



**UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE**

Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé 358 URCA

**THÈSE DE DOCTORAT**

Spécialités Sciences des Matériaux

Etude des relations entre structures et propriétés de films d'arabinoxylanes isolés de co-produits agricoles

Par

**Ying ZHANG**

**Soutenue le 01 Février 2012**

Directrice de thèse : Caroline REMOND

Co-encadrement : Catherine JOLY

**Jury de soutenance**

M Stéphane MARAIS – Université de Rouen

Rapporteur

M Pierre-Yves PONTALIER – ENSIACET Toulouse

Rapporteur

M Luc SAULNIER – INRA Nantes

Examineur

Mme Caroline REMOND – Université de Reims

Directrice de thèse

Mme Catherine JOLY – Université de Lyon 1

Co-encadrant de thèse

## Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail. M Stéphane MARAIS (Professeur à l'Université de Rouen), M Pierre-Yves PONTALIER (Maître de Conférences à l'ENSIACET de Toulouse) et M Luc SAULNIER (Directeur de Recherches à l'INRA de Nantes).*

*Je remercie l'INRA et la région Champagne-Ardenne pour avoir financé ma bourse de thèse. Je voudrais remercier sincèrement Caroline Rémond et Catherine Joly, mes directrices de thèse, pour m'avoir confié ce travail. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée au cours de ces trois années. Je tiens à les remercier tout particulièrement pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur écoute.*

*Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR FARE (Fractionnement des Agro-Ressources et Environnement) de Reims dans l'équipe TBL (Transformations Biologiques des Lignocelluloses), et au sein de l'équipe TPML (Transformations Physicochimiques des Matériaux Lignocellulosiques). Je tiens à remercier M. Bernard Kurek, directeur de l'UMR FARE pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherches.*

*I would like thank Pr Maija Tenkanen for giving me the opportunity to work with her excellent team and for her warm welcome, valuable advice and comments during my PhD study.*

*Je veux aussi remercier ici monsieur Jacques Douglade, Professeur des Universités à Reims pour l'aide essentielle qu'il m'a fournie lors des analyses par diffraction des rayons X.*

*Ensuite je remercie chaleureusement toutes les personnes de l'UMR FARE de Reims. Un grand merci à Johnny, pour ses conseils et partages. Un merci spécial à Miguel et à Nathalie, pour toute l'aide et les conseils prodigués pendant ma thèse. Merci à Alain, François, Jean-Eudes, David, Anouk et Olivier pour leur soutien technique et le partage de leurs riches connaissances dans leur domaine. Merci également à Delphine, Agnès et Frédéric pour leur aide*

*concernant toutes les affaires administratives. Merci à tous les thésards et CDD de l'UMR avec lesquels j'ai passé trois années agréables : Rahime, Pymous, Mohamad, Youen, Véronique, Marjorie, Florent, Grégory et Farouk. Merci pour tous excellents souvenirs avec vous !*

*Enfin, un merci du fond du cœur à toute ma famille et aussi à tous mes amis.*

## *Table des matières*

### **Introduction générale**

### **Synthèse bibliographique**

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | La biomasse lignocellulosique.....                                       | 17 |
| 1.1   | Généralités .....  | 17 |
| 1.2   | Les co-produits agricoles, ressources végétales d'intérêt .....          | 18 |
| 1.2.1 | Son de blé.....  | 18 |
| 1.2.2 | Paille de blé.....   | 20 |
| 1.2.3 | Rafles de maïs .....   | 21 |
| 1.3   | Les principaux constituants des parois végétales lignocellulosiques..... | 23 |
| 1.3.1 | Généralités .....  | 23 |
| 1.3.2 | La cellulose .....   | 23 |
| 1.3.3 | La lignine .....   | 24 |
| 1.3.4 | Les hémicelluloses .....   | 25 |
| 2     | Production et valorisation des xylanes .....                             | 28 |
| 2.1   | Extraction et fractionnement des xylanes .....                           | 28 |
| 2.1.1 | Méthodes d'extraction.....   | 28 |
| 2.1.2 | Méthodes de fractionnement.....  | 31 |
| 2.2   | Propriétés physico-chimiques des xylanes.....                            | 31 |
| 2.2.1 | Structure et conformation.....   | 31 |
| 2.2.2 | Solubilité.....  | 33 |
| 2.2.3 | Masse moléculaire.....   | 34 |
| 2.2.4 | Propriétés en solution des xylanes .....                                 | 36 |
| 2.3   | Films à base de xylanes.....   | 37 |
| 2.3.1 | Généralités .....  | 37 |
| 2.3.2 | Propriétés hygroscopiques .....  | 38 |
| 2.3.3 | Propriétés thermiques.....   | 40 |
| 2.3.4 | Propriétés mécaniques.....   | 44 |
| 2.3.5 | Propriétés barrières .....   | 48 |
| 3     | Films nanocomposites .....   | 55 |
| 3.1   | Généralités .....  | 55 |
| 3.2   | Nanocristaux de cellulose .....  | 56 |
| 3.2.1 | Production .....   | 56 |
| 3.2.2 | Morphologie.....   | 57 |
| 3.2.3 | Applications .....   | 57 |
| 3.3   | Cellulose bactérienne .....  | 58 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.4   | Cellulose microfibrillée.....                                  | 58 |
| 3.5   | Renforcement des films par les nanocristaux de cellulose ..... | 58 |
| 3.5.1 | Mise en œuvre .....  | 58 |
| 3.5.2 | Microstructure .....   | 59 |
| 3.5.3 | Propriétés des nanocomposites .....                            | 60 |

## Matériels et Méthodes

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1   | Matériels .....  | 76 |
| 1.1 | Les diverses ressources végétales utilisées .....  | 76 |
| 1.2 | Les enzymes .....  | 76 |
| 2   | Méthodes de production des xylanes et des whiskers de cellulose .....  | 77 |
| 2.1 | Extraction des xylanes .....   | 77 |
| 2.2 | Purification des xylanes par traitement à la lichenase .....   | 78 |
| 2.3 | Production des nanocristaux de cellulose à partir de linters de coton .....  | 78 |
| 3   | Méthodes de caractérisation des Hémicelluloses (HC) et des ArabinoXylanes (AX) .....   | 79 |
| 3.1 | Analyse de la composition en monosaccharides neutres .....   | 79 |
| 3.2 | Analyse de la composition en monosaccharides acides.....   | 80 |
| 3.3 | Dosages des teneurs en protéines et en lignine .....   | 80 |
| 3.4 | Analyse des structures des arabinoxylanes .....  | 81 |
| 3.5 | Traitement enzymatique par les arabinofuranosidases .....  | 82 |
| 3.6 | Analyse par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC).....  | 83 |
| 4   | Préparation des films .....  | 84 |
| 4.1 | Préparation des films d'hémicelluloses HC et d'arabinoxylanes AX.....  | 84 |
| 4.2 | Préparation des films nanocomposites AX-nanocristaux .....   | 84 |
| 4.3 | Stockage et conditionnement des films.....   | 84 |
| 5   | Méthodes de caractérisation des films .....  | 84 |
| 5.1 | Observation par microscopie optique .....  | 84 |
| 5.2 | Observation de la morphologie des films par microscopie électronique à balayage (MEB)  | 84 |
| 5.3 | Analyse par rayons X.....  | 85 |
| 5.4 | La densité des films à l'état sec .....  | 86 |
| 5.5 | Isothermes de sorption d'eau .....   | 87 |
| 5.6 | Spectrométrie diélectrique (DEA) .....   | 87 |
| 5.7 | Coefficients de perméabilité à l'oxygène par oxo luminescence.....   | 88 |
| 5.8 | Mesure des coefficients de perméabilité à l'aide d'un perméamètre commercial Systech 800191  |    |
| 5.9 | Le coefficient de diffusion d'oxygène et perméabilité relative (faibles quantités de films): réalisation d'un micro-test de perméation ..... | 91 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 5.10 | Le coefficient de solubilité d'oxygène à l'état sec..... | 93 |
|------|--|----|

## Chapitre 1

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 1     | Introduction.....  | 99  |
| 2     | Results and discussion .....   | 100 |
| 2.1   | Isolation, fractionation and composition of HemiCelluloses (HC) and ArabinoXylanes (AX)..... | 100 |
| 2.2   | Analysis of the substitution patterns of AX.....   | 106 |
| 2.2.1 | Hydrolysis of AX with an endo- $\beta$ -1,4-xylanase .....                                   | 106 |
| 2.2.2 | Hydrolysis of AX by $\alpha$ -L-arabinofuranosidases.....                                    | 111 |
| 2.3   | HPSEC analysis of AX .....   | 113 |
| 2.3.1 | HPSEC analysis in DMSO solution.....   | 113 |
| 2.3.2 | HPSEC analysis in aqueous solution .....   | 115 |
| 2.4   | Film properties of HC and AX.....  | 118 |
| 2.4.1 | <i>X-ray analysis</i> .....  | 118 |
| 2.4.2 | <i>Film density measurement in dry environment</i> .....                                     | 120 |
| 2.4.3 | <i>Water sorption properties</i> .....   | 121 |
| 2.4.4 | <i>Viscoelastic properties</i> .....   | 123 |
| 2.4.5 | <i>Oxygen permeability coefficient</i> .....   | 126 |
| 2.4.6 | <i>Oxygen diffusion coefficient</i> .....  | 128 |
| 2.4.7 | <i>Oxygen solubility in dry environment</i> .....  | 130 |
| 3     | Conclusion .....   | 131 |

## Chapitre 2

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 1     | Introduction.....  | 137 |
| 2     | Results and discussion .....   | 137 |
| 2.1   | Chemical composition of polymer matrices .....                       | 137 |
| 2.2   | Nanocomposite films .....  | 138 |
| 2.3   | X-ray analysis .....   | 140 |
| 2.4   | Film density in dry environment.....                                 | 143 |
| 2.5   | Water sorption properties.....                                       | 143 |
| 2.6   | Viscoelastic properties .....  | 146 |
| 2.6.1 | <i>Beta transition</i> .....   | 146 |
| 2.6.2 | <i>Alpha transition</i> .....  | 148 |
| 2.6.3 | <i>Apparent activation energy of alpha and beta relaxation</i> ..... | 150 |
| 2.6.4 | <i>Oxygen permeability and solubility</i> .....                      | 152 |
| 3     | Conclusion .....   | 154 |

### **Chapitre 3**

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 1   | Introduction.....                                      | 159 |
| 2   | Results and discussion .....                           | 160 |
| 2.1 | Chemical composition of water insoluble fractions..... | 160 |
| 2.2 | Analysis of the substitution patterns .....            | 162 |
| 2.3 | Analysis of hydrolytic efficiency of Shearzyme.....    | 165 |
| 2.4 | HPSEC analysis .....                                   | 167 |
| 2.5 | X-ray analysis .....                                   | 168 |
| 2.6 | Water sorption properties.....                         | 171 |
| 2.7 | Viscoelastic properties .....                          | 172 |
| 3   | Conclusion .....                                       | 174 |

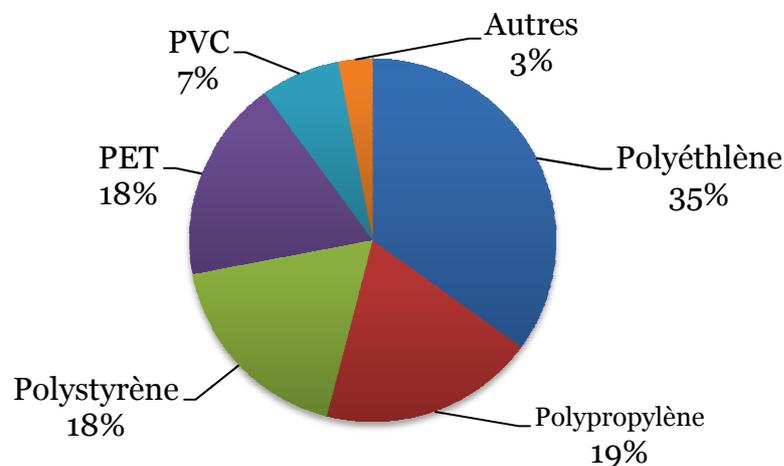
### **Discussion générale et Perspectives**

#### **Annexe 1**

#### **Annexe 2**

## **Introduction générale**

La production mondiale de plastiques s'élevait à 245 millions de tonnes en 2008<sup>1</sup>. La plupart des plastiques sont actuellement produits à partir du pétrole et du gaz naturel. Toutefois, les ressources énergétiques fossiles sont limitées et ne pourront répondre aux besoins croissants de la population mondiale. L'épuisement et préalablement la hausse du coût de l'énergie fossile paraît inéluctable : il est par exemple estimé que la réserve de pétrole sera épuisée avant la fin du XXI<sup>e</sup> siècle<sup>2</sup>. Actuellement, plus de 40% des matériaux plastiques sont utilisés pour l'emballage<sup>3</sup>. Les principaux polymères sur le marché de l'emballage alimentaire sont les polyoléfines telles que le polypropylène, le polyéthylène, suivies par le polystyrène et le polyéthylène téréphtalate. La Figure 1 présente la répartition des principaux polymères utilisés dans le domaine de l'emballage alimentaire. Malgré le recyclage d'une faible partie des emballages plastiques, ces derniers sont toujours considérés comme une importante source de pollution environnementale.



**Figure 1** : répartition des principaux polymères sur le marché de l'emballage alimentaire<sup>4</sup>.

La valorisation des matières premières renouvelables d'origine végétale pour la fabrication de biomatériaux répond à une double nécessité : (1) offrir une alternative aux ressources fossiles, (2) répondre aux défis environnementaux actuels, notamment la lutte contre l'émission de gaz à effet de serre et la réduction des pollutions (air, sol, eau) tout en développant des produits biodégradables présentant une innocuité pour l'homme et l'environnement. La capacité de production mondiale des biomatériaux reste faible mais présente une très forte croissance (<http://en.european-bioplastics.org/>). A titre d'exemple, la part mondiale des

<sup>1</sup> <http://www.planetoscope.com/petrole/989-production-de-plastique-dans-le-monde.html>

<sup>2</sup> <http://www.planete-energies.com/fr/l-energie-demain/l-avenir-des-energies-actuelles/l-avenir-du-petrole-et-gaz-263.html>

<sup>3</sup> Grondahl, M., L. Eriksson, et al. (2004). "Material properties of plasticized hardwood Xylans for potential application as oxygen barrier films." *Biomacromolecules* 5(4): 1528-1535.

<sup>4</sup> Thèse, Ayadi Farouk, 2011, « Etude des facteurs contrôlant le comportement mécanique des matériaux à base de farine de maïs »

polymères biodégradables est passée de 0,03 % en 2000 à 0,3 % en 2005 ce qui correspond à une production proche de 360 000 Tonnes/an.

Les biopolymères tel que l'amidon et les protéines ont d'ores et déjà fait l'objet de nombreux développements pour une utilisation potentielle dans le domaine de l'emballage alimentaire<sup>5</sup>. Ces polymères polaires possèdent d'excellentes propriétés barrière aux gaz ou aux arômes très recherchées dans le domaine des emballages alimentaires limitant notamment l'oxydation des aliments<sup>6</sup> et la préservation des arômes<sup>7</sup>.

Les hémicelluloses sont également de bons candidats pour la production de matériaux renouvelables pour une application emballage. En effet, les hémicelluloses, polymères issus des ressources lignocellulosiques, sont le deuxième biopolymère renouvelable *le plus abondant* sur terre après la cellulose. Parmi les hémicelluloses, les xylanes constituent une part importante des parois végétales (20% à 35% de la matière sèche selon les espèces végétales). Comme tous les polymères polaires, les hémicelluloses conduisent à des réseaux macromoléculaires denses et peu mobiles, ce qui leur confère intrinsèquement d'excellentes propriétés barrière aux gaz. Par rapport à l'amidon, les hémicelluloses présentent (i) des propriétés barrière plus élevées, les macromolécules présenteraient un meilleur « packing » lié à la structure intrinsèque des pentoses (masse moléculaire faible, absence de groupements CH<sub>2</sub>OH...) <sup>8</sup> (ii) l'avantage d'une très faible tendance à la création de structures ordonnées, ce qui préserve la transparence des films et (iii) des propriétés beaucoup plus modulables en fonction de l'origine botanique, du procédé de fractionnement qui permet l'isolement d'hémicelluloses de différentes structures (taux de décoration résiduels variables et contrôlés). Par rapport aux protéines, les propriétés barrière aux gaz sont également intrinsèquement meilleures (par absence de groupement chimique tiers)<sup>9</sup>.

