomes (Cadoux et al., 2009). Les feuilles sont riches en cellules ayant des teneurs élevées en constituants non-structuraux, pauvres en parois secondaires lignifiées et riches en pectines (Hatfield et al., 2007 ; Nizami et al., 2009) qui ont une teneur élevée en arabinoxylane (Ishii, 1997 ; Vogel, 2008). Lors du séchage hivernal sur pied, nous observons bien une diminution de la teneur en substances minérales et en constituants chimiques les plus digestibles (sucres solubles et protéines), et une augmentation des teneurs en constituants structuraux (cellulose, hémicelluloses et lignine) (Partie 3 - Chapitre 7 - Figure 1 ; Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2). Puisque nous avons considéré la plante entière, seul le maïs fibre ne suit pas cette tendance pour l'évolution des propriétés chimiques avec la maturation (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 4 haut) car, lors de sa croissance, de l'amidon (qui est digestible) (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut) apparaît au niveau de son épi, comme expliqué ci-dessus. Cet amidon diminue la teneur des autres constituants chimiques car il les dilue.

La récolte du miscanthus et du panic érigé en automne entraîne l'utilisation accrue de fertilisants azotés (Cadoux et al., 2009). La production et l'utilisation de ces fertilisants engendrent une production accrue de gaz à effet de serre (Cadoux et al., 2009). La récolte en automne empêche la plante de transloquer ses nutriments vers ses rhizomes au cours de l'automne. En effet, pour la récolte de ces biomasses en fin d'hiver par rapport à l'automne, nous observons que la teneur en sucres solubles totaux devient nulle ou presque, la teneur en protéines diminue de moitié et la teneur en substances minérales diminue fortement (-70% pour le miscanthus et -

30% pour le panic érigé) (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut). Pour avoir les mêmes rendements en matière sèche par hectare de culture l'année suivante sans translocation des nutriments vers les rhizomes au cours de l'automne, ces biomasses nécessitent un niveau de fertilisation azoté plus élevé par rapport aux mêmes cultures récoltées en fin d'hiver (Cadoux et al., 2009). Nous pouvons expliquer ce phénomène par l'exportation des protéines, c'est-à-dire d'azote, qui est plus importante pour la récolte d'automne par rapport à celle de fin d'hiver (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2 haut) comme expliqué ci-dessus.

3.2. Variabilité des propriétés chimiques de biomasses fibreuses

Les procédés de valorisation de biomasse nécessitent une relative stabilité de la composition chimique et des aptitudes aux conversions énergétiques de la matière première afin que sa conversion se déroule de manière optimale (Kamm & Kamm, 2004 ; Kamm & Kamm, 2007). De ce fait, nous avons évalué la variabilité, pour un même état physiologique, des propriétés chimiques de chaque biomasse fibreuse issue des essais agronomiques. Pour ce faire, ces biomasses ont été produites selon différentes modalités de culture (sites, années, variétés et niveaux de fertilisation azotée). Les valeurs obtenues pour les paramètres étudiés sont relativement constantes pour chacune de ces biomasses fibreuses malgré la diversité de modalités de cultures (Partie 3 - Chapitre 7 - Figures 1 haut, 2 haut, 2 bas, 3 haut, 4 haut et 5 haut). Cette reproductibilité peut s'expliquer par la maturité à la récolte qui était toujours la même. Nous avons observé les plus grandes reproductibilités pour les teneurs des constituants structuraux (dont le coefficient de variation en moyenne se situe entre 8% et 13%) et les plus petites reproductibilités pour les teneurs des constituants non-structuraux (dont le coefficient de variation en moyenne se situe entre 19% et 38%) (Partie 3 - Chapitre 7 - Figure 1 haut et Tableau A1 en annexe). Ce phénomène peut s'expliquer par la variabilité du métabolisme de la plante liée à la photosynthèse où les constituants non-structuraux interviennent fortement à l'inverse des constituants structuraux. Selon le même raisonnement, les résultats pour la MODe (Partie 3 - Chapitre 7 - Figure 3 haut et Tableau A3 en annexe), qui dépend principalement des constituants non-structuraux, présentent une plus faible

reproductibilité que le potentiel en bioéthanol total (Partie 3 - Chapitre 7 - Figure 4 haut et Tableau A3 en annexe) ou le PCS (Partie 3 - Chapitre 7 - Figure 5 haut et Tableau A3 en annexe).

Nous avons observé que le facteur pédoclimatique (variable selon l'année et le site) est le principal responsable de la variabilité observée pour chacune de ces biomasses fibreuses à un même état physiologique (ENERBIOM, 2012). Le niveau de fertilisation azotée a un impact positif sur la teneur en protéines de la fétuque élevée, du sorgho fibre, du panic érigé et du maïs fibre.

3.3. Conclusions

L'état physiologique est un paramètre important à prendre en compte pour les procédés de valorisation d'une biomasse fibreuse car nous avons montré que sa composition chimique et ses aptitudes aux conversions énergétiques en dépendent. Généralement, pour chacune des biomasses fibreuses étudiées, au cours de la maturation de la plante :

- Les teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine augmentent ;
- Les teneurs en constituants non-structuraux diminuent ;
- La teneur relative en xylane dans les hémicelluloses augmente ;
- La teneur relative en glucane hémicellulosique diminue ;
- La matière organique digestible enzymatiquement (MODe), l'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse, diminue fortement ;
- Le pouvoir calorifique supérieur (PCS), l'indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse, augmente légèrement
- Le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone totaux augmente modérément.

Nous avons montré que, pour un même état physiologique, la composition chimique et les aptitudes aux conversions énergétiques de chaque biomasse fibreuse sont relativement constantes, malgré la diversité de modalités de cultures (sites, années, variétés et niveaux de fertilisation azotée) appliquées. De ce fait, pour chacune de ces biomasses à un même degré de maturation, les procédés de

valorisation ne nécessiteront que très peu d'optimisation liée à la variabilité de ses propriétés chimiques.

4. Evaluation des aptitudes aux conversions énergétiques

Pour chaque voie de conversion des biomasses en énergie, il existe des méthodes permettant d'évaluer leur aptitude à la conversion énergétique. Pour diminuer les coûts d'analyse liés à l'évaluation de ces différentes aptitudes, il serait intéressant d'évaluer cette aptitude sur base d'indicateurs communs. A cet effet, les paramètres pertinents de la composition chimique des biomasses pourraient être utilisés. La quantification de ces paramètres permettrait de classer les biomasses végétales en fonction de leur aptitude aux différentes conversions énergétiques et aiderait à prendre des décisions quant aux modes de productions et de transformation à leur appliquer.

4.1. Sélection des paramètres pertinents

Pour sélectionner les indicateurs pertinents de la composition chimique, nous avons réalisé une analyse spectrale des données de composition chimique et d'aptitudes de biomasses végétales aux conversions énergétiques par digestion anaérobie sans prétraitement, par combustion après déshydratation et par fermentation éthanolique (en distinguant l'origine du bioéthanol : hydrates de carbone structuraux ou non-structuraux). Cette analyse correspond à un procédé de réflexion permettant d'identifier ces variables (dites variables essentielles) pour ces biomasses par l'étude des interactions (Meurens, 2012, communication personnelle) entre la composition chimique de ces biomasses et leurs aptitudes aux conversions énergétiques. Notre sélection est d'abord basée sur le raisonnement exposé ci-dessous. Ensuite, nous avons raffiné cette sélection sur base d'analyses statistiques (analyses en composantes principales et de corrélations) (Partie 3 - Chapitre 9).

L'identification des variables essentielles a débuté avec la mise en place d'un raisonnement permettant d'évaluer les aptitudes d'une biomasse végétale aux conversions énergétiques, selon les trois voies de conversion étudiées. Nous avons schématisé ces aptitudes pour ces voies de conversion par les trois étapes de

transformation biologique des principaux constituants chimiques dosés lors de cette thèse. Ces étapes sont décrites ci-dessous et synthétisées dans le Tableau 3. Dans ce tableau, nous avons classé les constituants chimiques en ordre décroissant du degré de difficulté à les transformer par voie biologique.

1) Solubilisation dans l'eau :

- Facile pour les sucres solubles ;
- Modérée pour les constituants liés par de nombreux ponts hydrogènes et partiellement solubles tels que l'amidon et les protéines ;
- Difficile pour les constituants liés par de nombreux ponts hydrogènes et complètement insolubles tels que la cellulose et les hémicelluloses ;
- Extrêmement insoluble pour les constituants hydrophobes tels que la lignine.

2) Hydrolyse enzymatique :

- Facile pour les sucres solubles, l'amidon et les protéines car les microorganismes peuvent aisément les hydrolyser ;
- Modérée pour les hémicelluloses car tous les microorganismes ne sont pas aptes à les hydrolyser ;
- Difficile pour la cellulose car elle doit être décristallisée pour être hydrolysée et tous les microorganismes ne sont pas aptes à les hydrolyser ;
- Extrêmement résistant pour la lignine car les microorganismes ne disposent généralement pas de mécanismes pour la dégrader.

3) Fermentation des monomères :

- Facile pour les hexoses issus principalement des sucres solubles, de l'amidon et de la cellulose, et les acides aminés car les microorganismes peuvent aisément les fermenter ;
- Difficile pour les pentoses issus principalement des hémicelluloses car la fermentation des pentoses par les microorganismes est plus complexe que celles des hexoses ;
- Extrêmement résistante pour la lignine car les microorganismes ne disposent généralement pas de mécanismes pour la fermenter.

Nous n'avons pas pris en compte les substances minérales et lipides car, respectivement, elles ne sont pas converties en énergie et ils constituent une très faible fraction des constituants des biomasses étudiées.

Tableau 3. Les trois étapes de transformation des principaux constituants chimiques classés par ordre décroissant du degré de difficulté à les transformer par voie biologique

	Lignine	Cellulose	Hémicelluloses	Amidon	Protéines	Sucres solubles
<i>Solubilisation dans l'eau</i>						
Facile						X
Modérée				X	X	
Difficile		X	X			
Extrêmement difficile	X					
<i>Hydrolyse enzymatique</i>						
Facile				X	X	X
Modérée			X			
Difficile		X				
Extrêmement difficile	X					
<i>Fermentation des monomères</i>						
Facile		X		X	X	X
Difficile			X			
Extrêmement difficile	X					

Sur base de ce raisonnement, trois types de variables ressortent :

- Les principaux constituants non-structuraux (sucres solubles, amidon et protéines) qui sont très facilement transformés par voie biologique. Leur solubilisation, hydrolyse et fermentation sont aisées. Les principaux constituants non-structuraux sont donc des variables essentielles potentielles qui peuvent être utilisées pour prédire l'aptitude d'une biomasse à être convertie par digestion anaérobie sans prétraitement et par fermentation éthanolique des hydrates de carbone non-structuraux.
- La cellulose et les hémicelluloses dont la transformation par voie biologique est complexe. Leur solubilisation, hydrolyse et fermentation sont plus complexes que pour les constituants non-structuraux. Ces polysaccharides structuraux sont donc des variables essentielles potentielles qui peuvent être utilisées pour prédire

l'aptitude d'une biomasse à être convertie par fermentation éthanolique des hydrates de carbone structuraux (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3 et Tableau 2).

- La lignine qui est très résistante à une transformation par voie biologique. Elle possède un PCS spécifique plus élevé que les autres principaux constituants chimiques. La lignine est donc une variable essentielle potentielle qui peut être utilisée pour prédire l'aptitude d'une biomasse à être convertie par combustion après déshydratation. Il en est de même pour la fermentation éthanolique des hydrates de carbone structuraux en suivant le raisonnement exposé ci-dessus (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3 et Tableau 2). Toutefois, des teneurs très importantes en lignine sont moins favorables à la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux. En effet, elles nécessitent un prétraitement plus intense de la biomasse afin de libérer la cellulose et les hémicelluloses de la lignine qui les imprègne (l'explication se trouve au point 5.2).

La teneur en substances minérales peut également être utilisée comme une variable essentielle potentielle pour évaluer les aptitudes d'une biomasse aux conversions énergétiques. Cela s'explique par le fait que la teneur en substances minérales permet le clivage entre les biomasses fibreuses (riches en constituants structuraux et pauvres en constituants non-structuraux) et les moins fibreuses (pauvres en constituants structuraux et riches en constituants non-structuraux) au niveau de la deuxième composante principale de la composition chimique (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3). La teneur en substances minérales est, respectivement, corrélée positivement aux constituants non-structuraux et négativement aux constituants structuraux (cellulose, hémicelluloses et lignine) (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3 et Tableau 2).