En revanche, mais à l'instar de leurs « concurrents » amidons et protéines, les hémicelluloses sont généralement des macromolécules de faible masse moléculaire (et sensibles à l'eau), ce qui limite les propriétés mécaniques des films qu'elles forment. L'amélioration des

---

<sup>5</sup> <http://averousl.free.fr/biodegradable.html>

<sup>6</sup> Dole, P., C. Joly, et al. (2004). "Gas transport properties of starch based films." *Carbohydrate Polymers* **58**(3): 335-343.

<sup>7</sup> Marcuzzo, E., A. Sensidoni, et al. (2010). "Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavour release." *Carbohydrate Polymers* **80**(3): 984-988.

<sup>8</sup> Grondahl, M., L. Eriksson, et al. (2004). "Material properties of plasticized hardwood Xylans for potential application as oxygen barrier films." *Biomacromolecules* **5**(4): 1528-1535.

<sup>9</sup> Grondahl, M., L. Eriksson, et al. (2004). "Material properties of plasticized hardwood Xylans for potential application as oxygen barrier films." *Biomacromolecules* **5**(4): 1528-1535.

propriétés mécaniques est généralement abordée par une stratégie de plastification, par le biais de la formulation des hémicelluloses avec un polyol. Cependant, la plastification provoque un effet souvent négatif sur les propriétés barrières, et par conséquent, le meilleur compromis entre ces caractéristiques se traduit par un matériau n'entrant pas dans les cahiers des charges des applications en emballage.

Ce travail de thèse s'inscrit pour partie dans le cadre du programme européen ERAnet Woodwisdom BIOPACK (janvier 2008/2011), auquel l'UMR a participé en collaboration avec les équipes de L. Salmen (coordinateur Biopack, Suède) P. Gatenholm (Suède), et M. Tenkanen (Finlande)<sup>10,11</sup>. Ce programme a pour mission la réalisation de nanocomposites biosourcés basés sur l'utilisation de renforts nanocellulosiques noyés dans une matrice d'hémicelluloses (« Biopack : design of biocomposites based on nanocellulose and hemicelluloses for future packaging materials »)<sup>12</sup>.

Dans ce programme (Biopack), 3 thésards (Jasna Stévanic<sup>9</sup>, Kirsi Mikkonen<sup>10</sup>, et Ying Zhang) ont pour partie intégré dans leurs travaux de doctorat certaines des actions représentatives de ce programme soient :

- (i) la sélection de substrats hémicellulosiques d'intérêt basée sur des ressources commerciales (Arabinoxylanes (AX) de seigle et Glucomannanes de konjac) ou sur des méthodes d'extraction (Glucomannanes d'épicea) (tâche des partenaires suédois et finlandais),
- (ii) l'utilisation de nanocharges (cellulose bactérienne, microfibrilles de cellulose) pour l'amélioration des propriétés mécaniques. Des nanocharges de cellulose sont introduites dans les matrices d'hémicelluloses sélectionnées (tâche communes aux différents partenaires) ou plus simplement par traction mécanique
- (iii) la modulation enzymatique de la structure des hémicelluloses est effectuée dans le but d'éliminer de manière contrôlée les groupes substituants les chaînes de

---

<sup>10</sup> Jasna Stevanic Srndovic, Thesis, 2011 "Interaction between Wood Polymers in Wood Cell Walls and Cellulose/Hemicellulose Biocomposites".

<sup>11</sup> Kirsi S.Mikkonen, Thesis, 2009 "Mannans as film formers and emulsion stabilizers".

<sup>12</sup> [http://www.woodwisdom.net/mm\\_files/do\\_849/BioPack\\_ProjectOverview.pdf](http://www.woodwisdom.net/mm_files/do_849/BioPack_ProjectOverview.pdf)

xylanes et de permettre ainsi le développement d'interactions privilégiées cellulose/hémicellulose (tâche du partenaire finlandais). Les nouvelles structures obtenues sont également susceptibles de présenter une morphologie nouvelle ceci contribuant à la faible diffusivité des gaz sorbés (amélioration des propriétés barrière) (tâche du partenaire français).

- (iv) En outre, le substrat hémicellulosique modèle retenu (arabinoxylanes de seigle) a été hydrolysé enzymatiquement afin d'être utilisé comme hémicelluloses de plus basse masse moléculaire modélisant ainsi les hémicelluloses de bois (tâche du partenaire finlandais).

Le tableau 1 ci-dessous présente les travaux dans le projet « Biopack »

**Tableau 1** : les contributions des partenaires dans le projet de Biopack.

| Substrat Hémicellulose | Source | Modification enzymatique | Renforcement              | Propriétés étudiées  | Partenaire concerné       |
|------------------------|--------|--------------------------|---------------------------|--|---------------------------|
| Glucomannanes          | Konjac | Non                      | Nanocristaux de cellulose | degré de cristallinité;<br>propriétés mécanique;<br>température de décomposition;<br>sorption d'eau.       | Maija Tenkanen (Finlande) |
| Galacto-glucomannanes  | Epicea | Non                      | Non                       | perméabilité à la vapeur d'eau;<br>perméabilité à l'oxygène;<br>perméabilité aux arômes                    | Maija Tenkanen (Finlande) |
| Arabinoxylanes         | Seigle | Oui                      | Cellulose bactérienne     | degré de cristallinité;<br>propriétés mécaniques ;<br>température transition vitreuse ;<br>sorption d'eau. | Lennart Salmén (Suède)    |
| Galacto-glucomannanes  | Epicea | Non                      | Cellulose Microfibrillée  | cristallinité;<br>température de transition vitreuse;<br>propriétés mécaniques;<br>sorption d'eau          | Maija Tenkanen (Finlande) |

L'UMR FARE intervient dans Biopack principalement pour la caractérisation des matrices (modifiées ou non) et des films nanocomposites le plus souvent réalisés par nos partenaires. La mobilité des chaînes hémicellulosiques hydratées ou non a été mesurée par spectrométrie diélectrique (relaxations alpha et beta), les isothermes de sorption d'eau ont été systématiquement enregistrées, ainsi que les propriétés barrière à l'oxygène qui ont été étudiées en fonction des substrats et du renfort sélectionné ajouté.

Dans ce contexte, la thèse traite pour une faible partie des matériaux du projet Biopack (hémicelluloses, telles que les xylanes de céréales et les mannanes de bois) à des fins de comparaison essentiellement mais trouve une dimension plus large en étant étendue à l'isolement

et la caractérisation d'hémicelluloses issues d'autres ressources végétales (plantes annuelles). En outre, elle s'appuie sur une méthodologie proche.

L'objectif de cette étude est d'établir des relations entre les structures des hémicelluloses natives (arabinoxylanes) et leurs propriétés physico-chimiques étudiées sous forme de films pour une application potentielle en tant qu'emballage alimentaire.

Les travaux de thèse sont basés sur la variabilité intrinsèque de xylanes extraits à partir de différentes ressources naturelles (paille de blé, son de blé et rafles de maïs). L'objectif est de disposer de diverses populations de xylanes variés de part leurs compositions, leurs degrés de substitutions, et leurs poids moléculaires et de les caractériser dans un second temps. Cette caractérisation permettra de cartographier leurs propriétés afin d'évaluer les performances de ces substrats polymères comme matériaux biosourcés potentiels futurs par comparaison à la gamme de matériaux (également biosourcés) disponible actuellement.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera consacré à l'étude des Arabinoxylanes (AX) de son de blé. Les AX sont extraits par un procédé alcalin et sont ensuite séparés en trois fractions en fonction de leurs solubilités dans l'eau et dans l'éthanol. Une étude des propriétés des films (isothermes de sorption d'eau, température de transition vitreuse  $T_g$ , relaxation sous vitreuse  $T_\beta$ , degré de cristallinité, perméation à l'oxygène...) permet d'établir des relations entre la structure des xylanes et leurs propriétés après mise en œuvre sous forme de films.

Le deuxième chapitre concernera les AX extraits à partir d'autres co-produits agricoles : paille de blé et rafles de maïs. La même méthode d'extraction et de fractionnement que pour les AX de son de blé a été mise en œuvre. Nous nous sommes focalisés sur les fractions insolubles dans l'eau, car celles-ci sont relativement pures (faible contamination par la lignine) et qu'elles représentent une part majoritaire des xylanes extraits. Leurs compositions, structures, et propriétés sous forme de films ont été caractérisées et comparées avec la fraction insoluble des AX de son de blé.

Le troisième chapitre sera consacré à l'étude des AX extraits à partir d'autres co-produits agricoles : paille de blé et rafle de maïs. La même méthode d'extraction et de fractionnement que pour les AX de son de blé a été utilisée. Nous nous sommes focalisés sur les fractions insolubles dans l'eau, car les fractions insolubles dans l'eau sont relativement pures (moins de lignine) et présentent un plus important rendement massique. Leurs compositions, structures, et

propriétés des films ont été caractérisés et comparés avec la fraction insoluble des AX de son de blé.

Le travail de thèse a été effectué au sein de l'équipe Transformations Biologiques des Lignocelluloses (extraction et caractérisation des arabinoxylanes) et au sein de l'équipe Transformations Physicochimiques des Matériaux Lignocellulosiques (détermination des propriétés physico-chimiques fonctionnelles des films) de l'UMR FARE INRA-URCA de Reims. La thèse a été co-financée par la Région Champagne-Ardenne et l'INRA *via* le programme Biopack. Durant la thèse, deux séjours scientifiques (Short Term Scientific Mission) ont été effectués en 2009 (6 semaines) et 2011 (4 semaines) au sein du laboratoire du Professeur Maija Tenkanen (University of Helsinki). Ces STSM ont été financés par les COST 928 et COST FP0901 respectivement. Ces missions ont permis de réaliser les analyses des masses moléculaires des xylanes ainsi que l'élucidation de leurs structures.

Les travaux de thèse ont été présentés lors de différentes manifestations scientifiques. Le bilan de ces activités est recensé ci-dessous.

- Une communication orale :

Y. Zhang, L. Pitkänen, J. Douglade, M. Tenkanen, C. Rémond, C. Joly. Wheat bran arabinoxylans: fractionation, chemical structure and films properties. Biomass-derived pentoses: from biotechnology to fine chemistry. Reims, France. 14-16 novembre 2010.

- Deux posters :

Y. Zhang, C. Rémond, L. Pitkänen, M. Tenkanen, C. Joly. Structure /property behaviour of isolated arabinoxylans from cereals. Lignobiotech One. Reims, France. 28 mars-01 avril 2010.

Y. Zhang, L. Pitkänen, M. Tenkanen, C. Rémond, C. Joly. Arabinoxylan films: structure/sub-Tg relationships. First International Meeting on Material Bioproduct Interactions, MATBIM, Paris, France. 3-5 mars 2010.

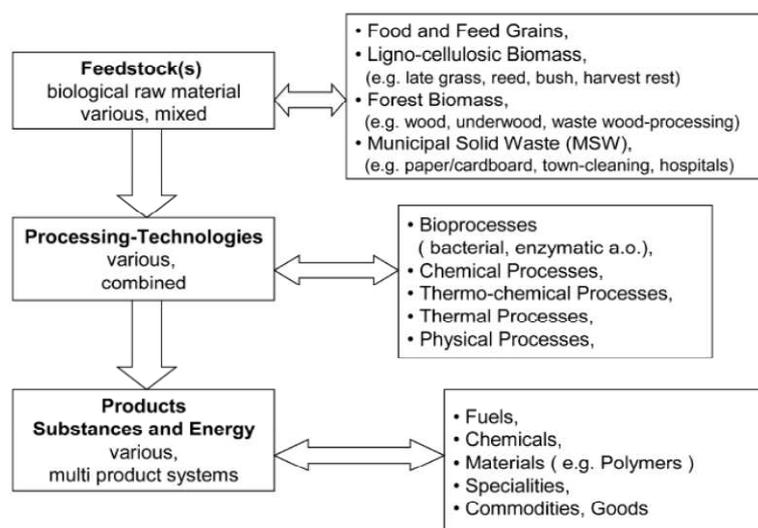
## **Synthèse bibliographique**

# 1 La biomasse lignocellulosique

## 1.1 Généralités

La plupart des produits chimiques utilisés au quotidien sont fabriqués à partir de ressources fossiles. Environ 5% de pétrole ou du gaz naturel produits chaque année sont utilisés pour préparer des plastiques et composés chimiques. Ces produits d'origines pétrochimiques, souvent non biodégradables, représentent une importante source de pollution environnementale.

La biomasse végétale représente une alternative au pétrole pour produire de l'énergie (biocarburants), des synthons et des matériaux. La bioraffinerie actuellement en plein essor est basée sur la valorisation totale de la plante (Figure 1).



**Figure 1** : Principe de la bioraffinerie (Kamm and Kamm 2004)

Dans ce contexte, la biomasse lignocellulosique suscite de nombreuses recherches. En effet, elle représente la ressource renouvelable la plus importante et la plus abondante dans le monde avec environ 200 milliards de tonnes produites chaque année (Zhang 2008). La lignocellulose mobilisable pour être transformée provient essentiellement des déchets agricoles (pailles de céréales, rafles de maïs, tiges de colza, bagasse de cannes à sucre, etc...), des déchets d'exploitations forestières (rameaux, feuilles, tronc abimés, etc...), des déchets de l'industrie du bois (sciures et rebuts) et aussi également de cultures dédiées de plantes annuelles (triticales) ou des cultures pérennes à rotation rapide (peuplier, miscanthus, saule...).

La lignocellulose est composée de trois fractions principales, la lignine, la cellulose et les hémicelluloses dont les teneurs varient en fonction des espèces végétales, de l'âge de la plante,

des tissus et du type cellulaire. Les compositions de diverses ressources végétales sont représentées dans le Tableau 1.

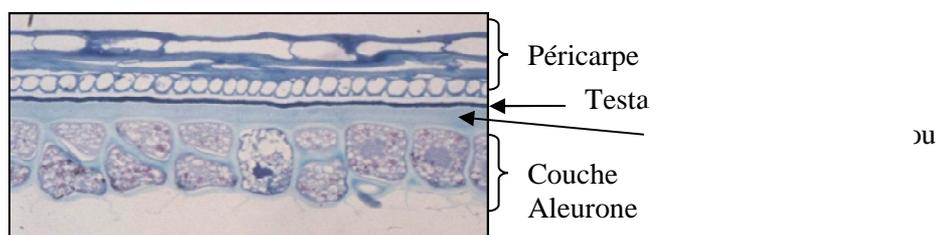
|                          | % d'hémicelluloses<br>(% MS) | % de cellulose<br>(% MS) | % de lignine<br>(% MS) | Référence                      |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Son de blé               | 30                           | 22                       | 5                      | (Hollmann and Lindhauer 2005)  |
| Paille de blé            | 22.5                         | 34.9                     | 21.3                   | (Pauly and Keegstra 2008)      |
| Rafle de maïs            | 41.4                         | 40.0                     | 5.8                    | (Kaliyan and Morey 2010)       |
| Bagasse de canne à sucre | 31.1                         | 48.6                     | 19.1                   | (Sanjuán, Anzaldo et al. 2001) |
| Bois dur                 | 31.8                         | 43.3                     | 24.4                   | (Fengel and Wegener 1989)      |
| Bois tendre              | 31.1                         | 40.4                     | 28.0                   | (Fengel and Wegener 1989)      |

**Tableau 1** : Principaux composants de diverses ressources lignocellulosiques (MS : matière sèche)

## 1.2 Les co-produits agricoles, ressources végétales d'intérêt

### 1.2.1 Son de blé

Le son de blé est une fraction de mouture obtenue lors des procédés de meunerie. Le son correspond aux parties externes du grain de blé. D'un point de vue histologique, il s'agit d'un empilement de couches cellulaires comprenant le tégument (comprenant le péricarpe externe et le péricarpe interne), le manteau (testa), la couche nucellaire (ou bande hyaline) et la couche aleurone. La Figure 2 montre les tissus constitutifs du son de blé observés par microscopie électronique à balayage (MEB).



**Figure 2** : Son de blé mature sur coupe colorée au bleu de toluidine. (Beaugrand 2004)

Le péricarpe comprend une partie interne et une partie externe. Le péricarpe externe est formé de cellules parenchymateuses aplaties recouvertes par l'hypoderme (1 à 2 couches cellulaires) et l'épiderme (monocouche cellulaire recouverte d'une cuticule). Le péricarpe interne est formé par une couche de cellules tubulaires à parois lignifiées et d'une couche de cellules

transversales à parois lignifiées alvéolées. Le péricarpe joue un rôle de protection mécanique du grain de blé. Il confère également au grain une résistance aux agents pathogènes. Par ailleurs, il intervient dans la régulation de l'absorption de l'eau par le grain (Radley 1976). La testa est un assemblage pluristratifié décrit comme un ciment très hydrophobe (Miyamoto and Everson 1958) au sein duquel sont présentes une ou deux couches de cellules très compressées riches en lipides (Miyamoto et Everson 1958). La testa assure un rôle physiologique lors de la maturation et de la germination du grain en agissant comme une barrière à la circulation d'eau, des nutriments et des gaz. La couche nucellaire ou bande hyaline est constituée d'une monocouche cellulaire complètement écrasée et vidée de son contenu lors de l'expansion de l'albumen amylicé au cours du remplissage du grain. La couche à aleurone, composée d'une couche cellulaire, entoure complètement l'albumen et joue un rôle important lors de la germination du grain de blé. C'est la seule couche de cellules vivantes du son.

La composition chimique du son de blé est variable en fonction des variétés de blé, des divers procédés de mouture et de la maturité de la plante. Par ailleurs, la composition chimique est très différente d'une couche à l'autre.

|                           | Hémicelluloses<br>(% MS) | Cellulose<br>(% MS) | Lignine<br>(% MS) | Protéines<br>(% MS) | Amidon<br>(% MS) | Référence                           |
|---------------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------|-------------------------------------|
| Son de blé<br>désamidonné | 62.1                     | 17.6                | 14.3              | 5.0                 | -                | (Bergmans,<br>Beldman et al. 1996)  |
| Son de blé<br>désamidonné | 45                       | 25                  | 6                 | 9                   | -                | (Bataillon, Mathaly<br>et al. 1998) |
| Son de blé                | 41.4                     | 12.6                | 9.8               | 15.9                | 11.8             | (Bergmans,<br>Beldman et al. 1996)  |
| Son de blé                | 19                       | 11                  | 3                 | 14                  | 29               | (Bataillon, Mathaly<br>et al. 1998) |

**Tableau 2 :** Composition chimique de son de blé et son de blé désamidonné

Après l'amidon, les hémicelluloses (Tableau 2), notamment les arabinoxylanes, sont le principal constituant du son de blé brut. Dans ce dernier, la teneur en protéines est également élevée alors que la teneur en lignine est relativement faible. Un désamidonnage du son (par lavages à l'eau ou par hydrolyse enzymatique) permet d'augmenter la proportion relative des hémicelluloses qui représentent dans ce cas le principal composant du son. Généralement, la teneur en amidon dans le son désamidonné est inférieure à 1% de la matière sèche. Etant donnée l'hétérogénéité histologique du son de blé, la composition chimique est hétérogène d'une couche à l'autre au sein du son. La couche à aleurone est très riche en arabinoxylanes.

Actuellement, les deux principales utilisations du son de blé sont l'alimentation animale (ruminants, porcs) et l'alimentation humaine. En effet, le son présente des qualités nutritionnelles (source de protéines) ainsi que des qualités physiologiques (richesse en fibres, agent de charge grâce à ses propriétés de rétention des liquides).

### 1.2.2 Paille de blé

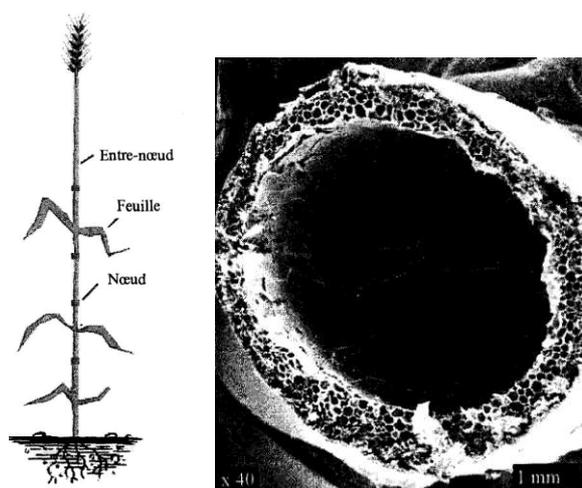
La paille, obtenue lors de la récolte du blé, est constituée des feuilles et des tiges (nœuds et entre-nœuds) sèches (Figure 3). Du point de vue histologique, la paille de blé comprend diverses couches : l'épiderme, le sclérenchyme, le parenchyme et les faisceaux de tissus vasculaires inclus dans du parenchyme. Le parenchyme généralement non lignifié, forme le tissu central. Les faisceaux vasculaires incorporés dans ce matériel cellulaire sont composés principalement de cellulose. Le sclérenchyme est un tissu ligneux formant une couche cylindrique de faible épaisseur autour du parenchyme. L'épiderme, riche en cellulose, forme une couche externe relativement résistante, imperméable à l'eau et rigide qui protège les cellules en croissance (White and Ansell 1983).

Les parois cellulaires de tous les tissus de paille de blé représentent 80 à 90% du poids sec.

|                  | Hémicelluloses<br>(% MS) | Cellulose<br>(% MS) | Lignine<br>(% MS) | Protéines<br>(% MS) | Référence                         |
|------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Paille de<br>blé | 32.6                     | 37.8                | 14.1              | 1.7                 | (Sun, Lawther et al.<br>1995)     |
|                  | 31.7                     | 40.8                | 10                | 2.4                 | (Maréchal 2001)                   |
|                  | 30.4                     | 33.7                | 17.1              | n.d                 | (Montané, Farriol et al.<br>1998) |

**Tableau 3 :** Composition chimique des pailles de blé

La composition chimique de la paille de blé varie selon l'espèce de blé et sa maturité. La cellulose et les hémicelluloses constituent les deux principaux constituants de la paille (Tableau 3). La teneur en lignine est relativement élevée comparativement à celle du son de blé. D'autre part, la composition chimique de la paille de blé diffère dans les feuilles, les nœuds et les entre-nœuds (Tableau 4).



**Figure 3 :** Fractions anatomiques de la paille de blé et coupe transversale observée par microscopie électronique à balayage (Digabel-houllier 2004)

| Composé        | Entre-nœuds<br>(% MS) | Nœuds<br>(% MS) | Feuilles<br>(% MS) |
|----------------|-----------------------|-----------------|--------------------|
| Klason lignine | 21.6                  | 21.7            | 26.8               |
| Hémicelluloses | 24.5                  | 28.6            | 25.6               |
| Cellulose      | 41.4                  | 32.7            | 32.3               |
| Protéines      | 2.9                   | 4.5             | 4.8                |

**Tableau 4 :** Composition chimique des différentes fractions de paille de blé (Pearce, Beard et al. 1979)

Les hémicelluloses de paille de blé sont constituées principalement de xylose, d'arabinose et d'acides uroniques (Tableau 5). Les compositions chimiques en sucres varient également selon les tissus.

| Sucre (g/kg M.S) | Entre-nœuds | Nœuds | Feuilles |
|------------------|-------------|-------|----------|
| Arabinose        | 2.6         | 6.7   | 4.1      |
| Xylose           | 31.5        | 30    | 35.8     |
| Mannose          | Traces      | 1.7   | Traces   |
| Galactose        | Traces      | 2.3   | Traces   |
| Glucose          | 62.5        | 52.6  | 55.7     |
| Acides uroniques | 3.4         | 6.6   | 4.4      |

**Tableau 5 :** Composition en sucres des différentes fractions de paille de blé (Aman and Nordkvist 1983)

### 1.2.3 Rafles de maïs

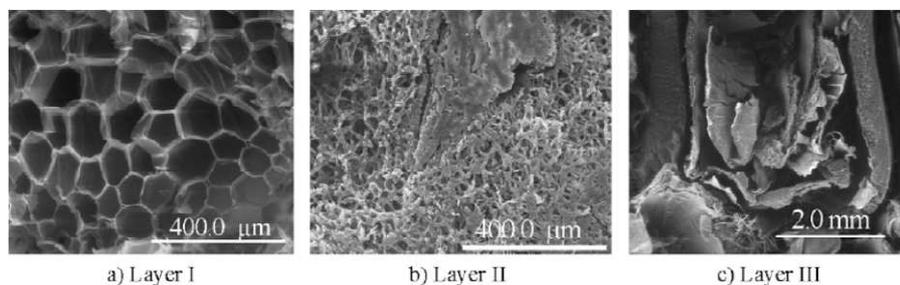
Les rafles de maïs sont un sous-produit important obtenu lors de la récupération des grains de maïs. Environ 18 kg de rafles de maïs sont produits pour 100 kg de grains de maïs

(Torre, Aliakbarian et al. 2008). Les rafles de maïs se composent de trois parties : la périphérie et la moelle, qui forment la partie légère et la ceinture ligneuse qui est la partie dure de la rafle. La Figure 4 présente une coupe transversale de la macrostructure de rafle de maïs. Trois couches différentes (I, II et III sur la Figure 4) peuvent être identifiées selon leur couleur, leur texture et leur forme. La Figure 5 montre la microstructure de ces trois couches.

Le Tableau 6 montre les analyses des compositions de rafles de maïs dont la teneur en hémicelluloses est aussi importante que la teneur en cellulose. Les arabinoxylanes représentent les principales hémicelluloses. Le Tableau 7 présente les compositions en sucres d'arabinoxylanes extraits de rafles de maïs (Ebringerová, Hromádková et al. 1997).



**Figure 4 :** Observation macroscopique et coupe transversale de rafles de maïs (Pinto, Paiva et al. 2011)



**Figure 5 :** Observation de la microstructure de rafles de maïs (Pinto, Paiva et al. 2011)

|               | Hémicelluloses<br>(% MS) | Cellulose<br>(% MS) | Lignine<br>(% MS) | Protéines<br>(% MS) | Référence                        |
|---------------|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------------------------|
| Rafle de maïs | 34.7                     | 31.7                | 20.3              | n.d <sup>a</sup>    | (Torre, Aliakbarian et al. 2008) |
|               | 41.4                     | 40.0                | 5.8               | 2.5                 | (Kaliyan and Morey 2010)         |
|               | 32.3-45.6                | 39.8                | 6.7-13.9          | n.d                 | (Foley 1978)                     |

**Tableau 6 :** Composition chimique des rafles de maïs

<sup>a</sup> : non déterminé

|                  | % des sucres totaux                   |                              |
|------------------|---------------------------------------|------------------------------|
|                  | Arabinose                             | 12,8-13,6                    |
| Xylose           | 73,6-75,6                             | 83                           |
| Glucose          | 1,0-1,9                               | 1,7                          |
| Galactose        | 2,1-3,9                               | n.d                          |
| Acides uroniques | 7,4-9,1                               | n.d                          |
| Référence        | (Ebringerová, Hromádková et al. 1997) | (Donnelly, Helm et al. 1973) |

**Tableau 7 :** Compositions en sucres des arabinoxylyanes de rafles de maïs

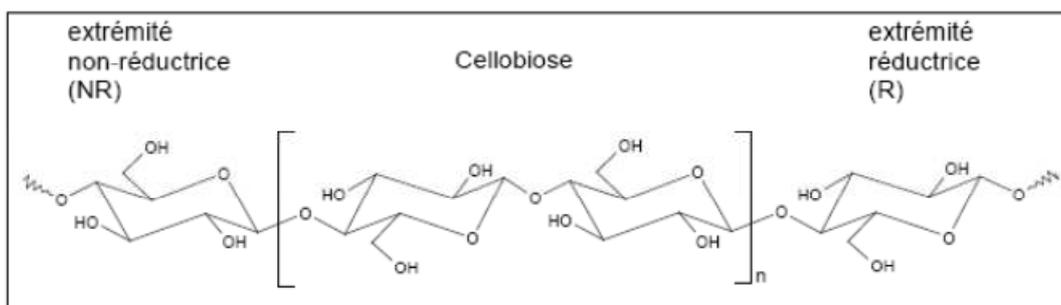
### 1.3 Les principaux constituants des parois végétales lignocellulosiques

#### 1.3.1 Généralités

De nombreuses cellules végétales possèdent une paroi secondaire en plus de la paroi primaire. La paroi primaire, rigide, assure un rôle de squelette. Elle comprend de la cellulose, des hémicelluloses et des composés pectiques. La paroi secondaire correspondant à la paroi lignocellulosique, est constituée des éléments de la paroi primaire auxquels s'ajoute la lignine. Les principaux constituants chimiques des parois végétales secondaires sont : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine. Les autres constituants moins abondants sont les pectines et les protéines.

#### 1.3.2 La cellulose

La cellulose, polymère le plus abondant sur terre, est le principal composant de la paroi végétale des plantes et du bois. Elle représente environ 50% de la biomasse et est produite à hauteur de 50-100 milliards tonnes chaque année. La cellulose est un homopolymère linéaire composé d'unités anhydroglucopyranose liées entre elles par des liaisons glycosidiques en  $\beta$ -1,4. La Figure 6 présente sa structure moléculaire.

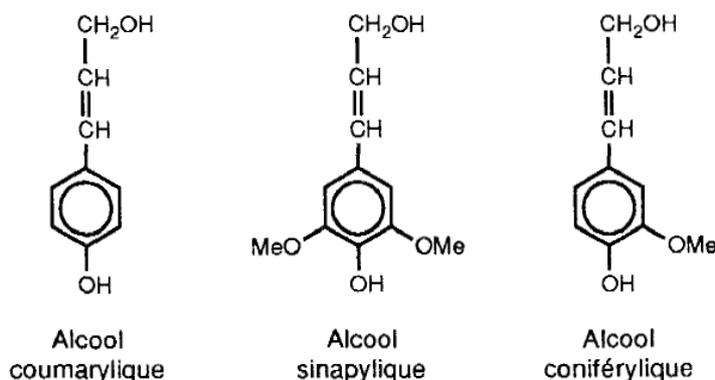


**Figure 6 :** Structure de la cellulose (Mazza 2009)

Le degré de polymérisation de la cellulose (DP) varie entre 400 et 14000 en fonction des différentes espèces végétales (Finch 1985). La cellulose possède des régions cristallines et des régions amorphes. Le taux de cristallinité de la cellulose est de 40 à 50% pour le bois, 60% pour le coton et est supérieur à 70% pour certaines algues marines (Lin, Tang et al. 1987).

Les chaînes de cellulose ont une forte tendance à s'enchevêtrer en raison de leur constitution chimique et de leur conformation spatiale. Cette conformation est favorable pour la formation de liaisons hydrogènes intra et surtout intermoléculaires. Ces liaisons hydrogènes influencent plusieurs propriétés. Grâce aux liaisons hydrogènes, les fibres de cellulose présentent une très grande résistance mécanique et une bonne ténacité. D'autre part, la cellulose est très peu soluble du fait de la présence des interactions hydrogènes difficile à rompre. Ces interactions impactent également la température de fusion de la cellulose. En effet, la température nécessaire pour la rupture de ces liaisons hydrogènes est supérieure à celle de la dégradation de la molécule (vers 200°C), qui a lieu par rupture du cycle glucopyranosique.