En se basant sur cette sélection manuelle des variables essentielles potentielles et, ensuite, sur les analyses en composantes principales et de corrélations effectuées sur les biomasses végétales (Partie 3 - Chapitre 9), nous avons identifiés les variables essentielles suivantes pour évaluer les aptitudes de ces biomasses aux conversions énergétiques :

- Les teneurs en cellulose et en hémicelluloses sont les variables essentielles permettant d'apporter le plus d'informations liées à la teneur en constituants structuraux. La présence de la teneur en cellulose et en hémicelluloses en tant que variables essentielles s'explique par leurs importances, respectivement, dans la première et dans la troisième composante principale des constituants chimiques (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3 et Tableau 1). Ces deux variables contiennent l'information liée à la MODe, au PCS et au potentiel en bioéthanol, car elles sont fortement corrélées à ces variables (Partie 3 - Chapitre 9 - Tableau 5). Ces deux variables sont également fortement corrélées à la teneur en lignine (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3 et Tableau 2). De ce fait, cette dernière n'est plus nécessaire afin d'évaluer les aptitudes aux conversions énergétiques.
- La teneur en substances minérales est une variable essentielle permettant d'apporter de l'information tant sur la cellulose, les hémicelluloses et la lignine que sur les non-structuraux. Cela s'explique par le rôle prépondérant de la teneur en substances minérales dans la deuxième composante principale des principaux constituants chimiques (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 3 et Tableau 1). L'intérêt de cette variable est justifié également par son importante corrélation avec la MODe, le PCS et le potentiel en bioéthanol (Partie 3 - Chapitre 9 - Tableau 5). De ce fait, les variables sucres solubles, amidon et protéines ne sont plus nécessaires afin d'évaluer les aptitudes aux conversions énergétiques.

4.2. Evaluation qualitative des aptitudes aux conversions énergétiques

En se basant sur les trois variables essentielles sélectionnées, sur la composition chimique (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe), sur la MODe (pris comme indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse) (Figure 4 et Tableau A3 en annexe), sur le PCS (pris comme indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse) (Figure 5 et Tableau A3 en annexe) et sur le potentiel en bioéthanol (Figure 6 et Tableau A4 en annexe) des biomasses étudiées, nous pouvons tirer les enseignements qualitatifs suivants concernant leurs aptitudes aux conversions énergétiques (Tableaux 4 et 5, et Figure 8) :

- Une teneur extrêmement élevée en cellulose (0,30 à 0,50 kg/kg MS), une teneur élevée à extrêmement élevée en hémicelluloses (0,18 à 0,30 kg/kg MS) et une teneur extrêmement faible à très faible en substances minérales (0,00 à 0,03 kg/kg MS) (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe) indiquent que la biomasse est bien appropriée à une transformation par combustion après déshydratation (Figure 4 et Tableau A3 en annexe). Une telle biomasse est également adaptée à une transformation par fermentation éthanolique des hydrates de carbone structuraux (Figure 6 et Tableau A4 en annexe) mais, dans une moindre mesure, à cause de sa teneur trop élevée en lignine nécessitant un prétraitement plus intense (Didderen et al., 2008). Ceci correspond à une teneur extrêmement élevée en cellulose+hémicelluloses (0,54 à 0,72 kg/kg MS) (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe). Ces biomasses sont très peu appropriées à la transformation par digestion anaérobie sans prétraitement. Ces caractéristiques correspondent aux biomasses angiospermes non-commélinoides ligneuses (NC-LI), gymnospermes fibreuses (GY-FI) et certaines commélinoides fibreuses (CO-FI) comme le bambou et le miscanthus récolté en fin d'hiver) (Figures 1, 4, 5 et 6, et Tableaux A1, A3 et A4 en annexe).
- Une teneur extrêmement élevée en cellulose (0,30 à 0,50 kg/kg MS), une teneur très élevée à extrêmement élevée en hémicelluloses (0,20 à 0,35 kg/kg MS) et une teneur extrêmement faible à intermédiaire en substances minérales (0,02 à

0,08 kg/kg MS) (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe) indiquent que la biomasse est bien adaptée à une transformation par fermentation éthanolique des hydrates de carbone structuraux (Figure 6 et Tableau A4 en annexe). Une telle biomasse est également appropriée à une transformation par combustion après déshydratation (Figure 5 et Tableau A3 en annexe) mais, dans une moindre mesure, à cause de sa teneur trop élevée en substances minérales qui diminue la température de fusion de mâchefers. Ceci engendre la production d'une quantité trop importante de mâchefers (Defossez, 2009 ; RMT Biomasse, 2009). Ces biomasses sont peu appropriées à la transformation par digestion anaérobie sans prétraitement. Ces caractéristiques correspondent aux biomasses commélinoïdes fibreuses (CO-FI) (Figures 1, 4, 5 et 6, et Tableaux A1, A3 et A4 en annexe).

- Une teneur intermédiaire à extrêmement élevée en cellulose (0,15 à 0,40 kg/kg MS), une teneur faible à extrêmement élevée en hémicelluloses (0,10 à 0,25 kg/kg MS) et une teneur très faible à très élevée en substances minérales (0,02 à 0,12 kg/kg MS) (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe) indiquent que la biomasse est adaptée à une transformation par fermentation éthanolique des hydrates de carbone structuraux (Figure 6 et Tableau A4 en annexe). Une telle biomasse est également appropriée, mais dans une moindre mesure, à une transformation par digestion anaérobie sans prétraitement (Figure 4 et Tableau A3 en annexe) et par fermentation éthanolique des hydrates de carbone non-structuraux (Figure 6 et Tableau A4 en annexe). Ces biomasses sont peu appropriées à la transformation par combustion après déshydratation. Ces caractéristiques correspondent aux biomasses commélinoïdes moins fibreuses (CO-MF), commélinoïdes riche en amidon (CO-AM) et angiospermes non-commélinoïdes fibreuses (NC-FI) (Figure 1, 4, 5 et 6, et Tableaux A1, A3 et A4 en annexe). Par contre, les biomasses commélinoïdes moins fibreuses (comme le seigle immature) et les commélinoïdes riches en amidon (comme le maïs fibre) sont bien appropriées à ces deux voies de conversion (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 7). Ces biomasses sont caractérisées par des teneurs en cellulose et en hémicelluloses proches (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2).
- Une teneur extrêmement faible à intermédiaire en cellulose (0,03 à 0,20 kg/kg MS), une teneur très faible à faible en hémicelluloses (0,02 à 0,12 kg/kg MS) et une teneur faible à extrêmement élevée en substances minérales (0,04 à 0,24

kg/kg MS) (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe) indiquent que la biomasse est bien apte à une transformation par digestion anaérobie sans prétraitement (Figure 4 et Tableau A3 en annexe). Ces biomasses sont très peu appropriées à la transformation par combustion après déshydratation. Ces caractéristiques correspondent aux biomasses angiospermes non-commélinoides moins fibreuses (NC-MF), angiospermes non-commélinoides riches en sucres solubles (NC-SU) et certaines commélinoides riches en amidon (CO-AM) (Figures 1, 4, 5 et 6 ; Tableaux A1, A3 et A en annexe). Une teneur très faible en cellulose et une teneur extrêmement faible en hémicelluloses (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe) indiquent également que la biomasse se prête bien à une transformation par fermentation éthanolique des hydrates de carbone non-structuraux (Figure 6 et Tableau A4 en annexe). Ces caractéristiques correspondent aux biomasses angiospermes non-commélinoides riches en sucres solubles (NC-SU) (Figures 1 et 6, et Tableaux A1 et A4 en annexe). Une teneur intermédiaire en cellulose, une teneur élevée en hémicelluloses et des valeurs proches pour ces deux teneurs indiquent que la biomasse (comme les commélinoides riches en amidon) (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2) (Figure 1 et au Tableau A1 en annexe) se prête également bien à une transformation par fermentation éthanolique des hydrates de carbone non-structuraux (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 7) (Figure 6 et Tableau A4 en annexe).

Nous avons synthétisé, dans les Tableaux 4 et 5, et à la Figure 8, les différentes aptitudes qualitative des biomasses aux conversions énergétiques en fonction du groupe de biomasses défini précédemment (au point 2.1) et de la voie de transformation.

Pour la réalisation du Tableau 4, nous avons divisé les aptitudes des biomasses végétales aux conversions énergétiques en 4 catégories qualitatives (très défavorable, défavorable, favorable et très favorable). Nous avons réalisé cette division en se basant sur l'analyse réalisée ci-dessus à partir des trois variables essentielles, sur l'entière de la gamme des valeurs de chaque critère de conversion en énergie (MODE, PCS et potentiel en bioéthanol) ainsi que sur la gamme propre à chaque groupe de pour chacun de ces critères.

Nous avons établi le quadrillage de la Figure 8 en divisant la gamme des teneurs en cellulose+hémicelluloses et en substances minérales par quatre. Nous avons défini les limites des zones favorables à chaque voie de transformation en se basant sur les catégories favorables qualitatives propres à chaque voie de conversion énergétique définie dans le Tableau 4 et sur les observations suivantes :

- Pour l'aptitude à la digestion anaérobie sans prétraitement, elle est favorable pour les biomasses ayant une teneur en cellulose+hémicelluloses inférieure à 0,54 kg/kg MS et une teneur en substances minérales supérieure à 0,02 kg/kg MS (Figures 1 et 4, et Tableaux A1 et A3 en annexe) ;
- Pour l'aptitude à la combustion après déshydratation, elle est favorable pour les biomasses ayant une teneur en cellulose+hémicelluloses supérieure à 0,54 kg/kg MS et une teneur en substances minérales inférieure à 0,08 kg/kg MS (Figures 1 et 5, et Tableaux A1 et A3 en annexe). Notons que ces biomasses correspondent à celles que nous avons évaluées comme apte à la combustion avant déshydratation de la biomasse du fait d'un PCI humide élevé (l'explication se trouve au point 5.2.) ;
- Pour l'aptitude à la fermentation éthanolique des hydrates de carbone structuraux, elle est favorable pour les biomasses ayant une teneur en cellulose+hémicelluloses supérieure à 0,36 kg/kg MS et une teneur en substances minérales inférieure à 0,12 kg/kg MS (Figures 1 et 6, et Tableaux A1 et A4 en annexe) ;
- Pour l'aptitude à la fermentation éthanolique des hydrates de carbone non-structuraux, elle est favorable pour les biomasses ayant une teneur en cellulose+hémicelluloses inférieure à 0,54 kg/kg MS et une teneur en substances minérales entre 0,02 et 0,12 kg/kg MS (Figures 1 et 6, et Tableaux A1 et A4 en annexe).

Sur base des données du Tableau 4 et de la Figure 8, nous avons élaboré le Tableau 5 dans lequel se trouve la valeur que doit respecter chaque variable essentielle pour que l'aptitude d'une biomasse végétale à une conversion énergétique donnée soit favorable.

Tableau 4. Aptitudes qualitatives des biomasses végétales aux conversions énergétiques

	Digestion anaérobie sans prétraitement	Combustion après déshydratation	Bioéthanol d'hydrates de carbone structuraux*	Bioéthanol d'hydrates de carbone non-structuraux	Teneur en cellulose (kg/kg MS)	Teneur en hémicelluloses (kg/kg MS)	Teneur en substances minérales (kg/kg MS)
<i>Type de biomasse</i>							
CO-FI (ex. : Paille d'épeautre)	--	++	++	--	0,383±0,046	0,274±0,034	0,048±0,022
CO-MF (ex. : Fétuque élevée)	++	-	+	+****	0,262±0,038	0,214±0,013	0,086±0,019
CO-AM (ex. : Maïs fibre)	++	--	+	++	0,179±0,025	0,181±0,018	0,039±0,008
NC-LI (ex. : Bois de saule)	--	++	++***	--	0,402±0,057	0,214±0,029	0,017±0,010
NC-FI (ex. : Chanvre)	+	--	+	-****	0,295±0,078	0,128±0,024	0,086±0,021
NC-MF (ex. : Fanes de tomate)	++	--	-	-	0,136±0,037	0,075±0,019	0,163±0,032
NC-SU (ex. : Bulbe d'oignon)	++	--	--	++	0,065±0,025	0,029±0,010	0,080±0,029
GY-FI (ex. : Bois d'érable)	--	++	++***	--	0,427±0,009	0,236±0,004	0,006±0,002
<i>Légende</i>							
	MODE (kg MOD/kg matière sèche organique)	PCS (MJ/kg MS)	Ethanol d'hydrates de carbone structuraux (I _{EtOH} /kg MS)	Ethanol d'hydrates de carbone non-structuraux (I _{EtOH} /kg MS)			
-- : Très défavorable	< 0,30	<18,6	< 0,09	< 0,01			
- : Défavorable	0,30 à 0,40	18,6 à 19,0	0,09 à 0,19	0,01 à 0,08			
+ : Favorable	0,40 à 0,50	19,0 à 19,4	0,19 à 0,29	0,08 à 0,15			
++ : Très favorable	> 0,50	> 19,4	> 0,29	> 0,15			

*, La transformation de la cellulose et des hémicelluloses en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse

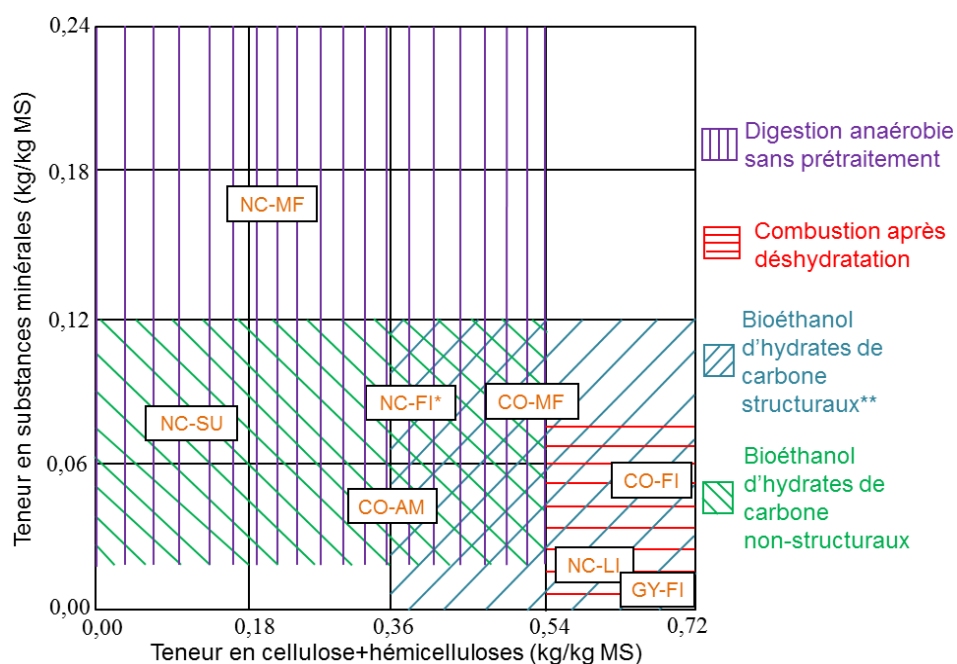
**, ++ Pour les plus fibreuses, comme le miscanthus récolté en fin d'hiver et le bambou

***, Nécessite une intensité de prétraitement plus élevée du fait de la haute teneur en lignine

****, ++ Lorsque les teneurs en cellulose et en hémicelluloses sont semblables, comme pour le seigle immature

*****, + Lorsque la teneur en cellulose est presque deux fois plus grande que la teneur en hémicelluloses, comme pour la partie aérienne du topinambour

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; EtOH : Ethanol ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MODE : Matière organique digestible enzymatiquement ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; PCS : Pouvoir calorifique supérieur ; SU : Riche en sucres solubles



*, Les NC-FI ont un potentiel en bioéthanol issu d'hydrates de carbone non-structuraux favorable que lorsque la teneur en cellulose est presque deux fois plus grande que la teneur en hémicelluloses, comme pour la partie aérienne du topinambour.

**, La transformation de la cellulose et des hémicelluloses en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Figure 8. Aptitudes qualitatives des biomasses végétales aux conversions énergétiques

Tableau 5. Valeur à respecter par chaque variable essentielle pour que l'aptitude d'une biomasse végétale à une conversion énergétique donnée soit favorable

	Digestion anaérobie sans prétraitement	Combustion après déshydratation	Bioéthanol d'hydrates de carbone structuraux*	Bioéthanol d'hydrates de carbone non-structuraux
Teneur en cellulose (kg/kg MS)	< 0,40	> 0,30	> 0,15	< 0,40
Teneur en hémicelluloses (kg/kg MS)	< 0,25	> 0,18	> 0,10	< 0,25
Teneur en substances minérales (kg/kg MS)	0,02 à 0,24	< 0,08	< 0,12	0,02 à 0,12

*, La transformation de la cellulose et des hémicelluloses en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse

Notons que le raisonnement mené pour l'aptitude à la combustion après déshydratation de la biomasse dans ce point ne s'applique pas aux biomasses oléagineuses. Pour ces biomasses, la composition chimique a impact sur le PCS car il dépend de leur teneur en lipides qui ont un PCS très élevé (Ballerini et al., 2006). Ce type de biomasse n'a pas été analysé lors de cette thèse.

Conclusions

Sur base des biomasses végétales étudiées, les trois variables essentielles sont en mesure de prédire qualitativement les aptitudes de biomasses végétales à être converties en énergie par digestion anaérobie sans prétraitement, par combustion après déshydratation et par fermentation éthanolique (en distinguant l'origine du bioéthanol : hydrates de carbone structuraux ou non-structuraux). L'aptitude d'une biomasse à être convertie par digestion anaérobie sans prétraitement se caractérise une richesse relative en substances minérales et une pauvreté relative en cellulose et en hémicelluloses tandis que l'aptitude à être convertie par combustion après déshydratation se caractérise par une pauvreté relative en substances minérales et une richesse relative en cellulose et en hémicelluloses. La plupart des biomasses présente un potentiel favorable pour la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux, non-structuraux et/ou de ces deux sources d'hydrates de carbone. Seules les biomasses angiospermes non-commélinoides moins fibreuses présentent un potentiel très peu favorable pour la production de bioéthanol car elles ont un faible teneur en hydrates de carbone total. Pour les biomasses gymnospermes fibreuses, non-commélinoides ligneuses et commélinoides très fibreuses (comme le

miscanthus en fin d'hiver et le bambou), la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux nécessite un prétraitement plus intense du fait de leur haute teneur en lignine.

4.3. Clef de classification des biomasses végétales

Nous avons développé une clef de classification des différents groupes de biomasses végétales à maturités présentant des propriétés chimiques similaires afin de prédire semi-quantitativement leur composition chimique et leurs aptitudes aux conversions énergétiques (par digestion anaérobie sans prétraitement, par combustion après déshydratation et par fermentation éthanolique) (Figure 9). Les différents groupes de biomasses à maturités sont ceux définis précédemment (au point 2.1). Cette clef est construite sur base des teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en substances minérales des biomasses végétales étudiées. Elle permet de trouver à quel groupe une biomasse appartient à partir de la quantification de ces trois variables essentielles. Après avoir trouvé le groupe auquel la biomasse végétale appartient, il est possible de consulter les propriétés chimiques au groupe en question :

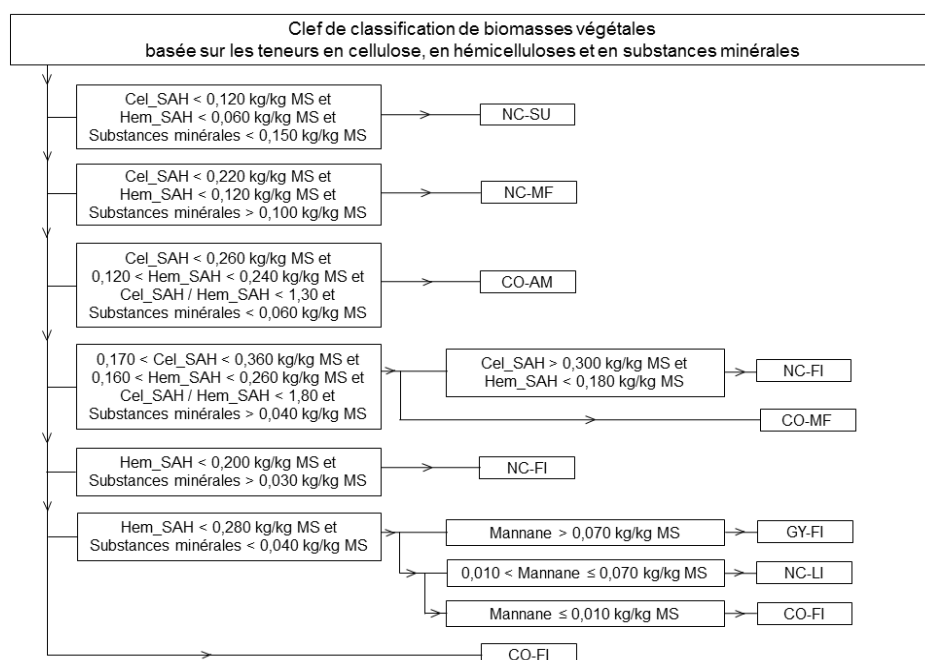
- Composition chimique (Figure 1 et Tableau A1 en annexe) ;
- Composition monosaccharidique dans les hémicelluloses (Figure 3 et Tableau A2 en annexe) ;
- MODe (Figure 4 et Tableau A3 en annexe) ;
- PCS et en matière sèche (Figure 5 et Tableau A3 en annexe) ;
- Potentiel de bioéthanol (sous divisé en potentiel de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et celui issu des non-structuraux) (Figure 6 et Tableau A4 en annexe).

Notons que pour le calcul de ces moyennes et écart-types, l'échantillon de yucca et les échantillons de fanes de betterave ont été supprimés de leur groupe respectif car ils en divergeaient trop (respectivement, NC-SU et NC-MF ; les valeurs pour ces biomasses peuvent être visualisées avec les autres biomasses à la Partie 3 - Chapitre 9).

Remarquons que la clef de classification suit le degré croissant de MODe à l'exception du dernier critère d'identification. La présence des hémicelluloses et

l'absence de la cellulose dans les deux derniers critères montre le rôle prépondérant des hémicelluloses par rapport à la cellulose pour la classification. Un critère supplémentaire est nécessaire pour distinguer les CO-MF car certaines NC-FI (comme le chanvre) peuvent parfois s'y retrouver. Le dernier critère d'identification ne permet pas de discerner toutes les CO-FI (comme le miscanthus récolté en fin d'hiver) des NC-LI et des GY-FI. Le miscanthus récolté en fin d'hiver possède généralement une teneur plus élevée en cellulose mais plus faible en hémicelluloses par rapport aux autres CO-FI. Néanmoins, cette différence n'est pas assez grande pour pouvoir distinguer ce miscanthus des autres CO-FI. Ces trois groupes possèdent des teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en substances minérales semblables (Figure 1 et Tableau A1 en annexe). Pour discerner ces groupes du point de vue phylogénétique, la teneur absolue (ou relative) en mannane dans les hémicelluloses doit être utilisée. Par contre, du point de vue des propriétés chimiques d'une biomasse, il n'est pas nécessaire de réaliser cette distinction.

Notons que le raisonnement mené pour l'aptitude à la combustion après déshydratation de la biomasse dans ce point ne s'applique pas aux biomasses oléagineuses. Pour ces biomasses, la composition chimique a impact sur le PCS car il dépend de leur teneur en lipides qui ont un PCS très élevé (Ballerini et al., 2006). Ce type de biomasse n'a pas été analysé lors de cette thèse.



AM : Riche en amidon ; Cel : Cellulose ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ;
GY : Gymnospermes ; Hem : Hémicelluloses ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ;
MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SAH : Méthode NDE-SAH-LC-CAD ;
SU : Riche en sucres solubles

Figure 9. Clef de classification de biomasses végétales à maturités

4.4. Conclusions

Pour réduire les coûts d'analyse lors de l'évaluation du potentiel énergétique, il convient de s'en tenir aux teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en substances minérales. Elles nous ont permis de mettre au point des outils d'aide à la décision pour prédire qualitativement les aptitudes de biomasses végétales aux conversions énergétiques par digestion anaérobie sans prétraitement, par combustion après déshydratation et par fermentation éthanolique.

Nous avons développé une clef de classification des différents groupes de biomasses végétales à maturités présentant des propriétés chimiques similaires. Cette clef permet d'identifier le groupe auquel une biomasse appartient et, ensuite, elle estime semi-quantitativement la composition chimique de cette biomasse ainsi que ses aptitudes aux conversions énergétiques. Elle donne toutes ces informations et ce uniquement en se basant sur la quantification des trois paramètres pertinents de la composition chimique.

A priori, vu la diversité et la quantité de biomasses utilisées pour construire ces outils d'aide à la décision et cette clef de classification, ils peuvent être extrapolés à des biomasses végétales semblables à celles analysées lors de cette thèse.

Rappelons qu'il est primordial de savoir avec quelle méthode les teneurs en cellulose et en hémicelluloses sont quantifiées (comme expliqué au point 1.2). De ce fait, les outils d'aide à la décision et la clef de classification ne sont valables que lorsque ces deux polysaccharides structuraux sont dosés par la méthode NDE-SAH-LC-CAD. Toutefois, s'ils ont été quantifiés par la méthode de Van Soest, les résultats obtenus par cette méthode peuvent être convertis en données qui seraient obtenues par la méthode NDE-SAH-LC-CAD (l'explication se trouve point 1.3).

Notons que les conclusions pour l'aptitude à la combustion après déshydratation de la biomasse ne s'appliquent pas aux biomasses oléagineuses car la composition chimique y a un impact sur le PCS et nous ne les avons pas analysées lors de cette thèse. Les explications se trouvent ci-dessus.

5. Productivité brute d'énergie

Les essais agronomiques réalisés sur les cultures fibreuses et la grande diversité de biomasses analysées nous ont également permis d'établir des relations entre composition chimique, aptitudes aux conversions énergétiques, maturation, teneur en matière sèche et rendement en matière sèche, d'une part, la productivité brute d'énergie par hectare de culture, d'autre part. Grâce à ces relations, la production d'énergie à partir des biomasses pourra se fier à des indices précis de valeur énergétique.

5.1. Rendement en matière sèche par hectare

Pour les biomasses fibreuses issues des essais agronomiques, le rendement en matière sèche par hectare de culture (tonnes/(hectare x an)) augmente jusqu'en automne puis il diminue pendant l'hiver (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 1). Cette évolution est illustrée pour le sorgho fibre à la Figure 7. L'augmentation s'explique par la croissance de la plante et la diminution s'explique par la chute des feuilles et, pour les plantes pérennes, par le translocation des nutriments des tiges et/ou des

feuilles vers les rhizomes au cours de l'automne (Cadoux et al., 2009). En effet, lors du séchage sur pied, nous observons une diminution de la teneur en substances minérales et en constituants chimiques les plus digestibles (sucres solubles et protéines), et une augmentation des teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine, les constituants chimiques les moins digestibles (Partie 3 - Chapitre 2 - Figure 1 ; Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 2).