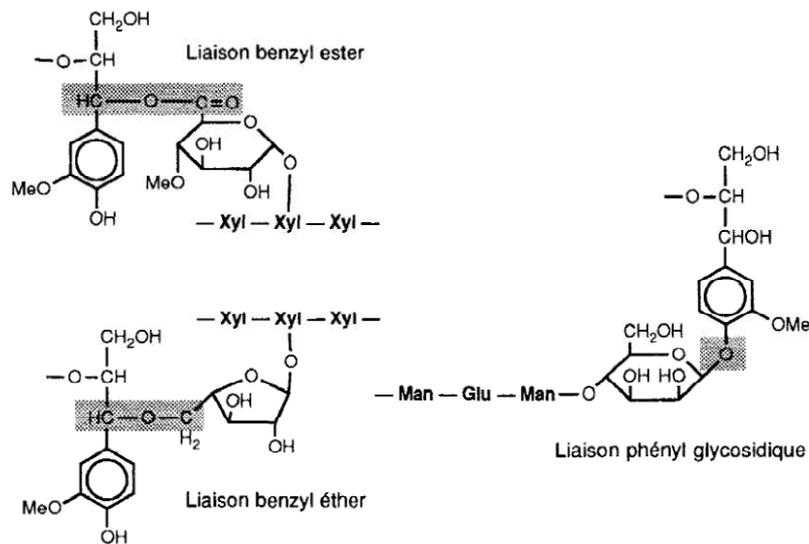
### 1.3.3 La lignine



**Figure 7 :** Les trois alcools précurseurs de la lignine. (Thiebaud 1995)

La lignine est après la cellulose, la matière organique renouvelable la plus abondante. Elle forme un réseau amorphe tridimensionnel hydrophobe complexe formé à partir de trois unités différentes de type phénylpropane: les alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylique (Figure 7). À l'inverse de la cellulose, la lignine ne comporte pas de motifs répétitifs et possède une grande diversité de liaisons inter-monomères. Sa composition est différente en fonction des espèces végétales. Les trois alcools précurseurs copolymérisent pour former la structure complexe du polymère de lignine. La réticulation est établie par un grand nombre des liaisons classées en deux catégories : les liaisons éther et les liaisons carbone-carbone. Il existe des liaisons covalentes entre la lignine et les polysaccharides tels que les xylandes (Figure 8). Les

liaisons « benzyl ester » sont établies entre des acides uroniques de glucuronoxylanes avec des groupements hydroxylés des lignines. Des liaisons éther peuvent être établies entre des substituants arabinosyl des chaînes de xylanes et des groupements hydroxylés des lignines ou entre les carbones 2 ou 3 des unités xylose avec les carbones  $\alpha$  et  $\gamma$  du groupement phénylpropane de la lignine.



**Figure 8 :** Les types des liaisons entre la lignine et les polysaccharides pariétaux (Thiebaud 1995)

### 1.3.4 Les hémicelluloses

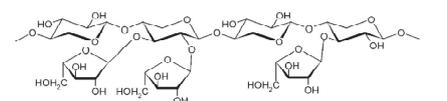
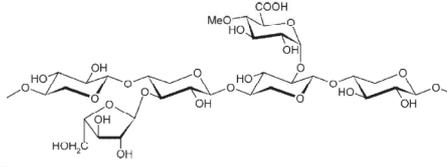
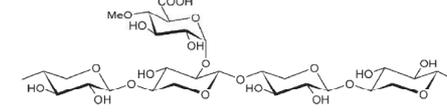
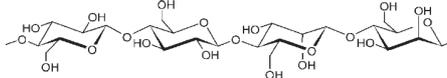
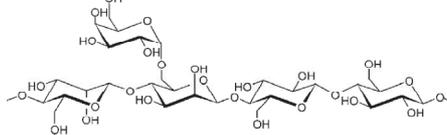
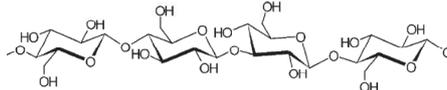
#### 1.3.4.1 Généralités

Les hémicelluloses représentent, après la cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature. Leurs structures dépendent de leur origine botanique, du tissu ou du type cellulaire, de l'âge des cellules et de leur localisation dans la paroi végétale. Elles diffèrent de la cellulose de par l'hétérogénéité de leur composition en monosaccharides. En général, elles sont constituées de chaînes moléculaires plus courtes avec un degré de polymérisation inférieur à 200.

Les hémicelluloses sont généralement divisées en quatre groupes en fonction de leur composition en sucres :

- les xylanes
- les mannanes
- les xyloglucanes
- les  $\beta$ -glucanes

Le Tableau 8 présente les différents types d'hémicelluloses, leurs origines et leurs structures.

| Hémicellulose            | Sources                        | % MS  | Résidus  | Structure  |
|--------------------------|--------------------------------|-------|--|--|
| Arabinoxylanes           | Plantes herbacées;<br>Céréales | 20-40 | $\beta$ -D-Xylopyranose;<br>$\alpha$ -L-Arabinofuranose  |   |
| Arabino-glucuronoxylanes | Bois tendre                    | 10-15 | $\beta$ -D-Xylopyranose;<br>$\alpha$ -L-Arabinofuranose ;<br>Acide 4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl uronique |   |
| Glucuronoxylanes         | Bois dur                       | 10-35 | $\beta$ -D-Xylopyranose;<br>Acide 4-O-méthyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl uronique                                  |   |
| Glucomannanes            | Bois dur                       | 3-5   | $\beta$ -D-manopyranose;<br>$\beta$ -D-glucopyranose   |   |
| Galacto-glucomannanes    | Bois tendre                    | 10-15 | $\beta$ -D-manopyranose;<br>$\beta$ -D-glucopyranose;<br>$\beta$ -D-galactopyranose                                |   |
| $\beta$ - Glucanes       | Graines;<br>Céréales           | 3-12  | $\beta$ -D-glucopyranose   |  |

**Tableau 8 :** Variabilité de composition des hémicelluloses. (Ebringerová 2005)

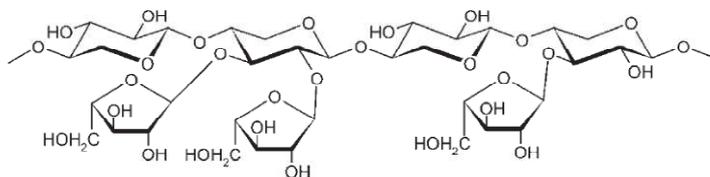
### 1.3.4.2 Les hétéroxylanes

Les xylanes sont des polymères hétérogènes qui sont classés et nommés en fonction des principaux sucres qui les constituent.

#### 1.3.4.2.1 Les arabinoxylanes

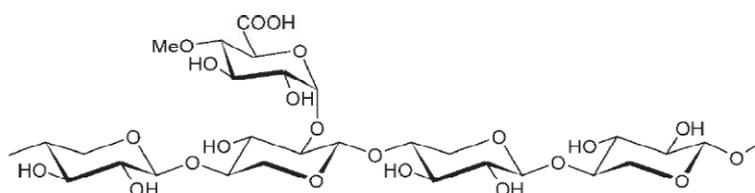
Les arabinoxylanes (AX) sont les hémicelluloses typiquement présentes dans la paroi végétale de l'endosperme et les couches externes (sons) des grains de céréales ainsi que dans les graines de plantes monocotylédones (ray-grass, pousses de bambou, ...) (Ebringerova and Heinze 2000). Par exemple, la teneur en AX varie de 0,15% dans l'endosperme du riz à 13% dans la farine de grains entiers obtenue à partir d'orge et de seigle, et jusqu'à 30% dans le son de blé (Ebringerová 2005). Les AX sont constitués d'une chaîne principale d'unités D-xylopyranose (xylose) liées en  $\beta$ -1,4 (Figure 9). Les substituants arabinosyl sont en position  $\alpha$ -(O-2) ou  $\alpha$ -(O-3) des résidus xylose (mono-substitution). Les résidus xylose peuvent également être di-substitués par deux résidus arabinose en positions  $\alpha$ -(O-2) et  $\alpha$ -(O-3) (Bacic. A and BA 1981; Brillouet and Joseleau 1987). Au sein des AX des plantes monocotylédones, certaines substitutions arabinose peuvent être estérifiées par des acides hydroxyccinamiques sur la position

*O*-5 (acide férulique, acide *p*-coumarique). La quantité d'acide férulique peut varier entre 19,9 à 32,3 mg / g pour les AX de son de blé (Ebringerová 2005).



**Figure 9 :** La structure des arabinoxylanes (Ebringerová and Heinze 2000)

#### 1.3.4.2.2 Les glucuronoxylanes



**Figure 10 :** La structure des glucuronoxylanes (Ebringerová and Heinze 2000)

Les principales hémicelluloses présentes dans la paroi cellulaire secondaire des plantes dicotylédones sont les glucuronoxylanes (GX). Ces polymères sont formés d'une chaîne principale de résidus xylose liés en  $\beta$ -1,4 au niveau desquels sont présentes en position *O*-2 des substitutions d'acide glucuronique et/ou d'acide 4-*O*-méthyl-glucuronique (Figure 10). Les 4-*O*-méthyl-glucuronoxylanes représentent plus de 90% de la composante hémicellulosique des bois durs et des plantes herbacées de zone tempérée. Les rapports molaires acide 4-*O*-méthyl-glucuronique / xylose varient de 1/4 à 1/16 (Ebringerová and Heinze 2000).

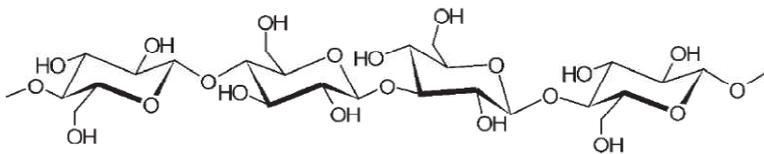
#### 1.3.4.2.3 Les arabino(glucurono)xylanes et les glucurono(arabino)xylanes

Les arabino(glucurono)xylanes (AGX) et les glucuronoarabinoxylanes (GAX) sont des hétéropolysaccharides possédant à la fois des substitutions arabinosyl et des substitutions (4-*O*-méthyl) acide glucuronique. Les AGX ont une structure similaire à celle des GX hormis la présence supplémentaire de substituants arabinosyl en position *O*-3 de certains résidus xylose.

Les AGX sont les composantes hémicellulosiques mineures (après les mannanes) des bois tendres (Ebringerová, Hromádková et al. 2005).

Les glucurono(arabino)xylanes sont les hémicelluloses dominantes dans les tissus lignifiés des graminées et des céréales (paille, tige...). Les GAX extraits à partir des différentes ressources végétales présentent des structures variées. Les rapports acide 4-*O*-méthylglucuronique : xylose : arabinose varient entre 3-9 : 10 : 1-10 (Ebringerová 2005). Les GAX peuvent être partiellement *O*-acétylés au niveau de groupements hydroxyle des carbones C-2 et C-3 des résidus xylose. Contrairement aux AGX, les GAX peuvent également contenir des résidus xylopyranose disubstitués par des groupements arabinosyl.

### 1.3.4.3 Les $\beta$ -glucanes



**Figure 11** : La structure des  $\beta$ -glucanes (Ebringerová and Heinze 2000)

Les  $\beta$ -glucanes sont des polysaccharides de D-glucose reliés par des liaisons  $\beta$ -1,3 et  $\beta$ -1,4 (Figure 11). Les  $\beta$ -glucanes sont présents chez les poales, groupe taxonomique qui inclue les céréales. Les  $\beta$ -glucanes sont situés dans les couches sub-aleuronique et endospermique des parois cellulaires (Ebringerová, Hromádková et al. 2005). Les  $\beta$ -glucanes peuvent s'associer avec des microfibrilles de cellulose au cours de la croissance des cellules. L'avoine et l'orge contiennent 3 à 12% de  $\beta$ -glucanes selon le cultivar (Ebringerová 2005).

## 2 Production et valorisation des xylanes

Parmi les familles d'hémicelluloses décrites ci-dessus, les xylanes isolés des plantes annuelles feront l'objet de la suite de cette présentation bibliographique en regard des travaux expérimentaux effectués.

### 2.1 Extraction et fractionnement des xylanes

#### 2.1.1 Méthodes d'extraction

Comparativement au bois, l'extractibilité des xylanes à partir des plantes annuelles est plus facile en raison des quantités mineures de lignine dans les parois cellulaires. Plusieurs techniques d'extraction, basées sur la dissolution des xylanes dans l'eau, l'alcool, les solvants organiques et les solutions alcalines, ont été développées par batch ou par extraction en

extrudeuse bi-vis (Zeitoun, Pontalier et al. 2010) parfois suivies d'étapes de purification. Le rendement d'extraction, la pureté, le degré de polymérisation et le type de substitution des xylandes isolés sont très variables en fonction des techniques mises en œuvre.

#### - **Extraction par l'eau**

Les AX hydro-solubles peuvent être extraits par l'eau à partir des parois cellulaires. Certaines études menées avec de la farine de blé et de riz ont conduit à l'isolement d'arabinoxylanes par de l'eau à température ambiante (Dervilly, Saulnier et al. 2000; Rao and Muralikrishna 2007). L'extraction à la vapeur est également décrite comme étant une technique intéressante (Montané, Farriol et al. 1998). En effet, les liaisons hydrogènes sont sensibles à la vapeur sous pression. De plus, au cours de l'extraction à la vapeur, les liaisons chimiques entre la lignine et les polysaccharides peuvent être rompues. Cette action conduit à une solubilisation des hémicelluloses. Un avantage important de l'extraction aqueuse est qu'elle permet de préserver les groupements acétyles et les liaisons esters liant les acides phénoliques sur les résidus xylosyl. Toutefois, il faut noter que l'extraction à l'eau ne permet pas d'obtenir des rendements d'extraction élevés des hémicelluloses. Par exemple, Izydorczyk et al. (Izydorczyk, Macri et al. 1998) ont obtenu un rendement d'extraction des arabinoxylanes d'orge de seulement 1,4% (p/p), et Tunc et al. (Tunc and van Heiningen 2008) environ 9% pour les xylandes de bois dur.

#### - **Extraction par un solvant organique**

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) ont été utilisés pour isoler les xylandes. L'extraction par le DMSO permet de conserver l'acétylation des xylandes. Sjöström et al. (Sjöström 1991) ont extrait l'holocellulose (soit l'ensemble des polysaccharides cellulose et hémicelluloses) à partir de bois avec peu de deacétylation. Le rendement d'extraction est d'environ 50% avec DMSO à partir de bois (Timell 1967). Cependant, l'utilisation du DMSO ne provoque pas de rupture des liaisons entre la lignine et les xylandes ce qui conduit à des rendements d'extraction relativement faibles (Wilkie 1979).

#### - **Extraction par une solution alcaline**

Les solutions alcalines, telles que l'hydroxyde de sodium (NaOH), l'hydroxyde de potassium (KOH), la chaux (Ca(OH)<sub>2</sub>) ou d'autres bases sont couramment utilisées pour l'extraction des xylandes. La solution à base de potasse est utilisée préférentiellement du fait de sa sélectivité plus importante (Timell 1967). En effet, pour l'extraction des xylandes à partir du bois, Timell et al. (Timell 1967) ont obtenu un rendement d'extraction élevé pour les xylandes extraits

au KOH avec une faible contamination par les glucomannanes. De plus, l'acétate de potassium formé au cours de la neutralisation avec l'acide acétique est plus soluble dans l'éthanol utilisé pour faire précipiter les hémicelluloses que l'acétate de sodium (Browning 1967; Sjöström 1991), donc plus facile à éliminer. L'utilisation de solutions alcalines possède toutefois des inconvénients. En effet une saponification peut se produire et entraîner des déestérifications générant une élimination des groupements acétyle, des acides phénoliques et des fonctions méthyl portées par les acides uroniques (Gabriellii, Gatenholm et al. 2000).