Lorsque la composition chimique et les aptitudes aux conversions énergétiques des biomasses fibreuses étudiées sont exprimées par hectare, la meilleure période de récolte pour optimiser la productivité brute d'énergie par hectare de culture est l'automne (c'est-à-dire à la fin de la croissance de la plante) (Partie 3 - Chapitre 8 - Figures 2 bas, 4 bas, 5 bas et 6 bas). Cela s'explique par le fait que le rendement en matière sèche par hectare compense largement les propriétés chimiques (Partie 8 - Chapitre 8 - Figures 1, 2, 3, 4 et 5) qui peuvent être moins favorables comme pour l'indicateur du potentiel en combustion après déshydratation (le PCS) et le potentiel en bioéthanol total. Le rendement en matière sèche par hectare est un donc un facteur déterminant à prendre en compte pour optimiser la productivité brute d'énergie par hectare de culture. Les propriétés chimiques de la biomasse ont des effets négligeables de ce point de vue. L'importance du rendement en matière sèche par hectare par rapport aux propriétés chimiques de la biomasse est illustrée pour le sorgho fibre à la Figure 7.

Le maïs fibre possède une teneur modérée en constituants structuraux mais, du fait de son rendement élevé en MS par hectare de culture (20 tonnes de matière sèche de maïs fibre par hectare et par an ; Partie 3 - Chapitre 7 - Tableau 1), il permet de produire une importante quantité de constituants structuraux par hectare. Ceci s'observe également pour le chanvre contenant une teneur modérée en constituants structuraux mais dont la production par hectare est importante du fait de son rendement relativement élevé en matière sèche par hectare de culture (14 tonnes de MS de chanvre fibre par hectare et par an ; Partie 3 - Chapitre 7 - Tableau 1).

Les conditions pédoclimatiques ont également un impact important sur la production en matière sèche par hectare de culture. En comparant les rendements en matière sèche par hectare des mêmes biomasses fibreuses pour un même état

physiologique à Libramont (498 m au-dessus du niveau de la mer ; température annuelle moyenne : 8,6°C ; précipitation annuelle moyenne : 1260 mm) (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 1) et à Gembloux (161 m au-dessus du niveau de la mer ; température annuelle moyenne : 9,8°C ; précipitation annuelle moyenne : 856 mm ; 50°33'N, 04°43'E) (Partie 3 - Chapitre 7 - Tableau 1), nous avons observé qu'à Libramont les rendements en matière sèche par hectare de culture sont inférieurs de 20 à 60% par rapport à ceux obtenus à Gembloux. Cette diminution du rendement en matière sèche par hectare de culture (Figure 10) s'explique par les conditions pédoclimatiques de moyenne montagne à Libramont par rapport à celles de Gembloux qui offrent des sols très fertiles et une température annuelle moyenne plus importante. L'ampleur de cette diminution dépend de l'espèce. Le sorgho fibre est la biomasse qui a montré la plus grande sensibilité aux conditions pédoclimatiques moins favorables (Figure 10) de Libramont.

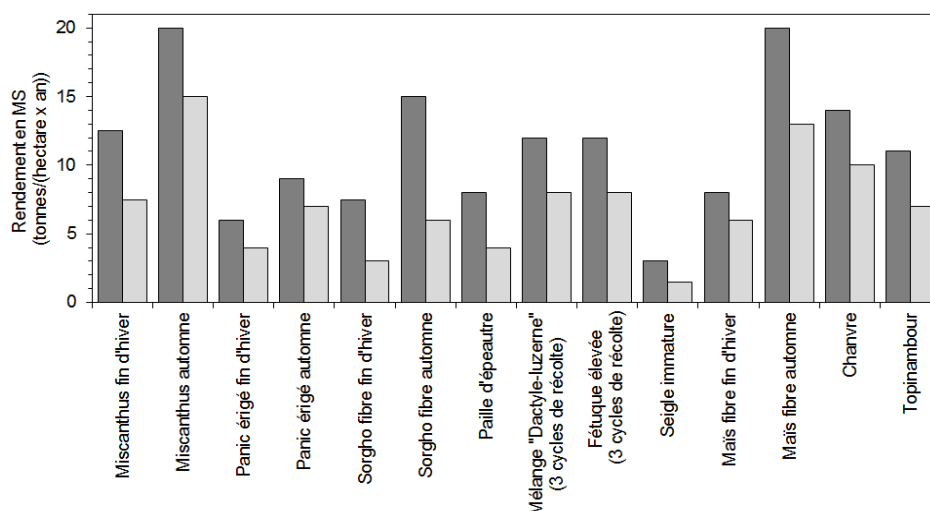


Figure 10. Rendement en matière sèche par hectare de culture à Gembloux (en gris foncé) et à Libramont (en gris clair) de biomasses fibreuses

5.2. Teneur en matière sèche

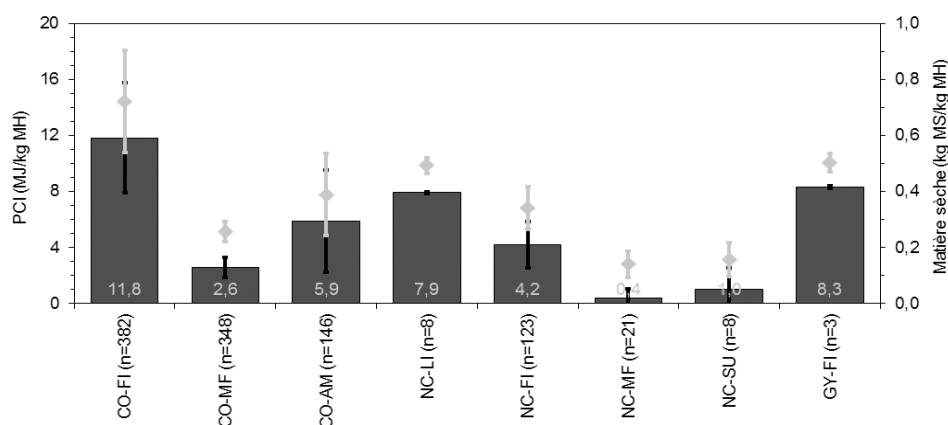
Pour la combustion, la teneur en matière sèche (MS) de la biomasse est également un paramètre déterminant à prendre en considération car la teneur en eau diminue l'énergie nette utilisable (Defossez, 2009).

Nous observons généralement que, pour les biomasses fibreuses issues des essais agronomiques, la teneur en MS augmente lentement au cours de la croissance de la plante, du fait de sa maturation, et augmente rapidement lors du séchage hivernal sur pied (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 1). Par contre, le sorgho fibre ne sèche pas pendant l'hiver (Partie 3 - Chapitre 8 - Figure 1) car il verse graduellement. La récolte en fin d'hiver permet également d'avoir une biomasse moins riche en azote et en substances minérales (comme expliqué au point 3.1). Cette moindre teneur en azote est bénéfique pour la combustion car cela évite la présence d'acides (comme l'acide nitrique) dans l'unité de transformation et de puissants gaz à effet de serre (les oxydes d'azote) dans les fumées (Defossez, 2009). Cette moindre teneur en substances minérales diminue la production de mâchefers (Defossez, 2009). Néanmoins, la chute hivernale des feuilles augmente la teneur en potassium dans la biomasse récoltée car les tiges sont plus riches en potassium que les feuilles (RMT Biomasse, 2009). Lors de la combustion, cette augmentation diminue la température de fusion des mâchefers qui risquent d'atteindre leur point de fusion (Defossez, 2009). Pendant la récolte, il faut également éviter la contamination de la biomasse par de la terre car cela augmenterait très fortement la teneur en substances minérales et plus spécialement en silice qui est néfaste pour la combustion (diminution de la température de fusion des mâchefers).

Pour évaluer l'énergie nette disponible à la combustion de la biomasse telle qu'elle est après avoir été récoltée (c'est-à-dire en prenant en compte son humidité), il faut évaluer le pouvoir calorifique inférieur (PCI) humide (European Committee for Standardization, 2009). Cet indicateur du potentiel en combustion d'une biomasse prenant en compte son humidité est calculé à partir du PCI sec qui est évalué à partir du PCS (qui est toujours mesuré sur sec) (European Committee for Standardization, 2009). Le PCS et le PCI sec se distinguent par le fait que le PCS correspond à l'énergie de combustion rapportée à la masse d'un combustible brûlé

en présence d'une quantité d'air en excès et contrôlée dont la chaleur de condensation de l'eau n'a pas été soustraite. Dans le cas du PCI sec, cette chaleur de condensation de l'eau est soustraite. Cette soustraction est effectuée car cette énergie est rarement récupérée (European Committee for Standardization, 2009).

Lorsque nous déterminons le PCI humide des différents groupes de biomasses définis précédemment (au point 2.1), nous observons qu'il est entièrement corrélé à la teneur en matière sèche (complément de la teneur en eau) de la biomasse (Figure 11 et Tableau A3 en annexe). La teneur en eau est responsable de cette perte importante d'énergie nette disponible à la combustion. De ce fait, seules les biomasses commélinoides fibreuses (CO-FI), angiospermes non-commélinoides ligneuses (NC-LI) et gymnospermes fibreuses (GY-FI) présentent un PCI humide favorable pour combustion sans séchage préalable. Néanmoins, il est possible d'augmenter le PCI humide en séchant la biomasse. Cela permettrait de rendre les autres groupes de biomasses favorables à une conversion par combustion, mais ce séchage à un coût énergétique important. De plus, il ne règle pas la problématique des mâchefers liée à la combustion de ces biomasses qui a été expliquée ci-dessus.

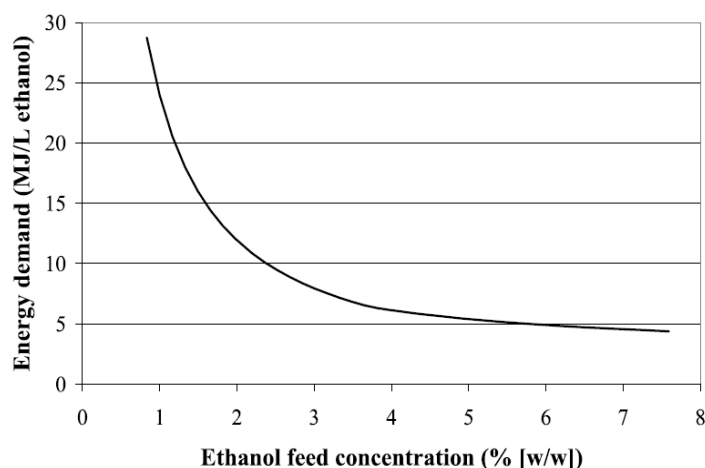


AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MH : Matière humide ; NC : Non-commélinoides ; PCI : Pouvoir calorifique inférieur ; SU : Riche en sucres solubles

Figure 11. Pouvoir calorifique inférieure humide (représenté par les barres en gris foncé) et teneur en matière sèche (représentée par les points en gris clair) (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

Pour la production de bioéthanol, une teneur importante en matière sèche est également privilégiée car plus la biomasse initiale est pauvre en eau, plus le liquide

après fermentation éthanolique est riche en éthanol (Galbe et al., 2007). Pour ces liquides, une teneur élevée en éthanol est recherchée car l'énergie nécessaire à la distillation de l'éthanol contenu dans ces liquides diminue très fortement avec l'augmentation de leur teneur en éthanol (Figure 12) (Galbe et al., 2007). Il est généralement considéré que cette teneur en éthanol doit être d'au moins 3 à 4% (v/v) d'éthanol pour les distiller (Galbe et al., 2007).



Energy demand in the distillation step, where ethanol is concentrated to 94 wt %, as a function of the ethanol feed concentration. The step was assumed to consist of two stripper columns (25 trays each) and a rectification column (35 trays) heat integrated by operating at different pressures. The inlet feed temperature was increased from 80 °C to the boiling temperature before entering each stripper column

Figure 12. Energie nécessaire à la distillation de l'éthanol (Galbe et al., 2007)

Les biomasses fibreuses plus sèches et/ou récoltées en fin d'hiver exigeront une intensité de prétraitement (chimique, thermique et/ou mécanique) plus élevée de la biomasse à cause de leur teneur plus élevée en lignine (Didderen et al., 2008). Ce prétraitement plus intense est nécessaire afin de libérer la cellulose et les hémicelluloses de la lignine plus abondante qui les imprègne et empêche l'hydrolyse de ces deux polysaccharides en monosaccharides fermentescibles (Didderen et al., 2008). Cette teneur en lignine est toujours bien en deçà de celle observée pour les essences forestières comme les angiospermes non-commélinoides (bois de saule, de peuplier, de chêne, de hêtre et de tulipier) et les gymnospermes (bois d'épicéa, de pin et de mélèze) analysées lors de cette thèse. Pour ces biomasses, les teneurs en lignine (dosée selon la méthode de Van Soest) sont, respectivement, de 0,11 à 0,16

kg/kg MS et de 0,25 à 0,27 kg/kg MS (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2 - Tableau A1 en annexe). Elles ne sont que de 0,07 à 0,12 kg/kg MS pour les biomasses fibreuses récoltées sèches, excepté le bambou où nous avons mesuré une valeur de 0,15 kg/kg MS (Partie 3 - Chapitre 9 - Figure 2 - Tableau A1 en annexe). Les essences forestières angiospermes non-commélinoides et gymnospermes ont, respectivement, 85% et 97% de leurs cellules dans le bois qui sont fibreuses (parois secondaires fortement lignifiées) (Kuhad et al., 1997 ; Möller et al., 2007).

L'avantage des biomasses fibreuses de type commélinoïde (comme le miscanthus, le panic érigé, la paille d'épeautre, le sorgho fibre, la fétuque élevée, le seigle et le maïs fibre) par rapport aux biomasses non-commélinoides, et plus particulièrement les essences forestières, est que les commélinoides ont un rapport (cellulose+hémicelluloses)/lignine plus élevé. Cela implique que la production de bioéthanol issu de la cellulose et des hémicelluloses nécessite une intensité de prétraitement moins importante pour les biomasses commélinoides (Didden et al., 2008).

En revanche, la voie de transformation par digestion anaérobie tolère des biomasses humides car sa conversion par voie biologique est réalisée par des microorganismes. De ce fait, pour cette voie de valorisation en énergie, les biomasses végétales sont conservées sous forme d'ensilage, qui nécessite des biomasses contenant des sucres solubles (Nizami et al., 2009). Par contre, pour la production de bioéthanol et la combustion, une conservation de la biomasse végétale sous forme sèche est privilégiée car elles nécessitent des substrats avec une teneur élevée en matière sèche comme expliqué ci-dessus.

5.3. Conclusions

Pour les biomasses fibreuses, il apparaît que la productivité brute d'énergie par hectare de culture dépend prioritairement du rendement en matière sèche par hectare (tonnes/(hectare x an)) et de la teneur en matière sèche. C'est le cas tant pour la production de biométhane, de combustible solide pour la combustion et de bioéthanol. La composition chimique et les aptitudes aux conversions énergétiques de la biomasse ont des effets négligeables de ce point de vue. La filière de valorisation des biomasses fibreuses devra donc se focaliser sur le rendement en matière sèche par hectare et la teneur en matière sèche. Cependant, nous avons montré que la maturité des plantes doit également être prise en compte car l'optimisation des procédés de conversion de ces biomasses impose que ses propriétés chimiques soient relativement constantes.

6. Remarques

6.1. Energie brute produite

Cette thèse a permis d'évaluer les aptitudes des biomasses végétales à être converties en énergie. Néanmoins, la comparaison de l'énergie brute pouvant potentiellement être produite par les trois voies de valorisation énergétique étudiées n'est pas possible. Certes, pour la combustion de la biomasse et la production de bioéthanol, respectivement, le PCS et le potentiel en bioéthanol peuvent être convertis en énergie brute potentielle. Pour la combustion, le calcul du PCI humide (énergie disponible par la combustion de la biomasse telle qu'elle a été récoltée) d'une biomasse végétale peut être réalisé à partir de son PCS sec (comme expliqué au point 4.2) (European Committee for Standardization, 2009). Pour la production de bioéthanol, le calcul du PCI de l'éthanol (énergie disponible par la combustion de l'éthanol) peut être réalisé à partir du PCI de l'éthanol qui est de 21,1 MJ par litre d'éthanol (Ballerini et al., 2006 ; Spatari et al., 2010). Par contre, pour la digestion anaérobie sans prétraitement, la MODe ne peut pas encore être convertie en potentiel de biométhane car nous n'avons pas trouvé de relation prédictive permettant de réaliser le lien entre les deux. Nous pouvons considérer que la MODe

correspond à un niveau minimum identifiable pour cette digestion sans prétraitement de la biomasse car cette conversion biologique digère au moins autant que les enzymes utilisées dans la méthode utilisée pour doser la MODe.

Toutefois, nous avons montré que, pour les biomasses fibreuses, le rendement en matière sèche par hectare est un paramètre extrêmement déterminant pour évaluer la productivité attendue par hectare de culture (comme expliqué au point 4.1). Ce rendement est conditionné en grande partie par les conditions pédoclimatiques (comme expliqué au point 4.1) et par la dépendance/réponse de la biomasse vis-à-vis des intrants (ENERBIOM, 2012). Ceux-ci conditionnent également la pression environnementale exercée par la production de la biomasse (ENERBIOM, 2012).

Au regard de la composition chimique des biomasses, les productions d'énergie qui conduisent aux bilans énergétiques les plus avantageux sont logiquement celles qui valorisent la plus grande partie de la matière organique (Rettenmaier et al., 2010). Dans notre cas, les valorisations énergétiques avec les meilleurs bilans énergétiques sont donc, en ordre croissant, la fermentation éthanolique (issue des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux), la digestion anaérobie sans prétraitement et la combustion.

Néanmoins, la nature du biocombustible produit peut aussi être importante, notamment en regard de son mode de consommation (Ghysel et al, 2010). Les biocombustibles solides (comme le pellet de biomasse) et gazeux (comme le biogaz) sont plutôt destinés à être convertis en énergie thermique et/ou électrique à poste fixe. Les biocombustibles liquides (comme le bioéthanol) sont plutôt destinés à être convertis en énergie mécanique nécessaire aux véhicules de transport. Le combustible liquide est une forme aisément stockable, transportable et concentrée d'énergie potentielle mais la transformation de l'énergie initiale contenue dans les biomasses est moins efficace par rapport aux biocombustibles solides et gazeux (Ghysel et al, 2010).

6.2. Extrapolations des résultats

Notons que les observations et les discussions réalisées pour la combustion peuvent généralement s'appliquer à la gazéification et à la pyrolyse vu les similitudes entre ces trois types de valorisation énergétique (Partie 1 - Chapitre 1). Elles font toutes parties de la voie de transformation thermochimique (Partie 1 - Chapitre 1). Il en est de même pour la fermentation ABE (acétone, butanol et éthanol) et la fermentation éthanolique car ces deux types de transformation biologique sont proches (Partie 1 - Chapitre 1).

Les enseignements que nous avons tirés lors de cette thèse peuvent également être utilisés dans le cadre de la transformation de biomasses végétales en bioproduits par bioraffinage car ce type de conversion nécessite également une bonne connaissance de la composition chimique de la biomasse (Kamm & Kamm, 2004 ; Kamm & Kamm, 2007). Le bioraffinage couvre les opérations permettant de fractionner et de transformer les biomasses en vecteurs énergétiques et en produits dérivés, dénommés bioproduits. Ces bioproduits incluent les biomatériaux, les produits alimentaires et les produits chimiques synthétisés par les technologies de la chimie verte (Kamm & Kamm, 2004 ; Kamm & Kamm, 2007).

Bibliographie

- Balat M., Balat H. & Oz C., 2008.** Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Sci.* **34**, 551-573.
- Ballerini D. & Alazard-Toux N., 2006.** *Les Biocarburants. Etats des lieux. Perspectives et enjeux du développement.* Paris, France : Technip. 348 p.
- Boyer K., Horwitz W. & Albert R., 1985.** Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. *Anal. Chem.* **57**, 454-459.
- Carpita N. & McCann M., 2000.** The cell wall, In: Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.
- De Boever J., Cottyn B., Buysse F. & Vanacker J., 1986.** The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolisable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Animal Feed Sci. and Technol.* **14**, 203-214.

- Cadoux S., Preudhomme M., Machet J., Mary B., Fourdinier E., Ferchaud F., Boizard H. & Gosse G., 2009.** *Productivity and environmental impacts of energy crops first results of the long term experiment « biomass & environment »*. Hamburg, Germany: 17th European Biomass Conference & Exhibition.
- Defossez E., 2009.** *Les technologies de combustion*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Didderen I., Destain J., & Thonart P., 2008.** *Le bioéthanol de seconde generation. La production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Gembloux, Belgique : Presses Agronomiques de Gembloux, 128 p.
- ENERBIOM, 2012.** *ENERBIOM : Rapport final de projet*. Waremmme, Belgique : Province de Liège - Services agricoles.
- European Committee for Standardization, 2009.** CEN/TS 14961-1:2009.5: Solid biofuels- Fuels specifications and classes - Part 1: General requirements. Brussels, Belgium: European Committee for Standardization.
- Galbe M., Sassner P., Wingren A. & Zacchi G., 2007.** Process Engineering Economics of Bioethanol Production. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **108**, 303-327.
- Garna H., Mabon N., Nott K., Wathelet B. & Paquot M., 2006.** Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. *Food Chemistry* **96**, 477-484.
- Ghysel F., Godin B., Flamin C., Delfosse P., Delcarte J. & Stilmant D., 2010.** Valorisation énergétique des fourrages : comparaison de trois filières, enjeux et opportunités. *Fourrages* **203**, 163-173.
- Hames B., 2009.** Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, In: Mielenz, J., eds. Biofuels: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* vol. 581. New York, USA: Humana Press, pp. 145-183.
- Hatfield R., Jung H., Broderick G. & Jenkins, T. 2007.** Nutritional chemistry of forages. In: Barnes, R., Nelson, C., Moore, K. & Collins, M., eds. Forages: *The Science of Grassland Agriculture*, Volume 2. Madison, USA: American Society of Agronomy, pp. 467-485.
- Jung H. & Casler M., 2006.** Maize Stem Tissues: Impact of Development on Cell Wall Degradability. *Crop Sci.* **46**, 1801-1809.

- Jung H.-J., 1997.** Analysis of Forage Fiber and Cell Walls in Ruminant Nutrition. *The J. of Nutr.* **127**, 810S-813S.
- Kamm B. & Kamm M., 2004.** Principles of biorefineries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 137-145.
- Kamm B. & Kamm M., 2007.** Biorefineries – Multi Product Processes. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **105**, 175-204.
- Kuhad R., Singh A. & Eriksson K., 1997.** Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **57**, 46-125.
- Mohnen D., 2008.** Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 266-277.
- Möller R., Toonen M., Van Beilen J., Salentijn E. & Clayton D., 2007.** *Crop platforms for cell wall biorefining : lignocellulose feedstocks*. Tall Gables, UK: CPL Press, pp. 176.
- Morrison I., 1980.** Hemicellulosic Contamination of Acid Detergent Residues and Their Replacement by Cellulose Residues in Cell Wall Analysis. *J. Sci. Food Agric.* **31**, 639-645.
- Nizami A.-S., Korres N. & Murphy J., 2009.** Review of the Integrated Process for the Production of Grass Biomethane. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 8496-8508.
- Rettenmaier N., Köppen S., Gärtner S. & Reinhardt G., 2010.** Life cycle assessment of selected future energy crops for Europe. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **4**, 620-636.
- RMT Biomasse, 2009.** *Le Miscanthus*. Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.
- Spatari S., Bagley D. & MacLean H., 2010.** Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. *Bioresource Technol.* **101**, 654-667.
- Southgate D., 1995.** *Dietary fibre analysis*. Cambridge, UK : The Royal Society of Chemistry.
- Tamaki Y. & Mazza G., 2011.** Rapid Determination of Lignin Content of Straw Using Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 504-512.
- Theander O. & Westerlund E., 1993.** Quantitative analysis of cell wall components. In: Jung H., Buxton D., Hatfield R. & Ralph J., eds. *Forage cell wall*

structure and digestibility. Madison, USA: American Society of Agronomy, pp. 83-104.

Vogel J., 2008. Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 301-307.

Willför S., Pranovich A., Tamminen T., Puls J., Laine C., Suurnäkki A., Saake B., Uotila K., Simolin H., Hemming J. & Holmboma B., 2009. Carbohydrate analysis of plant materials with uronic acid-containing polysaccharides—A comparison between different hydrolysis and subsequent chromatographic analytical techniques. *Industrial Crops and Product*. **29**, 571-580.

Annexe

Tableau A1. Composition chimique (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

	Cellulose (kg/kg MS)	Hémicelluloses (kg/kg MS)	Lignine (kg/kg MS)	Sucres solubles totaux (kg/kg MS)	Amidon (kg/kg MS)	Protéines (kg/kg MS)	Substances minérales (kg/kg MS)
CO-FI	0,383	0,274	0,085	0,009		0,033	0,048
(n=382)	±0,046	±0,034	±0,019	±0,017	0,000*	±0,018	±0,022
CO-MF	0,262	0,214	0,036	0,160		0,093	0,086
(n=348)	±0,038	±0,013	±0,012	±0,070	0,000*	±0,022	±0,019
CO-AM	0,179	0,181	0,025	0,060	0,305	0,067	0,039
(n=146)	±0,025	±0,018	±0,004	±0,028	±0,075	±0,013	±0,008
NC-LI	0,402	0,214	0,137	0,010		0,016	0,017
(n=8)	±0,057	±0,029	±0,021	±0,007	0,000	±0,010	±0,010
NC-FI	0,295	0,128	0,079	0,081		0,070	0,086
(n=123)	±0,078	±0,024	±0,015	±0,082	0,000*	±0,031	±0,021
NC-MF	0,136	0,075	0,045	0,081	0,028	0,181	0,163
(n=16)	±0,037	±0,019	±0,021	±0,041	±0,036	±0,049	±0,032
NC-SU	0,065	0,029	0,012	0,511		0,107	0,080
(n=8)	±0,025	±0,010	±0,006	±0,115	0,000	±0,061	±0,029
GY-FI	0,427	0,236	0,261	0,002		0,009	0,006
(n=3)	±0,009	±0,004	±0,012	±0,002	0,000	±0,003	±0,002

*, La teneur en amidon est considérée comme nulle car il n'en a pas été détecté dans certains des échantillons analysés.