Au cours de l'extraction des xylandes, certains additifs tels que le borohydrure de sodium peuvent être utilisés pour limiter la dissolution des hexosanes et augmenter la pureté des xylandes (Höije, Gröndahl et al. 2005). Pour les tissus lignifiés tels que ceux de la paille et de coque de céréale, une étape de délignification en utilisant le chlorite peut se faire pour éliminer la lignine et ainsi faciliter l'extraction des hémicelluloses (Fang, Sun et al. 2000; Sun and Sun 2002). D'autre part, plusieurs traitements peuvent être effectués pour éliminer les protéines ou encore l'amidon. Ainsi, des enzymes telles que des protéases et des amylases peuvent être utilisées pour enlever les protéines et l'amidon présents après l'extraction des hémicelluloses. Les  $\beta$ -glucanes, co-solubilisés avec les xylandes (Izydorczyk and MacGregor 2000), peuvent être éliminés par l'action d'une glucanase telle que la lichenase (Hollmann and Lindhauer 2005) ou une étape de précipitation au sulfate d'ammonium (Izydorczyk, Macri et al. 1998).

Généralement, l'extraction alcaline est une méthode très utilisée pour isoler les hémicelluloses à partir des plantes céréalières. Dans ce cas, le rendement d'extraction est de l'ordre de 50% des hémicelluloses disponibles selon les études sur les fibres de maïs et paille de seigle (Doner and Hicks 1997 ; Fang, Sun et al. 2000).

Un procédé récemment décrit pour isoler les hémicelluloses est l'extrusion baxis (Zeitoun, Pontalier et al. 2010). Les auteurs ont comparé le rendement d'isolement des hémicelluloses de son de blé par une solution de soude avec deux techniques : extraction en batch et extrusion baxis. Le rendement d'extraction est plus faible (24%) dans le cas de l'extrusion, alors qu'il est plus élevé (59%) pour l'extraction en batch traditionnelle. Toutefois, l'avantage de l'extrusion baxis est une consommation moindre de produits chimiques et d'eau.

### **2.1.2 Méthodes de fractionnement**

Afin de fractionner les polysaccharides extraits en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, plusieurs méthodologies sont possibles, comme la précipitation, l'ultrafiltration, la chromatographie d'échange d'ions et la chromatographie d'exclusion stérique.

La chromatographie d'échange d'ions sur diéthylaminoéthyl (DEAE)-cellulose utilise un gradient de sel de sodium comme éluent. Les xylanes, ionisés en présence de la solution saline, peuvent être fractionnés en fonction de leurs degrés de substitution par chromatographie d'échange d'ions (Bengtsson and Åman 1990; Nilsson, Andersson et al. 2000). Par exemple, Ren et al. (Ren and Sun 2010) ont fractionné les arabinoxylanes de bagasse par un gradient de chlorure de sodium. Six sous-fractions ayant des rapports Ara/Xyl de 0,07 à 0,16 ont été obtenues en variant la concentration de chlorure de sodium de 0,1 à 0,3M.

La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer les xylanes en fonction de leur poids moléculaire. Dervilly et al. (Dervilly, Saulnier et al. 2000) ont ainsi obtenu 48 sous-fractions à partir de 5 fractions principales d'arabinoxylanes extraits à partir de farine de blé. Une limitation de cette technique est que les quantités au sein de chaque fraction sont faibles.

A ce jour, le fractionnement le plus fréquent est basé sur la variation de solubilité des xylanes. Un gradient d'éthanol peut être employé pour obtenir des fractions de xylanes présentant des propriétés de solubilisation similaire (Hollmann and Lindhauer 2005). Le degré de polymérisation des xylanes fractionnés dépend de la concentration en éthanol. (Schooneveld-Bergmans, Beldman et al. 1999). La précipitation au sulfate d'ammonium est également largement utilisée (Izydorczyk and Biliaderis 1992). Dans ce cas, les fractions de xylanes sont obtenues en contrôlant plusieurs facteurs tels que la concentration de solvant et la température (Coimbra, Waldron et al. 1995; Schooneveld-Bergmans, Beldman et al. 1999).

## **2.2 Propriétés physico-chimiques des xylanes**

### **2.2.1 Structure et conformation**

#### **- Structure**

La technique d'oxydation périodique permet d'analyser les structures des polysaccharides tels que les xylanes. Ces derniers sont traités par le périodate de sodium qui conduit l'oxydation des résidus L-arabinose et D-xylose qui ne portent pas de substituant. Les groupes hydroxyles

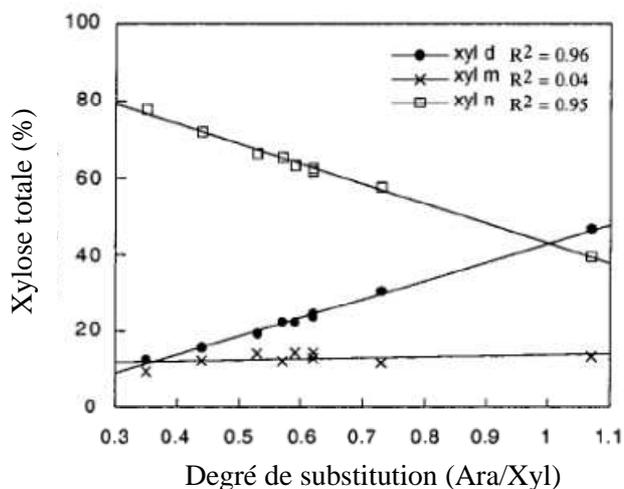
sont donc oxydés par l'ion périodate en dialdéhydes. Les xylanes oxydés sont ensuite réduits et soumis à une hydrolyse sélective des résidus oxydés (dégradation de Smith). Cette procédure permet de connaître le nombre de xylose substitués et les positions des substituants sur la chaîne principale. L'oxydation des arabinoxylanes peut être incomplète du fait de la possible formation d'hémiacétales entre un résidu déjà oxydé et un résidu non encore oxydé. Ce phénomène peut conduire à une surestimation de la quantité de résidus substitués (Åman and Bengtsson 1991).

La résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone et la technique de méthylation sont aussi souvent utilisées pour déterminer les structures des xylanes (Hoffmann, Kamerling et al. 1992; Höije, Sandström et al. 2006). Ces deux méthodes sont employées de façon complémentaire. Elles permettent une analyse quantitative des motifs structuraux (ex. monosubstitutions, disubstitutions) de l'échantillon (Hoffmann, Geijtenbeek et al. 1992; Hoffmann, Kamerling et al. 1992). La méthode de méthylation consiste à méthyler les groupes hydroxyle non substitués, puis à hydrolyser le polymère avant d'analyser les résidus par chromatographie en phase gazeuse. Cette technique peut entraîner une perte des dérivés méthyliques les plus volatiles, par exemple ceux obtenus à partir des résidus arabinose (Izydorczyk and Biliaderis 1994).

L'utilisation d'endo- $\beta$ -D-xylanases permet également d'élucider partiellement les structures des xylanes (Izydorczyk and Biliaderis 1994; Pastell, Virkki et al. 2009). Les xylanes sont dans ce cas hydrolysés par l'enzyme qui produit des oligosaccharides de composition et structure variées. Après séparation des oligosaccharides par chromatographie, les motifs structuraux peuvent être identifiés et quantifiés en utilisant des oligosaccharides standards purifiés. Cependant, l'inconvénient de cette méthodologie est lié à la spécificité des xylanases qui peuvent ne pas agir au niveau des régions fortement substituées des xylanes, conduisant à une sous estimation éventuelle des régions les plus substituées.

Le taux de substitution par l'arabinose ne révèle pas la nature des liaisons (mono ou disubstitution). Dervilly-Pinel et al. (Dervilly-Pinel, Tran et al. 2004) ont montré que le type de liaison par l'arabinose n'est pas aléatoire au sein des arabinoxylanes extraits de farine de blé. En effet, l'augmentation du taux de substitution conduit à un accroissement du nombre de résidus xylose disubstitués et une décroissance de la proportion de résidus xylose non substitués, toutefois la quantité des résidus xylosyl monosubstitués semble rester constante. La Figure 12

représente la corrélation entre le taux de substitution et la proportion des résidus xylose non substitués (xyl n) ; monosubstitués (xyl m) et disubstitués (xyl d).



**Figure 12 :** Corrélation entre le taux de substitution et la proportion des résidus xylose non substitués (xyl n) ; monosubstitués (xyl m) et disubstitués (xyl d) à partir des AX de farine de blé, résultats obtenues par le technique RMN. (Dervilly, Saulnier et al. 2000)

#### - Conformation :

L'analyse par diffraction des rayons X a montré que la chaîne principale des xylanes forme un ruban torsadé ayant trois résidus xylose par tour de spire (Nieduszynski and Marchessault 1972). Les paramètres tels que la longueur de persistance et la relation de Mark-Houwink permettent de mettre en évidence une structure en solution en pelote statistique (Dervilly-Pinel, Thibault et al. 2001). Mazeau et al. (Mazeau, Moine et al. 2005) ont prédit par modélisation une valeur de persistance de longueur théorique d'environ 35 Å signifiant que la chaîne de xylane possède une conformation semi-rigide d'extension modérée. Cette valeur théorique est plus faible que la valeur expérimentale de la longueur de persistance des xylanes ( $L_p$  : 66-92 Å) déterminée par Dervilly-Pinel et al (Dervilly-Pinel, Thibault et al. 2001). Le degré de substitution ne semble pas affecter la conformation des xylanes en solution (Dervilly-Pinel, Thibault et al. 2001).

#### 2.2.2 Solubilité

La solubilité d'un polysaccharide est affectée par les liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires. La solubilité des xylanes dépend de plusieurs facteurs tels que le degré de substitution, la masse moléculaire et le type de substitutions présentes sur leur chaîne principale. En général, la solubilité augmente quand le taux de substitution augmente. Les zones non substituées des xylanes génèrent de fortes interactions inter-chaînes ce qui défavorise la

solubilité alors que les groupements latéraux tels que l' $\alpha$ -arabinofuranose favorisent l'éloignement entre les chaînes principales et ainsi augmentent la solubilité des polymères. La masse moléculaire élevée peut conduire à la formation d'enchevêtrement des chaînes qui favorise une plus faible solubilité. En effet, des arabinoxylanes d'endosperme de blé sont d'autant plus solubles dans l'eau que leur masse moléculaire est faible (Mares and Stone 1973). Le type de substitution peut également affecter la solubilité. Par exemple, la présence d'acide férulique qui forme des 'ponts diféruliques' entre deux chaînes de xylanes peut diminuer la solubilité de ces derniers (Mares and Stone 1973). Les substituants chargés comme les acides uroniques favorisent la solubilité des xylanes car les groupements chargés augmentent l'hydrophilie du polymère et les répulsions électrostatiques intermoléculaires (Kacuráková, Wellner et al. 1999).

### 2.2.3 Masse moléculaire

Les valeurs des masses moléculaires des xylanes présentes dans la littérature sont très variables. Outre, l'espèce végétale étudiée, cette hétérogénéité dépend de la méthode d'analyse utilisée. Les méthodes les plus souvent utilisées sont la diffusion de la lumière, la chromatographie d'exclusion stérique, et l'ultracentrifugation. Une technique récente de fractionnement par couplage flux-force (FFF) donne également lieu à des résultats intéressants. Le Tableau 9 présente les masses molaires de xylanes extraits de différentes plantes céréalières et les méthodes de détermination mises en œuvre.

L'ultracentrifugation est peu utilisée en caractérisation des masses moléculaires de xylanes (Andrewartha, Phillips et al. 1979). Son principe est de soumettre une solution homogène de polymères à une force centrifuge intense. La vitesse de sédimentation dépend de la masse molaire. Cette technique est surtout utilisée pour les macromolécules très isomoléculaires comme les protéines. Pour les polymolécules, l'interprétation des résultats est compliquée car la zone de migration est très large.

La chromatographie d'exclusion stérique est la technique la plus fréquemment employée pour déterminer les masses molaires des xylanes (Mares and Stone 1973; Izydorczyk and Biliaderis 1992). La détermination des masses moléculaires est basée sur une calibration universelle en utilisant des étalons tels que les dextrans ou les pullulanes. La relation entre le temps de rétention de l'échantillon et le logarithme du produit de la viscosité intrinsèque par la

masse molaire permet de déterminer la masse molaire moyenne en fonction du volume hydrodynamique des macromolécules. Cette méthode limite la précision de l'estimation des masses molaires du fait de l'absence d'étalons spécifiques : les étalons utilisés couramment ne présentent pas la même conformation que les xylanes.

La chromatographie d'exclusion stérique couplée à une détection par diffusion de la lumière est couramment mise en œuvre (Schooneveld-Bergmans, Beldman et al. 1999; Rémond, Boukari et al. 2008; Pitkanen, Virkki et al. 2009). La masse moléculaire de l'échantillon peut être calculée directement à partir du signal de diffusion de la lumière sans que cela ne nécessite d'étalonnage préalable. Toutefois, cette méthode peut conduire à une surestimation des masses molaires enregistrées. L'association des chaînes de polymères ainsi que la présence d'agrégats semblent être responsables des surestimations dans la mesure des masses moléculaires (Pitkanen, Virkki et al. 2009).

Dans plusieurs études, les solutions aqueuses à base de NaOH et de NaNO<sub>3</sub> et les solvants organiques tels que DMF et DMSO sont utilisés comme éluents (Saake, Kruse et al. 2001; Pitkanen, Virkki et al. 2009). Etant donné que certains xylanes moins substitués présentent une faible solubilité dans l'eau, la composante insoluble est exclue de la colonne conduisant ainsi à l'analyse d'un échantillon non représentatif de la totalité de l'échantillon. Le DMSO semble être un solvant permettant d'améliorer la solubilité des xylanes et de limiter ainsi les phénomènes d'agrégation intervenant notamment lorsque les échantillons contiennent des impuretés telles que les protéines et les lignines.

Une technique très récente pour la détermination des masses molaires est la méthode de fractionnement par couplage flux-force (FFF). Le principe de cette technique est basé sur l'action simultanée de l'écoulement d'un liquide dans un canal de faible épaisseur et l'effet des champs de forces différents (centrifuge, gravité ou gradient de températures etc) appliqué perpendiculairement au canal. La séparation des macromolécules se fait en fonction des différents coefficients de diffusion liés à la masse molaire. Cette technique a été développée par Pitkänen et al. (Pitkänen, Tenkanen et al. 2011) pour déterminer la masse molaire d'arabinoxylanes dont les résultats sont comparés à ceux obtenus par chromatographie d'exclusion stérique. Les auteurs ont montré que la méthodologie FFF semble mieux adaptée pour isoler les agrégats qui peuvent contribuer à surestimer les masses molaires.

Le Tableau 9 présente les masses moléculaires de divers xylanes mesurées par différentes techniques.

| Source                                | Masse molaire moyenne ( $M_w$ ) (g/mol) | Méthode                                     | Concentration (g/L) | Eluent                    | Référence                             |
|---------------------------------------|---|---|---------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Son de blé (Ara/Xyl= 0,21)            | 306 000                                 | HPSEC<br>détection par diffusion de lumière | 3                   | DMSO/Eau : 90/10          | (Rémond, Boukari et al. 2008)         |
| Son de blé (A/X= 0,80)                | 110 000                                 | HPSEC<br>détection par diffusion de lumière | 1.8                 | 0.2 M nitrate de lithium  | (Hollmann and Lindhauer 2005)         |
| Paille de blé (Ara/Xyl= 0,07)         | 15 100                                  | HPSEC                                       | -                   | DMSO/Eau : 90/10          | (Saake, Kruse et al. 2001)            |
| Rafle de maïs (Ara/Xyl = 0,18)        | 34 000 - 71000                          | HPSEC                                       | -                   | -                         | (Ebringerová, Hromádková et al. 1997) |
| Enveloppe d'Orge (Ara/Xyl =0,28)      | 49300                                   | HPSEC<br>détection par diffusion de lumière | 4                   | DMSO contenant 0.01M LiBr | (Pitkanen, Tuomainen et al. 2008)     |
| Blé (AX commerciale) (Ara/Xyl = 0.56) | 235 000                                 | HPSEC<br>détection par diffusion de lumière | 2                   | 0.01M NaNO <sub>3</sub>   | (Pitkanen, Virkki et al. 2009)        |
| Blé (AX commerciale) (Ara/Xyl = 0.56) | 214 000                                 | HPSEC<br>détection par diffusion de lumière | 4                   | DMSO contenant 0.01M LiBr |                                       |
| Blé (AX commerciale) (Ara/Xyl = 0.56) | 213 000                                 | FFF   | 2                   | 0.01M NaNO <sub>3</sub>   | (Pitkänen, Tenkanen et al. 2011)      |

**Tableau 9 :** Masses molaires de xylanes de différentes espèces végétales mesurées par diverses méthodes

#### 2.2.4 Propriétés en solution des xylanes

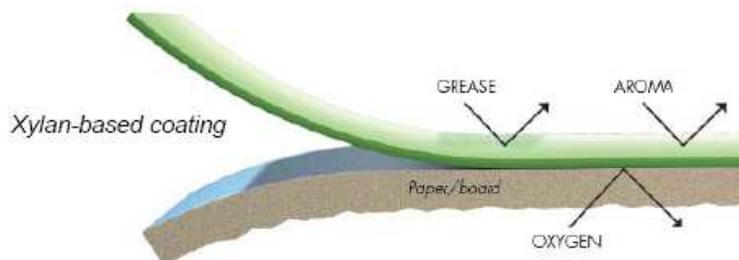
Les propriétés en solution des xylanes sont liées à leur concentration, à leur masse molaire et à leur degré de substitution. Une forte thixotropie a été trouvée pour les xylanes de son de seigle et rafle de maïs insolubles dans l'eau (Ebringerová and Hromádková 1992; Ebringerová, Hromádková et al. 1992). Les xylanes solubles dans l'eau présentent un comportement rhéofluidifiant sans thixotropie. Une solution de glucuronoxylanes de bois de hêtre présente un caractère de « weak-gel » à « gel-like » quand la concentration des xylanes

augmente (Michniewicz, Biliaderis et al. 1990). Les AX de farine de céréales et de son de maïs, contenant des acides phénoliques, sont capables de former des gels après une réaction d'oxydation (Izydorczyk and Biliaderis 1995). Cela a été expliqué par la formation de liaisons covalentes au niveau des unités d'acide férulique entre des chaînes de xylandes (Girhammar and Nair 1995).

## 2.3 Films à base de xylandes

### 2.3.1 Généralités

Les polymères biosourcés sont des candidats potentiels au remplacement des plastiques synthétiques. Ils peuvent être utilisés sous forme de films autosupportés ou appliqués en tant que revêtements sur un substrat sélectionné (polymère, papier, cartons etc). Par exemple, la société Xylophane AB ([www.xylophane.com](http://www.xylophane.com)) promeut depuis 2004 un revêtement à base de xylandes déposés sur papier (Figure 13) ou PET (polyéthylène téréphtalate). Ces matériaux concurrenceraient les films multicouches à base d'EVOH (copolymère de l'éthylène et de l'alcool vinylique) quant à leurs bonnes propriétés barrière à l'oxygène. Par exemple, Edlund et al. (Edlund, Ryberg et al. 2010) ont réalisé un film bicouche de PET revêtu par de l'extrait d'épicéa présentant d'intéressantes propriétés barrière à l'oxygène.



**Figure 13:** Papier revêtu par un revêtement à base de xylandes (Xylophane AB) ([www.xylophane.com](http://www.xylophane.com))

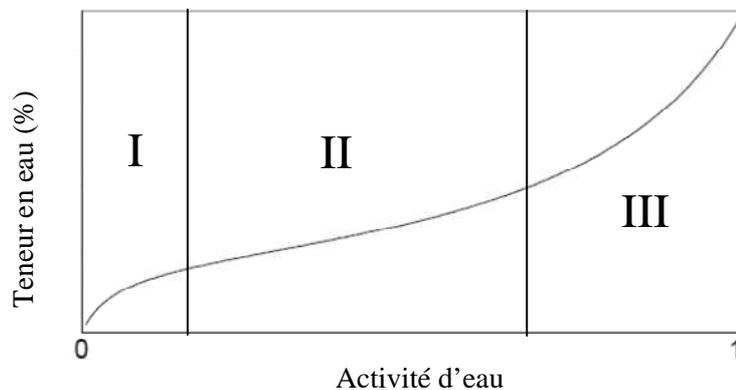
Afin de préserver la qualité des aliments, les films d'emballage alimentaire doivent satisfaire un cahier des charges exigeant principalement de bonnes propriétés mécaniques (film cohésif, machinabilité), une bonne stabilité thermique, et de bonnes propriétés barrière aux gaz et/ou à la vapeur d'eau. Dans les paragraphes suivants, les propriétés des films de xylandes seront discutées.

### 2.3.2 Propriétés hygroscopiques

Un matériau hygroscopique a toujours tendance à se mettre en équilibre d'humidité avec les conditions de l'ambiance dans lequel il baigne. Une pression partielle de vapeur d'eau instaurée à la surface d'un matériau provoque une absorption d'eau jusqu'à l'atteinte d'un état d'équilibre. Les relations entre teneur en eau et humidité relative sont quantifiées à l'aide de courbes caractéristiques appelées isothermes de sorption d'eau. L'humidité de l'atmosphère est

quantifiée par l'humidité relative ou l'activité de l'eau:  $a_w = \frac{P}{P_0}$ , où P est la pression partielle de

la vapeur d'eau exercée dans l'environnement du matériau, et  $P_0$  est la pression de vapeur saturante de l'eau à la température d'équilibre du système. La Figure 14 montre une courbe typique d'isotherme de sorption.



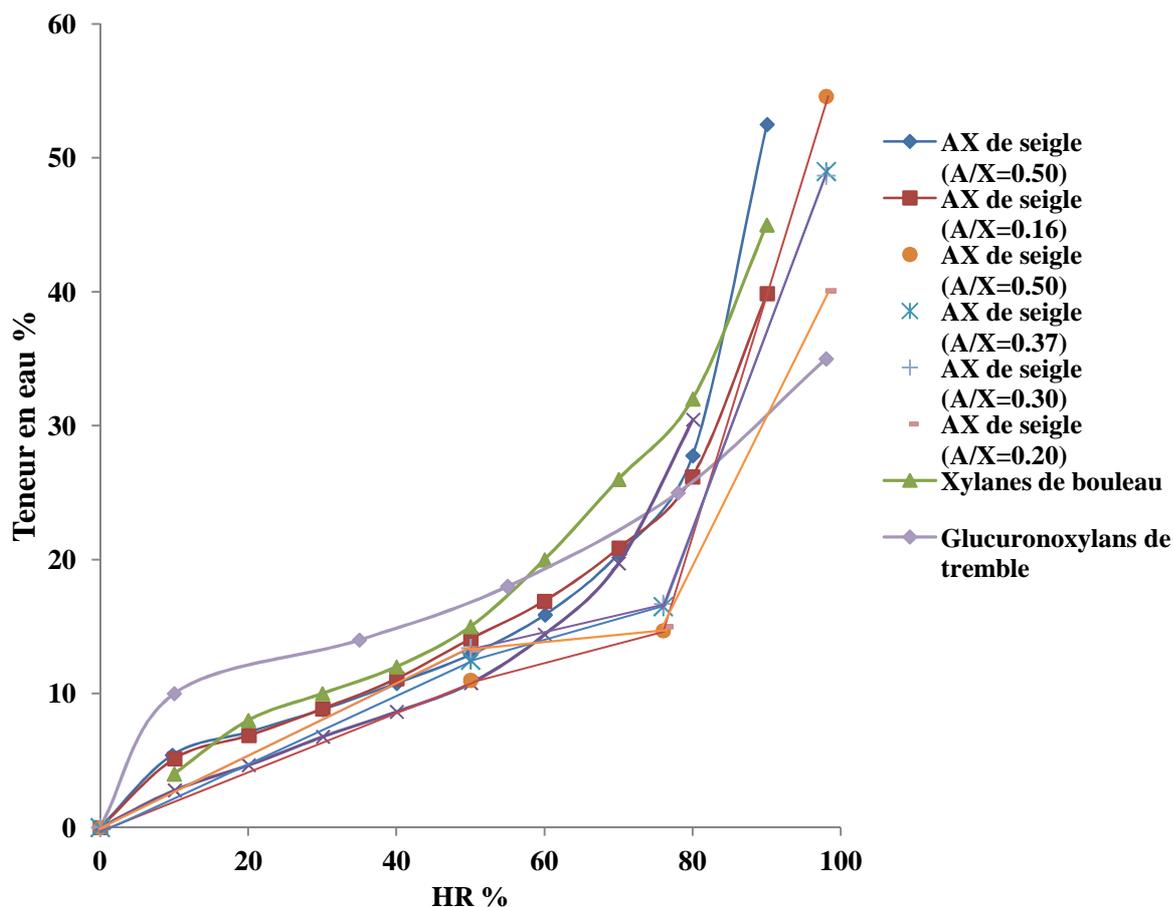
**Figure 14:** Courbe typique d'isotherme de sorption d'un matériau hydrophile.

L'isotherme de sorption montre que la quantité d'eau sorbée par un matériau hydrophile augmente quand l'humidité relative ou l'activité d'eau augmente. Trois zones de sorption d'eau sont habituellement distinguées (Jannot 2008). La première partie décrit l'adsorption de la monocouche d'eau à la surface d'un polymère pour des humidités relatives faibles. Dans cette zone, les molécules d'eau sont fortement liées aux groupements ou sites polaires du matériau pour partie en double pontage hydrogène (Fringant, Desbrières et al. 1996). La deuxième partie décrit l'absorption d'eau sur les sites de moindre énergie et la troisième s'explique par le dépôt de couches d'eau sur eau supplémentaires. Elle peut aussi concerner la condensation d'eau dans les pores du matériau, le cas échéant.

Durant ces dernières années, un important nombre de travaux a porté sur l'étude des propriétés de sorption d'eau de films hémicellulosiques (Grondahl, Eriksson et al. 2004; Höjje, Sternemalm et al. 2008; Sternemalm, Höjje et al. 2008; Mikkonen, Stevanic et al. 2011; Stevanic,

Joly et al. 2011). Les isothermes de sorption d'eau obtenues dans ces divers travaux sont réunies au niveau de la Figure 15 pour des xylanes de seigles, des glucuronoxylanes, et des galactoglucomannanes. On remarque des taux d'hydratation variables au sein de ces familles d'hémicelluloses qui atteignent près de 60% d'eau à 95%-98% d'humidité relative. Jusqu'à 50% - 55% d'humidité relative (HR), les isothermes de xylanes sont proches sauf dans le cas des glucuronoxylanes de tremble. Des différences de sorption d'eau plus importantes sont observées à partir 60% d'humidité relative. L'origine de ces variations n'est pas clairement identifiée et peut être due à la pureté ou à la structure des xylanes extraits ou plus simplement à la méthodologie retenue pour préparer les substrats ou les films, ainsi qu'aux techniques de mesure des taux d'hydratation. On peut remarquer que les quantités d'eau sorbée relevées dans la littérature sont parfois déterminées à des valeurs d'humidités relatives très élevées (95%, 98% ou plus). Ces conditions peuvent conduire à des résultats très aléatoires en absence d'une régulation très fine de la température.

Les AX de seigles représentés sur la Figure 15 ont été modifiés enzymatiquement à partir du même lot d'origine, caractérisé par un degré de substitution des xylanes (rapport Ara/Xyl) initial de 0,50. Cette modification a permis d'éliminer une partie des substituants arabinose. Les xylanes modifiés présentent alors des rapports Ara/Xyl de 0,16, 0,20, 0,30 et 0,37. (Höije, Sternemalm et al. 2008; Stevanic, Joly et al. 2011). Les auteurs ont observé une relation directe entre le taux de hydratation et le degré de substitution des xylanes. À faible humidité relative, les teneurs en eau des différents échantillons des xylanes sont très proches mais ont tendance à diminuer quand le degré de substitution des xylanes augmente. À haute humidité relative, la relation est plus aisée : la quantité d'eau sorbée augmente significativement quand le degré de substitution (le rapport Ara/ Xyl) augmente. Cette corrélation à haute HR a été également antérieurement observée par Sternemalm et al. (Sternemalm, Höije et al. 2008) pour des AX d'orge. Les auteurs expliquent cette différence par le changement de morphologie cristalline des AX modifiés. En effet, ces AX « linéarisés » sont partiellement organisés, ce qui limite l'accessibilité à l'eau du réseau semi-cristallin formé.



**Figure 15 :** Isothermes de sorption des films réalisés à base de diverses familles d'hémicelluloses : Glucuronoxylylans de tremble (Grondahl, Eriksson et al. 2004), galactoglucomannes d'épicea (Mikkonen, Stevanic et al. 2011) et arabinoxylylans de seigle et xylanes de bouleau (Olsson and Salmén 2003). Les films codés AX de seigle (Ara/Xyl = 0,50 signifient que l'isotherme est représentée pour un film de xylanes extraits du seigle présentant un rapport Arabinose/Xylose de 0,50. Les différents rapports Ara/Xyl ont été obtenus par modification enzymatique (Höije, Sternemalm et al. 2008; Stevanic, Joly et al. 2011) à 20 °C

### 2.3.3 Propriétés thermiques

L'analyse des propriétés thermiques des polymères est fondée sur l'étude de la variation d'une propriété physique en fonction de la température (analyse thermique différentielle à balayage, DSC, analyse thermomécanique, DMA, et analyse dynamique électrique DEA). Dans le cas spécifique des matériaux macromoléculaires, ou polymères, l'analyse de la réponse thermique permet de mettre en évidence et de donner une interprétation microscopique de phénomènes tels que la transition vitreuse, la fusion/cristallisation, le vieillissement... (Teyssède and Lacabanne 1997)

La stabilité thermique des hémicelluloses est étudiée dans le but de corrélérer le procédé de mise en œuvre (casting aqueux essentiellement) et la dégradation éventuelle des hémicelluloses.

### **-Transition vitreuse/relaxation $\alpha$**

La transition vitreuse est caractéristique de la phase amorphe des matériaux polymères et correspond au passage de l'état vitreux à l'état caoutchoutique. Sa température caractérise la mobilité intrinsèque des chaînes de polymère par mouvements coopératifs impliquant 20 à 60 mères. Cette transition est fonction de multiples paramètres d'intérêt (taux de plastifiant, taux et nature des ramifications, longueur de chaînes, taux de cristallinité, taux de réticulation, interactions pour les mélanges...).

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est souvent utilisée pour mesurer la température de transition vitreuse ( $T_g$ ). Les techniques spectroscopiques mécanique (DMTA) ou diélectrique (DEA) sont également utilisées car elles permettent d'observer, en plus de la relaxation principale  $T_\alpha$ , les relaxations secondaires de plus faibles amplitudes (relaxations  $\beta$  et  $\gamma$ ). De nombreux polymères présentent ces relaxations sous-vitreuses ( $T < T_g$ ) qui impliquent des mouvements de groupements latéraux ou de certains segments de chaînes (mouvements de manivelles). Ces mouvements locaux ne sont pas toujours bien identifiés dans le cas des macromolécules naturelles dont la structure est méconnue. Concernant la mobilité locale des xyloxyanes, Salmen et al. (Olsson and Salmén 2003) ont étudié la transition  $\beta$  de glucuronoxyloxyanes de bouleau avec la technique DMA. La relaxation sous-vitreuse observée est attribuée à la mobilité des groupements acides glucuroniques.

Pour les polymères biosourcés hydrophiles, tels que les hémicelluloses, la mesure de la température de transition vitreuse requiert la maîtrise des taux d'hydratation (DSC en capsules étanches, DMA en environnement contrôlé, DEA en système étanche). Il est important de rappeler que les taux de cristallinité des hémicelluloses sont faibles (ils varient en général de 0 à 25 % (Scheller and Ulvskov 2010), ce qui pourrait faciliter la détection de cette transition.