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Tableau A2. Composition relative en monosaccharides dans les hémicelluloses (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

	Xylane (kg/kg MS)	Arabinane (kg/kg MS)	Mannane (kg/kg MS)	Galactane (kg/kg MS)	Glucane Hémicellulosique (kg/kg MS)
Nombre de carbone du monosaccharide	5	5	6	6	6
CO-FI	0,778	0,098	0,020	0,033	0,072
(n=120)	±0,043	±0,015	±0,011	±0,014	±0,020
CO-MF	0,716	0,126	0,026	0,043	0,091
(n=56)	±0,045	±0,016	±0,007	±0,019	±0,020
CO-AM	0,685	0,149	0,021	0,050	0,095
(n=37)	±0,022	±0,008	±0,006	±0,010	±0,015
NC-LI	0,714	0,030	0,073	0,087	0,097
(n=8)	±0,053	±0,012	±0,022	±0,019	±0,032
NC-FI	0,617	0,042	0,100	0,149	0,092
(n=47)	±0,041	±0,018	±0,032	±0,020	±0,018
NC-MF	0,468	0,098	0,098	0,200	0,136
(n=16)	±0,080	±0,038	±0,031	±0,052	±0,053
NC-SU	0,311	0,179	0,117	0,292	0,102
(n=8)	±0,066	±0,071	±0,027	±0,071	±0,024
GY-FI	0,239	0,064	0,446	0,102	0,149
(n=3)	±0,010	±0,003	±0,014	±0,005	±0,016

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ;

MF : Moins fibreux ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Tableau A3. MODE, PCS, PCI et teneur en matière sèche (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

	MODE (kg MOD/kg matière organique sèche)	PCS (MJ/kg MS)	PCI (MJ/kg matière humide)	Matière sèche (kg/kg matière humide)
CO-FI	0,225	19,1	11,8	0,720
(n=382)	±0,078	±0,4	±3,9	±0,183
CO-MF	0,635	18,8	2,6	0,255
(n=348)	±0,110	±0,2	±0,7	±0,036
CO-AM	0,742	18,3	5,9	0,388
(n=146)	±0,041	±0,3	±3,7	±0,147
NC-LI	0,159	19,5	7,9	0,492
(n=8)	±0,067	±0,1	±0,1	±0,028
NC-FI	0,450	18,2	4,2	0,341
(n=123)	±0,120	±0,7	±1,7	±0,076
NC-MF	0,791	16,8	0,4	0,139
(n=16)	±0,108	±0,7	±0,7	±0,048
NC-SU	0,973	17,1	1,0	0,156
(n=8)	±0,017	±0,6	±1,5	±0,061
GY-FI	0,096	20,3	8,3	0,502
(n=3)	±0,017	±0,2	±0,1	±0,032

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ;

MODE : Matière organique digestible enzymatiquement ; MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ;

PCI : Pouvoir calorifique inférieur ; PCS : Pouvoir calorifique supérieur ; SU : Riche en sucres solubles

Tableau A4. Potentiel en bioéthanol (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

	Ethanol total (l _{EtOH} /kg MS)	Ethanol d'hydrates de carbone structuraux* (l _{EtOH} /kg MS)	Ethanol cellulosique* (l _{EtOH} /kg MS)	Ethanol hémicellulosique* (l _{EtOH} /kg MS)	Ethanol d'hydrates de carbone non-structuraux (l _{EtOH} /kg MS)	Ethanol des sucres solubles (l _{EtOH} /kg MS)	Ethanol de l'amidon (l _{EtOH} /kg MS)
CO-FI	0,377	0,371	0,231	0,140	0,005	0,005	0,000**
(n=382)	±0,018	±0,021	±0,028	±0,017	±0,010	±0,010	
CO-MF	0,362	0,267	0,158	0,110	0,095	0,095	0,000**
(n=348)	±0,025	±0,026	±0,023	±0,007	±0,041	±0,041	
CO-AM	0,429	0,200	0,108	0,093	0,229	0,035	0,195
(n=146)	±0,021	±0,023	±0,015	±0,009	±0,040	±0,017	±0,048
NC-LI	0,373	0,367	0,258	0,109	0,006	0,006	0,000
(n=8)	±0,033	±0,037	±0,029	±0,015	±0,004	±0,004	
NC-FI	0,292	0,244	0,178	0,065	0,048	0,048	0,000**
(n=123)	±0,037	±0,055	±0,047	±0,012	±0,049	±0,049	
NC-MF	0,184	0,119	0,080	0,038	0,065	0,048	0,017
(n=16)	±0,049	±0,029	±0,020	±0,010	±0,037	±0,024	±0,023
NC-SU	0,356	0,051	0,037	0,015	0,304	0,304	0,000
(n=8)	±0,059	±0,020	±0,015	±0,005	±0,068	±0,068	
GY-FI	0,362	0,361	0,241	0,120	0,001	0,001	0,000
(n=3)	±0,007	±0,007	±0,005	±0,002	±0,001	±0,001	

*, La transformation de la cellulose et/ou des hémicelluloses en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse

**, Le potentiel en bioéthanol issu de l'amidon est considéré comme nul car la teneur en amidon est également considérée comme nulle.

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; EtOH : Ethanol ; FI : Fibreux ; GY : Gymnospermes ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ;

MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Tableau A5. Constituants chimiques mineurs (moyenne et écart-type) des différents groupes de biomasses à maturités

	Galacturonane (kg/kg MS)	Glucuronane (kg/kg MS)	Acétyl (kg/kg MS)
CO-FI (n=6)	0,000 ±0,000	0,009 ±0,002	0,027 ±0,002
CO-MF (n=7)	0,006 ±0,006	0,012 ±0,010	0,018 ±0,006
CO-AM (n=3)	0,001 ±0,001	0,007 ±0,001	0,017 ±0,004
NC-LI (n=1)	0,027	0,021	0,027
NC-FI (n=9)	0,048 ±0,012	0,025 ±0,011	0,025 ±0,006
NC-MF (n=8)	0,058 ±0,011	0,007 ±0,011	0,023 ±0,013
NC-SU (n=4)	0,068 ±0,044	0,009 ±0,013	0,006 ±0,004

AM : Riche en amidon ; CO : Commélinoides ; FI : Fibreux ; LI : Ligneux ; MF : Moins fibreux ;

MS : Matière sèche ; NC : Non-commélinoides ; SU : Riche en sucres solubles

Dans le groupe CO-FI se trouve du miscanthus giganteus, du panic érigé et de la paille d'épeautre.

Dans le groupe CO-MF se trouve du sorgho fibre, de la fétuque élevée et du dactyle.

Dans le groupe CO-AM se trouve du maïs fibre.

Dans le groupe NC-LI se trouve du saule.

Dans le groupe NC-FI se trouve du chanvre, du topinambour (partie aérienne), de la paille de colza et de lin, et de la renouée du japon.

Dans le groupe NC-MF se trouve des fanes de consoude, de betterave, de pomme de terre, d'amaranthe, de chou, de lupin et de haricots, des feuilles de chou et des orties.

Dans le groupe NC-SU se trouve des feuilles et bulbes d'oignon, et des racines non forcées et des feuilles forcées (blanches) de chicon.

Conclusions et perspectives

1. Conclusions

Dosage de la cellulose et des hémicelluloses

Sur base d'une analyse de la littérature comparant l'intérêt et les limitations de diverses méthodes dosant la cellulose et les hémicelluloses dans des domaines d'applications connexes, nous avons mis au point la méthode NDE-SAH-LC-CAD. Cette méthode consiste à :

- Extraire les constituants non-lignocellulosiques au détergent neutre (NDE) de Van Soest ;
- Hydrolyser à l'acide sulfurique (SAH) la cellulose et les hémicelluloses en monosaccharides ;
- Séparer les monosaccharides issus de l'hydrolyse acide de la cellulose et des hémicelluloses (résolution entre les pics chromatographiques de monosaccharides est supérieure à 1,50) par chromatographie liquide (LC) classique ;
- Quantifier les monosaccharides libérés par l'hydrolyse acide avec un détecteur d'aérosol chargé (CAD).

Cette méthode s'avère appropriée pour le dosage de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses végétales en vue de les valoriser en énergie. Elle est applicable à une grande diversité de biomasses végétales. Elle permet de quantifier ces deux polymères avec un degré élevé d'exactitude car elle est précise et elle les quantifie sur base de leur analyse en monosaccharides. Toutefois, pour prendre en compte la dégradation des monosaccharides venant des de cellulose et des hémicelluloses, il est nécessaire de traiter en parallèle aux échantillons analysés un mélange de référence standard de monosaccharides.

En comparant la méthode NDE-SAH-LC-CAD, à la méthode de référence de Van Soest, nous avons observé que cette dernière surestime les teneurs en cellulose (en moyenne de 15,3% pour les biomasses commélinoides et 34,7% pour les biomasses angiospermes non-commélinoides) et en hémicelluloses (en moyenne de 9,5% pour les biomasses commélinoides), sauf pour la teneur en hémicelluloses dans les biomasses angiospermes non-commélinoides qu'elle sous-estime (en

moyenne de 20,0%). Le calcul de la teneur en cellulose et en hémicelluloses par la méthode de Van Soest est entaché d'un biais car elle est basée sur des fractions contenant d'autres constituants structuraux non-(hémi-)cellulosiques. L'ampleur de ces biais indique qu'il est primordial de savoir avec quelle méthode la cellulose et les hémicelluloses sont quantifiées. Cette donnée est essentielle pour les filières de valorisation des biomasses pour estimer correctement les potentialités liées à l'utilisation de la cellulose et des hémicelluloses des biomasses.

Nous avons montré que les résultats qui seraient obtenus par la méthode NDE-SAH-LC-CAD peuvent néanmoins être prédits à partir de la méthode de Van Soest à l'aide des équations de conversion. Ces équations sont choisies en fonction de la nature phylogénétique de la biomasse analysée. L'intérêt de ceci réside dans le fait que, par rapport à la méthode NDE-SAH-LC-CAD, la méthode de Van Soest est plus rapide, moins chère et est une méthode de référence courante pour estimer les teneurs en cellulose et en hémicelluloses. Toutefois, elle est entachée d'un certain biais. Notons que ces équations peuvent probablement être utilisées pour des biomasses végétales semblables à celles analysées lors de cette thèse. Pour appliquer ces équations, il faut veiller à rester entre les limites de la gamme de concentration de la variable permettant de la prédiction : de 0,121 à 0,555 $\text{kg}_{\text{Cellulose Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ et de 0,130 à 0,379 $\text{kg}_{\text{Hémicelluloses Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ pour les biomasses commélinoides, et de 0,053 à 0,660 $\text{kg}_{\text{Cellulose Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ et de 0,016 à 0,218 $\text{kg}_{\text{Hémicelluloses Van Soest}}/\text{kg}_{\text{MS}}$ pour les biomasses angiospermes non-commélinoides. Néanmoins, il sera nécessaire de réaliser l'analyse chimique par les méthodes NDE-SAH-LC-CAD et de Van Soest pour confirmer l'utilisation de ces équations pour les prédictions faites sur ces nouvelles biomasses.

Dans le domaine de la valorisation énergétique des biomasses, nous pouvons donc nous satisfaire des prédictions données par ces équations. Ces prédictions permettent de classer avec une exactitude élevée les échantillons de biomasses en fonction de leurs teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en xylane. Néanmoins, l'avantage de la méthode NDE-SAH-LC-CAD est d'également donner la composition en monosaccharides dans les hémicelluloses. Comme les hémicelluloses sont constituées de différents monosaccharides, cette méthode est

nécessaire pour avoir une meilleure compréhension concernant la conversion des hémicelluloses en biocombustibles liquides de type alcool et en bioproduits.

Composition chimique et aptitudes aux conversions énergétiques des biomasses végétales

La caractérisation de la composition chimique de biomasses végétales à maturités et d'origines phylogénétiques variées a montré que chacune d'entre elles possède une composition distincte. Pour ce faire, nous avons dû utiliser notre méthode NDE-SAH-LC-CAD pour quantifier la cellulose, les hémicelluloses et la composition des hémicelluloses avec un degré élevé d'exactitude. Notre analyse en composantes principales, appliquée à l'ensemble des compositions chimiques des biomasses végétales à maturités, nous a permis de mettre en évidence que ces biomasses peuvent se structurer en groupes présentant des propriétés chimiques similaires. Ces groupes sont liés à leur origine phylogénétique (commélinoïde, magnoliophyte non-commélinoïde et gymnosperme) et à leur teneur en fibres (niveau bas et haut). Le classement de cette grande diversité de biomasses en groupes présentant des propriétés chimiques similaires permet de voir quelle filière de conversion énergétique leur convient le plus. Les groupes définis par l'analyse en composantes principales sont les suivants :

- Les biomasses commélinoïdes fibreuses (CO-FI) comme le miscanthus, le panic érigé, la paille d'épeautre, le roseau et le bambou. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont la cellulose et les hémicelluloses. Ces biomasses sont favorables à la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et, dans une moindre mesure, à la conversion énergétique par combustion après déshydratation.
- Les biomasses commélinoïdes moins fibreuses (CO-MF) comme la fétuque élevée, le dactyle, le seigle immature et le sorgho fibre, et les commélinoïdes riches en amidon (CO-AM) comme le maïs fibre. Les principaux constituants chimiques de ces deux groupes de biomasses sont la cellulose et les hémicelluloses ainsi que les sucres solubles pour les biomasses CO-MF et que l'amidon pour les biomasses CO-AM. Ces biomasses sont favorables à la conversion énergétique par digestion anaérobie sans prétraitement et à la

production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux.

- Les biomasses angiospermes non-commélinoides ligneuses (NC-LI) comme le bois de saule, de peuplier, de hêtre et de chêne, et les angiospermes non-commélinoides fibreuses (NC-FI) comme le chanvre, les fanes de topinambour, et la paille de colza, de lin et de tournesol. Les principaux constituants chimiques de ces deux groupes de biomasses sont la cellulose, les hémicelluloses ainsi que la lignine pour les NC-LI, et que les substances minérales et/ou la lignine pour les biomasses NC-FI. Les biomasses NC-LI sont favorables à la conversion énergétique par combustion après déshydratation et, dans une moindre mesure, à la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux. Par contre, les biomasses NC-FI sont favorables à la conversion énergétique par digestion anaérobie sans prétraitement et à la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux.
- Les biomasses angiospermes non-commélinoides moins fibreuses (NC-MF), comme les orties et les fanes de pomme de terre, de luzerne et de tomate. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont les protéines et les substances minérales. Ces biomasses sont favorables à la conversion énergétique par digestion anaérobie sans prétraitement.
- Les biomasses angiospermes non-commélinoides riches en sucres solubles (NC-SU), comme les racines de chicou, les tubercules de topinambour et les bulbes d'oignon. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont les sucres solubles suivis de loin par les protéines et les substances minérales. Ces biomasses sont favorables à la conversion énergétique par digestion anaérobie sans prétraitement et à la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone non-structuraux.
- Les biomasses gymnospermes fibreuses (GY-FI) comme le bois d'écicéa, de pin et de mélèze. Les principaux constituants chimiques de ces biomasses sont la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Ces biomasses sont favorables à la conversion énergétique par combustion après déshydratation et, dans une moindre mesure, à la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux.

Notons que, vu la diversité et la quantité de biomasses utilisées pour construire ces groupes, ils peuvent être extrapolés à des biomasses végétales semblables et récoltées à des périodes équivalentes (c'est-à-dire en fin de croissance ou après un séchage hivernal sur pied). En positionnant les biomasses végétales immatures dans les graphiques des scores des deux analyses en composantes, nous observons que seuls les stades de maturité les plus précoces sortent du groupe de biomasse auquel la biomasse appartient. Toutefois, ces biomasses immatures commélinoïdes et non-commélinoïdes angiospermes restent à proximités de leur groupe phylogénétique respectif.

Par une analyse en composantes principales, nous avons montré que les variables suivantes jouent un rôle important dans le clivage entre les groupes de biomasses végétales à maturités :

- Les biomasses commélinoïdes se distinguent des biomasses angiospermes non-commélinoïdes par des teneurs élevées en xylane+arabinane dans les hémicelluloses, et en hémicelluloses totales ;
- Les biomasses gymnospermes se distinguent des biomasses plus évoluées (les angiospermes) par des teneurs très élevées en mannane dans les hémicelluloses et en lignine ;
- La teneur en substances minérales contribue fortement au clivage entre les biomasses fibreuses (riches en constituants structuraux et pauvres en constituants non-structuraux) et moins fibreuses (pauvres en constituants structuraux et riches en constituants non-structuraux). Les biomasses moins fibreuses ont une part importante de feuilles dont les parois primaires sont plus riches en pectines, les parois secondaires sont moins lignifiées et dont les cytoplasmes cellulaires ont probablement des teneurs élevées en constituants non-structuraux et en substances minérales. A l'inverse, les biomasses fibreuses ont une part importante de tiges dont les parois cellulaires sont plus lignifiées (riches en parois secondaires) contiennent plus de fibres (cellulose, hémicelluloses et lignine).

Les résultats sur les pectines et ceux de la composition chimique des biomasses végétales à maturités confirment le clivage phylogénétique par la composition chimique entre les biomasses commélinoïdes et non-commélinoïdes angiospermes. Les biomasses commélinoïdes sont plus riches en hémicelluloses, qui se substituent

aux pectines, par rapport aux biomasses angiospermes non-commélinoides plus riches en pectines, qui se substituent aux hémicelluloses.

Nous avons également évalué les aptitudes des groupes de biomasses définis ci-dessus à être converties en 3 vecteurs énergétiques. Nous observons que l'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse (MODE, c'est-à-dire la matière organique digestible enzymatiquement sans prétraitement) et le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux (dont la transformation en bioéthanol nécessite un prétraitement de la biomasse) et non-structuraux des biomasses s'étendent sur des gammes étendues et dépendent fortement de la composition chimique. L'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse diminue avec l'augmentation des constituants les moins digestibles, à savoir : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Nous pouvons considérer que la MODE correspond à un niveau minimum identifiable pour cette digestion sans prétraitement de la biomasse car cette conversion biologique digère au moins autant que les enzymes utilisées dans la méthode utilisée pour doser la MODE. En général, le potentiel en bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux dépend principalement des teneurs en cellulose et en hémicelluloses, excepté pour les biomasses non-commélinoides riches en sucres solubles et commélinoides riches en amidon. Par contre, l'indicateur du potentiel d'une biomasse en combustion après sa déshydratation (le PCS) est peu variable avec la biomasse et ne dépend que de la teneur en matière organique. Il augmente avec la teneur en matière organique (qui est le complément des substances minérales). Notons que, pour les biomasses oléagineuses, la composition chimique a impact sur le PCS car il dépend de leur teneur en lipides qui ont un PCS très élevé (Ballerini et al., 2006). Ce type de biomasse n'a pas été analysé lors de cette thèse donc ces conclusions ne peuvent pas s'appliquer à cette biomasse

Composition chimique et aptitudes aux conversions énergétiques des biomasses fibreuses

L'état physiologique est un paramètre important à prendre en compte pour les procédés de valorisation d'une biomasse fibreuse car nous avons montré que sa composition chimique et ses aptitudes aux conversions énergétiques en dépendent. Généralement, pour chacune des biomasses fibreuses étudiées, au cours de la maturation de la plante :

- Les teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en lignine augmentent ;
- Les teneurs en constituants non-structuraux diminuent ;
- La teneur relative en xylane dans les hémicelluloses augmente ;
- La teneur relative en glucane hémicellulosique diminue ;
- La matière organique digestible enzymatiquement (MODE), l'indicateur du potentiel en digestion anaérobie sans prétraitement de la biomasse, diminue fortement ;
- Le pouvoir calorifique supérieur (PCS), l'indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse, augmente légèrement ;
- Le potentiel en bioéthanol total (issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux) augmente modérément.

Ces évolutions s'expliquent par la maturation de la plante au cours de laquelle ses parois primaires se lignifient et s'appauvrissent en pectines ; ses parois secondaires s'épaississent et se lignifient ; la part de feuilles diminue et la part de tiges augmente. Le maïs fibre ne suit pas ces tendances car, lors de sa maturation, de l'amidon (qui est digestible) apparaît au niveau de son épi. La part d'amidon étant une fraction importante de cette plante, elle dilue les teneurs des autres constituants chimiques.

Nous avons montré que, pour un même état physiologique, la composition chimique et les aptitudes aux conversions énergétiques de chaque biomasse fibreuse sont relativement constantes, malgré la diversité de modalités de cultures (sites, années, variétés et niveaux de fertilisation azotée) appliquées. De ce fait, pour chacune de ces biomasses à un même degré de maturation, les procédés de valorisation ne nécessiteront que très peu d'optimisation liée à la variabilité de sa

composition chimique et des aptitudes aux conversions énergétiques. Notons que la principale source de variabilité des propriétés chimiques de chacune de ces biomasses à un même état physiologique vient du facteur pédoclimatique (variable selon l'année et le site).

Evaluation des aptitudes aux conversions énergétiques

Pour réduire les coûts d'analyse lors de l'évaluation du potentiel énergétique, il convient de s'en tenir aux teneurs en cellulose, en hémicelluloses et en substances minérales. Elles nous ont permis de développer des outils d'aide à la décision pour prédire qualitativement les aptitudes de biomasses végétales aux conversions énergétiques par digestion anaérobie sans prétraitement, par combustion après déshydratation et par fermentation éthanolique.

L'aptitude d'une biomasse à être convertie par digestion anaérobie sans prétraitement se caractérise une richesse relative en substances minérales et une pauvreté relative en cellulose et en hémicelluloses tandis que l'aptitude à être convertie par combustion après déshydratation se caractérise par une pauvreté relative en substances minérales et une richesse relative en cellulose et en hémicelluloses. La plupart des biomasses présente un potentiel favorable pour la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux, non-structuraux et/ou de ces deux sources d'hydrates de carbone. Seules les biomasses angiospermes non-commélinoides moins fibreuses présentent un potentiel très peu favorable pour la production de bioéthanol car elles ont un faible teneur en hydrates de carbone total. Pour les biomasses gymnospermes fibreuses, non-commélinoides ligneuses et commélinoides très fibreuses (comme le miscanthus en fin d'hiver et le bambou), la production de bioéthanol issu des hydrates de carbone structuraux nécessite un prétraitement plus intense du fait de leur haute teneur en lignine.

Nous avons développé une clef de classification des différents groupes de biomasses végétales à maturités présentant des propriétés chimiques similaires. Cette clef permet d'identifier le groupe auquel une biomasse appartient et, ensuite, elle estime semi-quantitativement la composition chimique de cette biomasse ainsi que ses aptitudes aux conversions énergétiques. Elle donne toutes ces informations

et ce uniquement en se basant sur la quantification des trois paramètres pertinents de la composition chimique.

Notons que les conclusions pour l'aptitude à la combustion après déshydratation de la biomasse ne s'appliquent pas aux biomasses oléagineuses car la composition chimique y a un impact sur le PCS et nous ne les avons pas analysées lors de cette thèse. Les explications se trouvent ci-dessus.

Productivité brute d'énergie

Pour les biomasses fibreuses, il apparaît que la productivité brute d'énergie par hectare de culture dépend prioritairement du rendement en matière sèche par hectare (tonnes/(hectare x an)) et de la teneur en matière sèche. C'est le cas tant pour la production de biométhane, de combustible solide pour la combustion et de bioéthanol. La composition chimique et les aptitudes aux conversions énergétiques d'une biomasse ont des effets négligeables de ce point de vue. La filière de valorisation des biomasses fibreuses devra donc se focaliser sur le rendement en matière sèche par hectare et la teneur en matière sèche. Cependant, nous avons montré que la maturité des plantes doit également être prise en compte car l'optimisation des procédés de conversion de ces biomasses impose que ses propriétés chimiques soient relativement constantes.

Nous avons montré que le rendement en matière sèche par hectare de culture de biomasses fibreuses est conditionné par les conditions pédoclimatiques. Nous avons observé que, pour ces biomasses, le rendement en matière sèche par hectare atteint son maximum en automne (c'est-à-dire à la fin de la croissance de la plante) alors que, généralement, leur teneur en matière sèche est la plus élevée après le séchage hivernal sur pied (sauf pour le sorgho fibre). Pour les biomasses végétales étudiées, l'étude de l'indicateur du potentiel en combustion d'une biomasse prenant en compte son humidité (le pouvoir calorifique inférieur humide) nous a indiqué que seules les biomasses commélinoïdes fibreuses, angiospermes non-commélinoïdes ligneuses et gymnospermes fibreuses sont aptes à être valorisées par combustion sans séchage préalable.

Lorsque les constituants chimiques des biomasses fibreuses et leurs conversions potentielles en vecteurs énergétique sont exprimés par hectare, la meilleure période de récolte, pour optimiser la productivité brute d'énergie par hectare de culture, est l'automne (c'est-à-dire à la fin de la croissance de la plante). Cela s'explique par le fait que le rendement en matière sèche par hectare compense largement les propriétés chimiques qui peuvent être moins favorables comme pour l'indicateur du potentiel en combustion après déshydratation de la biomasse (le PCS) et le potentiel en bioéthanol total (issu des hydrates de carbone structuraux et non-structuraux).

2. Perspectives

Cette étude a permis d'améliorer les connaissances concernant la composition chimique et les aptitudes d'une grande diversité de biomasses végétales aux conversions énergétiques. Toutefois, il reste des points à explorer et à approfondir à ce sujet.

Composition chimique

Il faudrait analyser d'autres aspects de la composition chimique afin d'approfondir encore plus la connaissance concernant les biomasses végétales et leurs aptitudes aux conversions énergétiques.

Afin d'acquérir une compréhension de la composition chimique et des aptitudes à être converties en énergie des différents organes (feuilles, tiges et racines) végétaux, il faudrait élargir le dosage de l'ensemble des paramètres mesurés lors de cette thèse à ces organes.

Afin de compléter le bilan de masse de la composition chimique des biomasses végétales, il serait nécessaire de quantifier les constituants chimiques mineurs contenus dans la fraction non-identifiée. Cette fraction est vraisemblablement composée d'hydrates de carbone (comme les pectines), de lignine soluble en milieu acide, d'acides organiques, d'alcools, de pigments et de lipides (Hames, 2009).