La Tableau 10 présente les températures de transition vitreuse de quelques films de polymères naturels (hémicelluloses, amidon et protéines). Les valeurs de température de transition vitreuse présentent une grande variation en fonction du type de matériaux (plastifié ou non), des conditions d'analyse (humidité relative ou teneur en eau) et de la technique utilisée. S'il est aisé d'identifier les transitions pour des hémicelluloses modifiées chimiquement (Jain, Sjöstedt et al. 2000), peu de travaux présentent les thermogrammes obtenus pour les polymères natifs. L'étude des températures de transition vitreuse relevées dans la littérature ou la

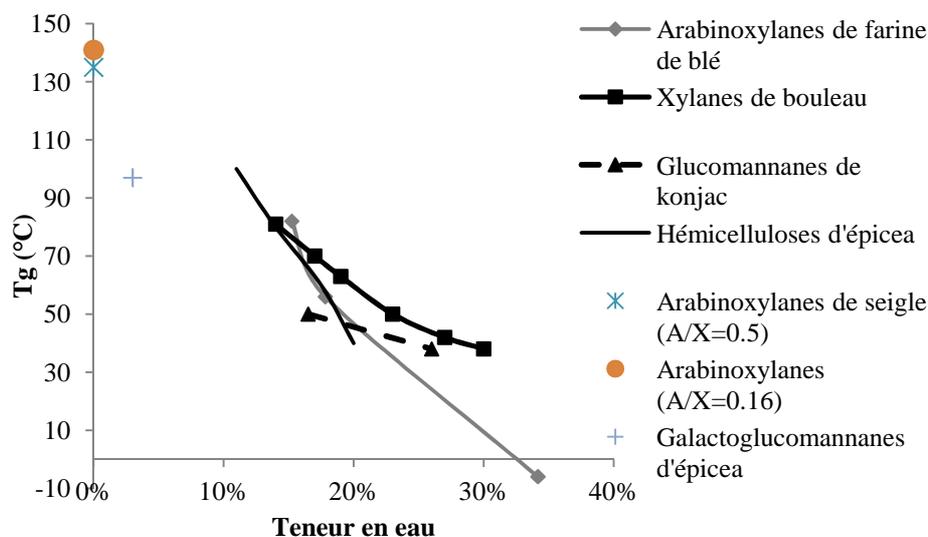
comparaison des valeurs de  $T_g$  est aussi rendue délicate par le choix des auteurs de présenter son évolution en fonction de l'humidité relative et plus rarement de la teneur en eau du polymère.

|  | $T_g / T_\alpha(^{\circ}\text{C})$ | Humidité relative (HR) ou <b>teneur massique en eau</b> | Méthode | Référence                            |
|--|------------------------------------|---|---------|--------------------------------------|
| Arabinoxylanes de seigle                   | 135                                | 0% HR   | DEA     | (Stevanic, Joly et al. 2011)         |
| Glucuronoxylanes du tremble + 35% Xylitol  | -35                                | 50% HR  | DSC     | (Grondahl, Eriksson et al. 2004)     |
| Glucuronoxylanes du tremble + 35% sorbitol | -26                                | 50% HR  | DSC     |                                      |
| Xylanes de bouleau                         | 80                                 | <b>15% teneur en eau</b>                                | DMA     | (Olsson and Salmén 2003)             |
| Arabinoxylanes de farine de blé            | 82                                 | 59% HR  | DSC     | (Ying, Saulnier et al. 2011)         |
| $\beta$ -glucane d'orge                    | 101                                | 59% HR  | DSC     |                                      |
| Glucomannanes de konjac                    | 100                                | <b>12% teneur en eau</b>                                | DMA     | (Irvine 1984)                        |
| Galactoglucomannanes d'épicéa              | 97                                 | 11,3% HR  | DEA     | (Mikkonen, Mathew et al. 2010)       |
| Glucomannanes + 40% Glycérol               | -62                                | 50% HR  | DMA     | (Mikkonen, Rita et al. 2007)         |
| Glucomannanes + 40% Sorbitol               | -13                                | 50% HR  | DMA     |                                      |
| Amidon de manioc + 33% Glycérol            | -62                                | <b>33% teneur en eau</b>                                | DMA     | (Famá, Goyanes et al. 2007)          |
| Amidon de maïs + 20% Glycérol              | 3                                  | <b>5% teneur en eau</b>                                 | DMA     | (Arvanitoyannis and Biliaderis 1999) |
| Gluten + 27% Glycérol                      | 18.7                               | <b>18,7% teneur en eau</b>                              | DMA     | (Cherian, Gennadios et al. 1995)     |

**Tableau 10 :** Températures de transition vitreuse de films d'hémicelluloses biosourcés.

Pour les hémicelluloses, il est cependant encore rare de trouver l'évolution de la température de transition vitreuse en fonction de l'état d'hydratation excepté pour les travaux de Salmen et al (Olsson and Salmén 2003). Les matériaux sont souvent plastifiés afin de permettre leur mise en forme et/ou leur caractérisation. En effet, les masses moléculaires étant faibles (Saake, Kruse et al. 2001), les matériaux sont souvent cassants en absence de plastifiant (Si, Massa et al. 2005). Comme pour les matériaux amylicés, les plastifiants les plus utilisés sont le glycérol, le xylitol et le sorbitol (Hartman 2006; Mikkonen, Rita et al. 2007). Par exemple, la température de transition vitreuse des xylanes du bois à l'état sec a été estimée comme variant de 150-220 °C (Olsson and Salmén 2003) avec cependant une valeur obtenue plus faible (135°C) identifiée par DEA comme étant la  $T_\alpha$  des arabinoxylanes de seigle à l'état sec (Stevanic, Joly et al. 2011).

Comme il est classiquement démontré, la température de transition vitreuse diminue en fonction du taux de plastifiant (polyols et eau). L'eau est le plastifiant naturel des polymères hygroscopiques. En effet, la  $T_g$  des films hémicellulosiques diminue quand l'humidité environnante augmente. Salmén et al. (Salmén 1982) et Irvine et al. (Irvine 1984) ont observé une forte diminution de la  $T_g$  des hémicelluloses avec le taux d'hydratation par DMA. Ying et al. (Ying, Saulnier et al. 2011) sont parvenus à mesurer la  $T_g$  des arabinoxylyanes de farine de blé par DSC (mode standard), les échantillons étant conditionnés préalablement à l'analyse dans différentes humidités relatives. Salmen et al. (Olsson and Salmén 2003) ont aussi étudié les températures de relaxation des AX de bouleau en fonction de leur teneur en eau. La Figure 16 présente des valeurs de  $T_g$  d'hémicelluloses en fonction de la teneur en eau tirées de la littérature. Elles varient de 82°C (59% RH – 15,24% de teneur en eau) à - 6°C (91% RH et 34,17% de teneur en eau) pour les AX de farine de blé, et de 80°C (50% RH – 15 % de teneur en eau) à 36°C (80% RH – 30% de teneur en eau) dans le cas des xylanes de bouleau. Les évolutions des  $T_g$  des glucomannanes de konjac et hémicelluloses d'épicea sont également présentées au niveau de la Figure 16 afin de comparer avec les valeurs des AX.



**Figure 16 :** Variation de  $T_g$  des hémicelluloses en fonction de leur teneur en eau : arabinoxylyanes de farine de blé (Ying, Saulnier et al. 2011), xylanes de bouleau et glucomannanes de konjac (Olsson and Salmén 2003), hémicelluloses d'épicea (Irvine 1984), arabinoxylyanes de seigle (Stevanic, Joly et al. 2011) et galactoglucomannanes d'épicea (Mikkonen, Stevanic et al. 2011).

### - Stabilité thermique

La stabilité thermique des hémicelluloses en solution aqueuse ou à l'état solide est un élément important dans le choix de la méthode de préparation des films (casting aqueux essentiellement) ou pour l'étude des propriétés thermiques (DEA, DMA etc..). La plupart des études publiées jusqu'à présent indiquent que les films à base des xylanes sont préparés selon

une méthode de casting aqueux. Dans les plupart des travaux concernant la fabrication de films hémicellulosiques, la solution d'hémicelluloses est chauffée (95°C maximum) sous agitation puis coulée après refroidissement (Grondahl, Eriksson et al. 2004; Hartman, Albertsson et al. 2006; Höije, Sternemalm et al. 2008). Les auteurs ne notent pas de dégradation des hémicelluloses dans ces conditions.

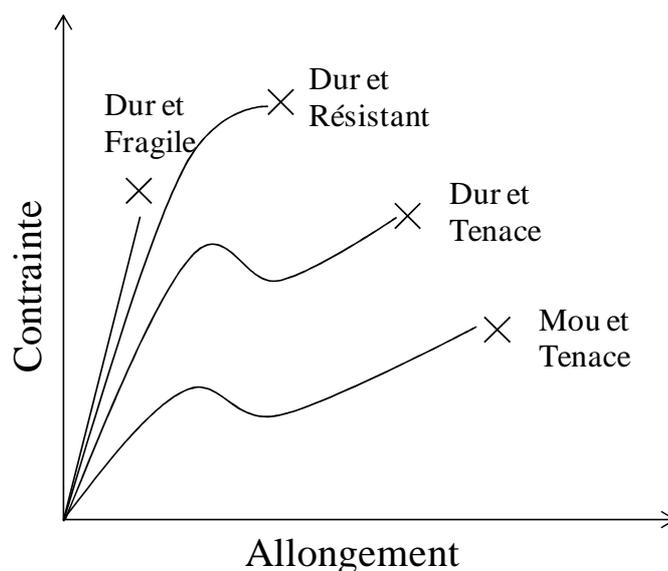
La température de décomposition à l'état solide est souvent caractérisée par la mesure de la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température mesurée par analyse thermogravimétrique (ATG). Les hémicelluloses sont relativement thermolabiles par rapport aux autres composantes macromoléculaires de la paroi cellulaire végétale telles que la lignine et la cellulose (Ramiah 1970). Les hémicelluloses sont dégradées à des températures variant de 200°C à environ 260°C. Le comportement thermique des glucuronoxylanes du bois de charme a été étudié. Leur décomposition thermique débute à partir de 200°C (Ebringerová and Heinze 2000). Les arabinoxylanes de paille de blé présentent une température de décomposition située à 220°C (Tableau 11). Le Tableau 11 résume les températures de dégradation de diverses familles d'hémicelluloses.

| Hémicelluloses       | Origine        | T °C de décomposition | Référence                     |
|----------------------|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| Glucuronoxylanes     | Bois de charme | 200                   | (Ebringerová and Heinze 2000) |
| Glucomannanes        | Konjac         | 250                   | (Mikkonen, Rita et al. 2007)  |
| Galactoglucomannanes | Epicéa         | 220                   | (Mikkonen, Rita et al. 2007)  |
| Arabinoxylanes       | Paille de blé  | 220                   | (Sun, Lawther et al. 1995)    |

**Tableau 11** : Températures de décomposition des hémicelluloses à l'état solide

#### 2.3.4 Propriétés mécaniques

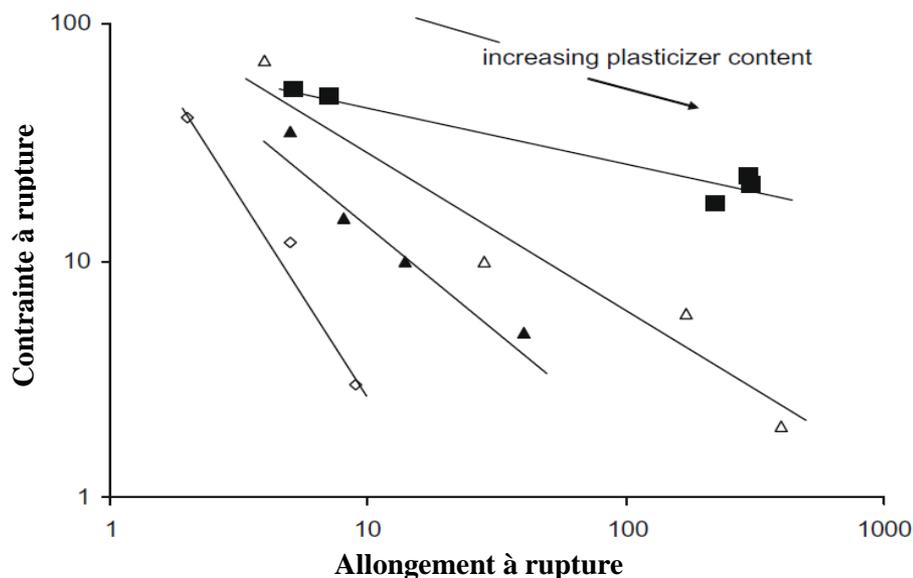
Le comportement mécanique des polymères est caractérisé par une très grande diversité apparente. En effet, pour les mêmes conditions d'utilisation, les polymères peuvent être définis comme rigides, fragiles, ductiles, ou tenaces. Les courbes typiques de contrainte-déformation sont présentées au niveau de la Figure 17.



**Figure 17 :** Courbes types contrainte-allongement des matériaux et leurs différentes caractéristiques

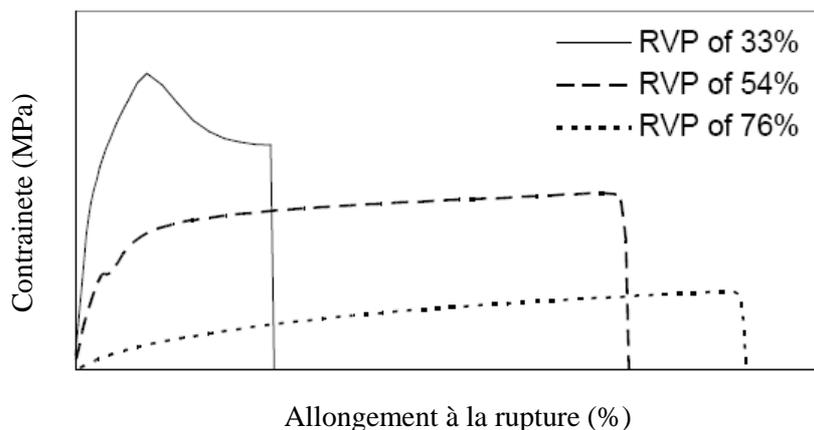
Pour les films de biopolymères, le comportement mécanique est le plus souvent déterminé par les propriétés mécaniques de traction dans la littérature. Le module de Young (E), la contrainte et l’allongement à la rupture sont le plus souvent discutés. Le comportement mécanique des polymères biosourcés dépend fortement de l’humidité relative, du taux et de la nature du plastifiant utilisé et de la température, par modulation des températures de transitions vitreuses notamment. La Figure 18 rassemble les propriétés mécaniques en traction de divers films de polymères biosourcés plastifiés (acide polylactique, gluten de blé, amidon de blé, hémicelluloses de tremble). Les hémicelluloses se remarquent car leurs propriétés mécaniques sont faibles devant celles des autres polymères biosourcés (et par extension très faibles devant celles des polymères de synthèse).

A l’instar de leurs « concurrents » amidons et protéines, les hémicelluloses sont généralement des macromolécules de faible masse (Jacobs and Dahlman 2001), ce qui limite les propriétés mécaniques des films en résultant. Les travaux de la littérature visent essentiellement à employer diverses stratégies dans le but i) de renforcer les propriétés mécaniques ii) de limiter l’impact de l’hydratation sur leurs propriétés mécaniques.