Pour mieux appréhender l'aptitude d'une biomasse à être convertie en énergie par combustion, il faudrait aussi prendre en compte sa composition minérale

pour évaluer le risque que les mâchefers entrent en fusion. A cet effet, les teneurs en potassium, en sodium, en calcium, en magnésium et en silice devraient être mesurées (Defossez, 2009). Il serait également nécessaire de doser la teneur chlore et en soufre qui produisent des acides corrosifs pour l'unité de transformation et qui acidifient l'atmosphère (Defossez, 2009).

Dosage de la cellulose et des hémicelluloses

Pour solubiliser au maximum les pectines et les protéines dans les méthodes NDE-SAH-LC-CAD et de Van Soest, il faudrait les hydrolyser, respectivement, par des pectinases et des protéases. Afin de ne pas sous-estimer les teneurs en cellulose et en hémicelluloses, ces enzymes doivent être exemptes d'activités hydrolysant la cellulose et/ou les hémicelluloses, et leurs activités enzymatiques doivent être optimales à pH 7. Cette valeur de pH est importante car, à des valeurs inférieures ou supérieures à pH 7, la cellulose et/ou les hémicelluloses peuvent se solubiliser (Van Soest et al., 1985). D'un point de vue pratique, il serait préférable que ces enzymes soient actives entre 80°C et 100°C (thermotolérantes). Ainsi, la solubilisation des pectines et des protéines par ces enzymes pourra s'effectuer sur le même appareil que celui utiliser pour l'extraction au détergent neutre dans les méthodes NDE-SAH-LC-CAD et de Van Soest.

Afin de mieux appréhender le biais qui entache la méthode de Van Soest dans le calcul des teneurs en cellulose et en hémicelluloses, il faudrait doser les constituants non-(hémi)-cellulosiques présents ou absents dans les fractions permettant de réaliser ces calculs. A cet effet, la teneur en protéines dans le résidu NDF, la teneur en pectines dans le résidu ADF des biomasses angiospermes non-commélinoides et la teneur en lignine soluble en milieu acide devraient être mesurées.

Spectrométrie proche infrarouge

Afin de prédire les paramètres de composition chimique permettant d'évaluer leur potentiel énergétique, il serait intéressant de calibrer des spectromètres du proche infrarouge. La spectrométrie proche infrarouge (NIR) permettrait de mesurer ces paramètres de manière rapide, peu onéreuse, suffisamment précise et non destructive. La calibration de ces spectromètres NIR permettrait d'évaluer immédiatement leurs aptitudes à être transformées en biométhane et en bioéthanol par fermentation, et à être utilisées comme combustible solide.

Energie brute produite

Pour comparer le bilan énergétique des trois voies de conversion énergétique étudiées, il serait nécessaire de calculer l'énergie brute pouvant potentiellement être produite par chacune des voies. Pour ce faire, il faudrait évaluer la relation prédictive entre le potentiel en biométhane issu de la digestion anaérobie sans prétraitement et la MODe ou la composition chimique. Par contre, pour la production d'éthanol et pour la combustion, des relations prédictive existent déjà pour quantifier l'énergie brute pouvant potentiellement être produite sur base, respectivement, du pouvoir calorifique inférieur (PCI), du potentiel en bioéthanol calculé à partir du PCI de l'éthanol (Ballerini et al., 2006 ; Spatari et al., 2010) et du PCI sec calculé à partir du PCS et de la teneur en matière sèche de la biomasse (European Committee for Standardization, 2009).

Intensité du prétraitement pour la production de bioéthanol issu de la cellulose et des hémicelluloses

Pour la production de bioéthanol issu de la cellulose et des hémicelluloses, les biomasses ayant un rapport (cellulose+hémicelluloses)/lignine élevé comme dans les commélinoïdes (ex. : le miscanthus) sont connues pour nécessiter une intensité de prétraitement plus faible que les biomasses pour lesquelles ce rapport est faible comme dans le bois de gymnospermes (ex. : l'épicéa) et d'angiospermes non-commélinoïdes (ex. : le saule) (Didderen et al., 2008). L'étude de l'intensité du prétraitement pour la production de ce bioéthanol serait en mesure de tester

l'existence d'une relation prédictive entre l'intensité de ce prétraitement et le rapport (cellulose+hémicelluloses)/lignine.

Il serait préférable d'utiliser une seule variable comme indicateur de l'intensité du prétraitement pour la production de bioéthanol issu de la cellulose et des hémicelluloses afin de diminuer l'investissement analytique. A cet effet, la teneur en lignine et en MODe sont des candidates potentielles. La teneur en lignine est connue pour expliquer l'intensité de ce prétraitement (Didderen et al., 2008). Il est également intéressant de prendre en compte la teneur en MODe car nous avons montré qu'elle est très fortement corrélée négativement à la teneur en lignine (Partie 3 - Chapitre 9 - Tableau 5). L'étude de l'intensité du prétraitement pour la production de ce bioéthanol serait en mesure de tester l'existence d'une relation prédictive entre l'intensité de ce prétraitement (chimique, thermique et/ou mécanique) et la production de ce bioéthanol avec les teneurs en lignine et en MODe.

Unités pilotes

Afin de confirmer les aptitudes d'une biomasse à être converties en énergie selon les trois voies de transformation étudiées, il faudrait réaliser ces conversions à échelle réelle, c'est à dire sur une unité pilote spécifique à chacune des voies.

Bibliographie

Ballerini D. & Alazard-Toux N., 2006. *Les Biocarburants. Etats des lieux. Perspectives et enjeux du développement.* Paris, France : Technip. 348 p.

Defossez E., 2009. *Les technologies de combustion.* Amiens, France : Chambre Régionale d'Agriculture de Picardie.

Didderen I., Destain J., & Thonart P., 2008. *Le bioéthanol de seconde generation. La production de bioéthanol à partir de biomasse lignocellulosique.* Gembloux, Belgique : Presses Agronomiques de Gembloux, 128 p.

European Committee for Standardization, 2009. CEN/TS 14961-1:2009.5: Solid biofuels- Fuels specifications and classes - Part 1: General requirements. Brussels, Belgium : European Committee for Standardization.

Hames B., 2009. Biomass Compositional Analysis for Energy Applications, *In*: Mielenz, J., eds. Biofuels: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* vol. 581. New York, USA: Humana Press, pp. 145-183.

Spatari S., Bagley D. & MacLean H., 2010. Life cycle evaluation of emerging lignocellulosic ethanol conversion technologies. *Bioresource Technol.* **101**, 654-667.

Communications scientifiques

1. Publications

- **Godin B., Lamaudière S., Agneessens R., Schmit T., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2013.** Chemical composition and biofuels potentials of various vegetal biomasses grown under a wide diversity of conditions. *Industrial Crops and Products*, Soumis.
- **Godin B., Lamaudière S., Agneessens R., Schmit T., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2013.** Chemical composition and biofuels potentials of various vegetal biomasses: influence of the harvest period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Soumis.
- **Godin B., Lamaudière S., Agneessens R., Schmit T., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2013.** Chemical composition and biofuels potentials of a wide diversity of vegetal biomasses. *Energy and Fuels*, Soumis.
- **Godin B., Agneessens R., Gerin P. A. & Delcarte J., 2013.** Structural carbohydrates in plant biomasses: correlations between the detergent fiber and the dietary fiber methods. *Biomass and Bioenergy*, Soumis.
- **Delfosse P., Barthelemy M. & Godin B., 2012.** Plantes lignocellulosiques. Trois voies de valorisation énergétique. *Travaux & Innovations*, **186**, IV-VIII.
- **Godin B., Agneessens R., Gerin P. A. & Delcarte J., 2011.** Composition of structural carbohydrates in biomass: Precision of a method using a neutral detergent extraction and a charged aerosol detector. *Talanta*, **85**, 2014-2026.
- **Godin B., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Gerin P. A. & Delcarte J., 2011.** Revue sur les méthodes de caractérisation des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **15**, 165-182.
- **Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Schmit T., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2010.** Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de biocarburants de deuxième génération. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **14**(S2), 549-560.

- **Ghysel F., Godin B., Flamin C., Delfosse P., Delcarte J. & Stilmant D., 2010.** Valorisation énergétique des fourrages : comparaison de trois filières, enjeux et opportunités. *Fourrages*, **203**, 163-173.

2. Posters avec abstract

- **Godin B., Agneessens R., Gerin P. A. & Delcarte J., 2012.** Chemical composition of plant biomasses and impacts on their biofuel potentials. *Journée Scientifique sur l'énergie de l'EDT GEPROC, 8 novembre 2012, Louvain-La-Neuve, Belgique.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2012.** Chemical composition and biofuels potentials of various vegetal biomasses. *Ghent Bio-Economy Summer School, 7-10 August 2012, Gent, Belgium.*

Awarded of the Green Biotechnology Price of the Ghent Bio-Economy Summer School.

- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2012.** Evolution of main chemical components content and monosaccharidic content of hemicelluloses in several lignocellulosic grass crops grown under different crop husbandry conditions. *20th European Biomass Conference and Exhibition, 18-22 June 2012, Milano, Italy.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2012.** Influence of crop conditions on main chemical components content and monosaccharidic content of hemicelluloses in miscanthus and switchgrass. *20th European Biomass Conference and Exhibition, 18-22 June 2012, Milano, Italy.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2012.** Influence of crop conditions on the composition of structural polysaccharides in several lignocellulosic grass crops. *24th General Meeting of the European Grassland Federation, 3-7 June 2012, Lublin, Poland.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2012.** Evolution of sorghum and corn

composition with the harvest period, with focus on the hemicelluloses monosaccharidic composition. *Journée annuelle de l'EDT GEPROC & ENVITAM*, 8 février 2012, Gembloux, Belgique.

- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2012.** Evolution of miscanthus and switchgrass composition with the harvest period, with different crop husbandry conditions and with focus on the hemicelluloses monosaccharidic composition. *Journée annuelle de l'EDT GEPROC & ENVITAM*, 8 février 2012, Gembloux, Belgique.
- **Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Schmit T., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2010.** Monosaccharidic content of hemicelluloses in various lignocellulosic crops. *Biomass derived pentoses: from biotechnology to fine chemistry*. 14-16 November 2010, Reims, France.
- **Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Schmit T., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2010.** Composition en monosaccharides des hémicelluloses de diverses biomasses lignocellulosiques. *Journée Scientifique annuelle de la Société Royale de Chimie : La Chimie Verte*. 14 octobre 2010, Gembloux, Belgique.
- **Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Schmit T., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2010.** Valorisation des cultures lignocellulosiques sous forme de bioéthanol de deuxième génération : 1. Caractéristiques de ces matières premières. *La Production de Biomasse-Energie*. 24 septembre 2010, Gembloux, Belgique.
- **Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Schmit T., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2010.** Valorisation des cultures lignocellulosiques sous forme de bioéthanol de deuxième génération : 2. Estimation du potentiel de production. *La Production de Biomasse-Energie*. 24 septembre 2010, Gembloux, Belgique.
- **Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Schmit T., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Goffart J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2009.** Détermination de la cellulose, des hémicelluloses, de la lignine et des cendres dans diverses cultures lignocellulosiques dédiées à la production de biocarburants de deuxième génération. *2^{ème} journée thématique de l'EDT*

GEPROC : Le génie des procédés et les bio-industries, 16 décembre 2009, Gembloux, Belgique.

- **Godin B., Ghysel F., Agneessens R., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2009.** Prédiction du pouvoir calorifique supérieur de cultures lignocellulosiques dédiées à partir de leurs teneurs en principaux composés constitutifs. *2^{ème} journée thématique de l'EDT GEPROC : Le génie des procédés et les bio-industries, 16 décembre 2009, Gembloux, Belgique.*
- **Godin B., Ghysel F., Schmit T., Agneessens R., Gofflot S., Lamaudière S., Sinnaeve G., Destain J.-P., Gerin P. A., Stilmant D. & Delcarte J., 2009.** Cellulose, hemicelluloses, lignin, and ash content in various green energy crops for second generation biofuels production. *5th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries, 10-12 June 2009, Gent, Belgium.*

3. Communications orales

- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2012.** Chemical composition and biofuels potentials of various vegetal biomasses. *Belgian Biomass Workshop in the frame of BERA/EERA, 27-28 August 2012, Louvain-La-Neuve, Belgium.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2012.** Main chemical components of lignocellulosic biomasses and their evolution according to the harvest date. *20th European Biomass Conference and Exhibition, 20 June 2012, Milano, Italy.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2012.** Principaux constituants chimiques et potentiel de production de bioéthanol de deuxième génération des biomasses lignocellulosiques. *Colloque de fin de projet ENERBIOM : Production agricole durable de biomasse énergie : Quelles alternatives pour quelles filières ? 20 mars 2012, Harzé, Belgique.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2011.** Potentialités offertes pour la valorisation de ces cultures énergétiques sous forme de bioéthanol de deuxième génération.

Nouvelle valorisation de la biomasse-énergie, 14 septembre 2011, Gembloux, Belgique.

- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2010.** Potentialités offertes pour la valorisation de ces cultures énergétiques sous forme de bioéthanol de deuxième génération. *La Production de Biomasse-Energie, 24 septembre 2010, Gembloux, Belgique.*
- **Godin B., Agneessens R., Schmit T., Lamaudière S., Goffart J.-P., Stilmant D., Gerin P. A. & Delcarte J., 2009.** Potentiel en bioéthanol de la biomasse lignocellulosique. *La Production de Biomasse Energie, 12 octobre 2009, Libramont, Belgique.*