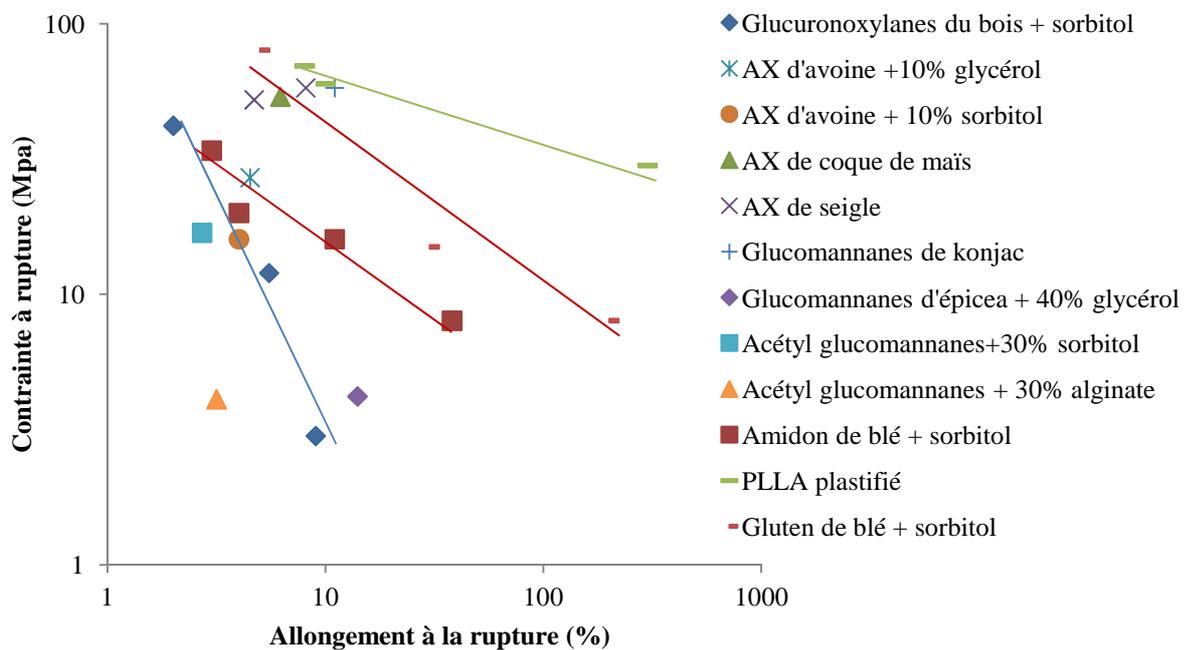
**Figure 18:** Résistance à la traction en fonction de l’allongement à rupture de matériaux biosourcés en fonction du taux de plastification. d’après (Monnet, Joly et al. 2010) ■ PLLA plastifié par acetyl tri-*n*-butyl citrate, (Baiardo, Frisoni et al. 2003), Δ Gluten de blé plastifié par le glycérol, (Imberty, Buléon et al. 1991), ▲ Amidon plastifié par le sorbitol, (Gaudin, Lourdin et al. 1999), ◇ Hémicellulose plastifié par le sorbitol (Grondahl, Eriksson et al. 2004).

Quand le taux de plastifiant (eau ou polyols) ou la température augmente, les polymères présentent une évolution classique des propriétés mécaniques de traction (augmentation de l’allongement, diminution de la contrainte et du module d’Young) (Singh, Singh et al. 2003). Parallèlement, la teneur en eau évolue également avec le taux de plastifiant (polyols) (Galietta, Di Gioia et al. 1998; Godbillot, Dole et al. 2006). Les auteurs s’emploient parfois à quantifier/comparer l’évolution de ces grandeurs en cartographiant ces propriétés (Figure 19) où toute évolution contrastée par rapport à la tendance classique peut être remarquée.



**Figure 19 :** Effet de la pression partielle de vapeur d’eau (RVP) sur les propriétés mécaniques (Talja 2007)

Le Figure 20 présente les propriétés mécaniques de traction de films hémicellulosiques (plastifiés ou non) de la littérature superposées aux valeurs de la figure précédente relatives aux autres matériaux biosourcés. Les modules d'Young des arabinoxylanes (sans plastifiant) ont pour maximum 1300 MPa à 2500 MPa environ en fonction de leur structure et leur origine botanique, les contraintes à rupture varient quant à elles de 16 à 60 MPa. La principale information relative à cette figure concerne les très faibles valeurs d'allongement à rupture enregistrées (malgré l'addition de plastifiant pour certaines formulations), ce qui traduit le faible niveau d'enchevêtrements des chaînes.



**Figure 20 :** Propriétés mécaniques de traction des films d'hémicelluloses à 50% RH en comparant avec les films biosourcés. (Imberty, Buléon et al. 1991; Gaudin, Lourdin et al. 1999; Baiardo, Frisoni et al. 2003; Grondahl, Eriksson et al. 2004; Hartman, Albertsson et al. 2006; Mikkonen, Stevanic et al. 2011)(Les valeurs sont prises à partir de Tableau 12)

| Film                                  | Résistance à rupture (MPa) | Elongation à rupture (%) | Module d'Young (MPa) | Référence                         |
|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| AX de coque de maïs                   | 53.8                       | 6.2                      | 1316                 | (Zhang and Whistler 2004)         |
| AX de seigle                          | 58                         | 8.1                      | 2500                 | (Stevanic, Joly et al. 2011)      |
| AX de seigle                          | 52.4                       | 4.7                      | 1750                 | (Höjje, Sternemalm et al. 2008)   |
| GX du bois + 20% xylitol              | 41                         | 2.0                      | -                    | (Grondahl, Eriksson et al. 2004)  |
| AX d'avoine épeautre + 10% glycérol   | 27                         | 4.5                      | 1100                 | (Mikkonen, Heikkinen et al. 2009) |
| AX d'avoine + 10% sorbitol            | 16                         | 4                        | 700                  | (Mikkonen, Heikkinen et al. 2009) |
| Glucomannanes de konjac               | 58                         | 11                       | 1800                 | (Mikkonen, Mathew et al. 2010)    |
| Glucomannanes d'épicea + 40% glycérol | 14                         | 4.2                      | 750                  | (Mikkonen, Stevanic et al. 2011)  |
| Acétyl glucomannanes + 30% glycérol   | 2.7                        | 16.9                     | -                    | (Hartman, Albertsson et al. 2006) |
| Acétyl glucomannanes + 30% alginate   | 3.2                        | 4.1                      | -                    |                                   |

**Tableau 12:** Propriétés mécaniques de traction des films d'hémicelluloses à 50 % RH

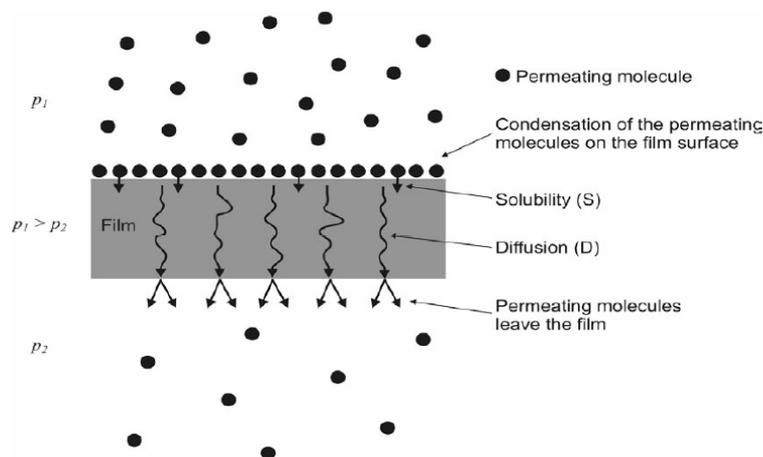
En conclusion, selon les données de la littérature, les propriétés mécaniques des films autosupportés à base d'hémicelluloses sont très faibles et très dépendantes de l'humidité relative ambiante. Ces performances sont très insatisfaisantes pour utiliser ces matériaux qui plus est dans le domaine des emballages alimentaires classiques qui doivent satisfaire des contraintes mécaniques élevées. L'une des stratégies de renforcement de ces matériaux développées par les auteurs pour pallier ces faiblesses intrinsèques sont présentées ci-après (films nanocomposites). Cependant, il est possible d'imaginer les hémicelluloses en qualité de revêtement supporté sur un substrat qui pourra être une alternative d'intérêt notamment en regard des propriétés barrières.

### 2.3.5 Propriétés barrières

De faibles valeurs de perméabilités (ou des valeurs stables et contrôlées) aux gaz (oxygène, azote et dioxyde de carbone) et à la vapeur d'eau sont souvent exigées pour des applications en emballage alimentaire afin de préserver le produit alimentaire.

Le coefficient de perméabilité ( $P$ ) dépend de la solubilité ( $S$ ) des molécules transportées qui pénètrent le film et de leur coefficient de diffusion ( $D$ ) à travers la membrane selon l'équation  $P = D \times S$ . Le flux d'espèces transportées a lieu de manière à équilibrer les concentrations des molécules transportées de chaque côté de la membrane. Le principe de perméation est présenté dans la Figure 21. Elle a lieu en 3 étapes. Tout à bord, les molécules pénétrantes s'adsorbent à la surface de film, puis se solubilisent dans la masse du film. L'étape suivante est la diffusion qui est cinétiquement limitante. Finalement, les molécules sont désorbées sur la face avale de la membrane.

Comme tous les polymères *polaires*, les hémicelluloses forment des réseaux macromoléculaires denses et peu mobiles par création de liaisons hydrogène, ce qui leur confère d'excellentes propriétés barrières aux molécules *apolaires* telles que l'oxygène. En effet, la faible solubilité à l'oxygène dans les matrices polaires et la faible diffusivité de ce gaz conduit à l'obtention d'un coefficient de perméabilité faible ( $P = D \times S$ ) (Arvanitoyannis, Kalichevsky et al. 1994). Le Tableau 13 compare les valeurs des coefficients de perméabilité à l'oxygène de films synthétiques et biosourcés.



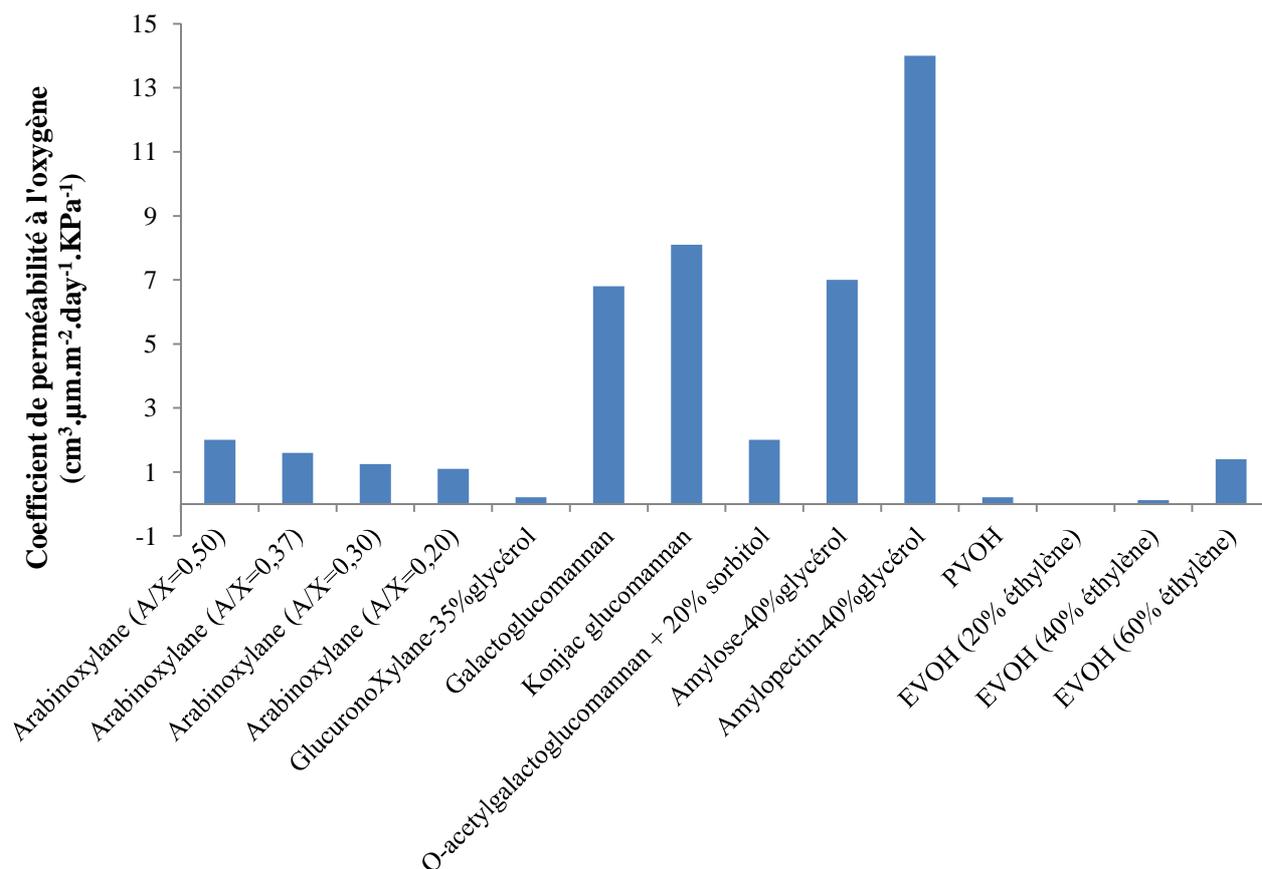
**Figure 21** : Le principe de la perméation gazeuse (Talja 2007)

| Film   | Plastifiant           | Perméabilité O <sub>2</sub><br>(cm <sup>3</sup> .µm.m <sup>-2</sup> .d <sup>-1</sup> .kPa <sup>-1</sup> ) | Référence                                |
|--|-----------------------|---|--|
| Xylane   | Sorbitol (35 wt.%)    | 0,21  | (Grondahl, Eriksson et al. 2004)         |
| PVA<br>Alcool polyvinylique  | -                     | 0,21  | (Van Tuil, Fowler et al. 2000)           |
| EVOH<br>copolymère de l'éthylène et de l'alcool vinylique (40% éthylène) | -                     | 0,12  | (www.soarnol.com/en g/s_data/index.html) |
| Chitosane  | Glycérol (25-50 wt.%) | 0,1-0,4   | (Butler, Vergano et al. 1996)            |
| Acétylgalactoglucomannanes   | Sorbitol (20 wt.%)    | 2,0   | (Hartman, Albertsson et al. 2006)        |
| Amylose  | Glycérol (40 wt.%)    | 7   | (Rindlav-Westling, Stading et al. 1998)  |
| Amylopectine   | Glycérol (40 wt.%)    | 14  |  |
| Polyacide lactique   | -                     | 160   | (Van Tuil, Fowler et al. 2000)           |
| PE<br>Polyéthylène (faible densité)                                      | -                     | 7900  |  |

**Tableau 13 :** Valeurs des coefficients de perméation à l'oxygène des films synthétiques et biosourcés à 23°C, 54%RH. L'unité retenue a été choisie comme étant représentative de la majorité des travaux publiés pour les hémicelluloses. Le lecteur trouvera un tableau de conversion en annexe 2. Pour convertir en unité du système international (mol.m/m<sup>2</sup>.s.Pa) il faut multiplier par 5.28\*10<sup>-19</sup>.

En revanche, les polymères barrière hydrophiles sont très sensibles à l'eau qui joue le rôle de plastifiant, et conduit à la perte des propriétés barrières (forte perméabilité) (Gaudin, Lourdin et al. 2000). Dans la Figure 22, les valeurs de perméabilité de différents polymères biosourcés sont présentées et comparées avec celles des polymères de synthèse réputés barrière dans le domaine de l'emballage tel que l'EVOH (copolymère de l'éthylène et de l'alcool vinylique) et plus rarement le PVA (alcool polyvinylique). Les valeurs de perméabilité des hémicelluloses sont situées entre 0,2 et 8 cm<sup>3</sup>.µm.m<sup>-2</sup>.j<sup>-1</sup>.kPa<sup>-1</sup> (Hansen and Plackett 2008) pour les films biodégradables tels que les films à base d'amidon (Rindlav-Westling, Stading et al. 1998), les films de mannanes (Hartman, Albertsson et al. 2006; Mikkonen, Heikkilä et al. 2010). Des valeurs de perméabilités remarquables ont été déterminées pour les arabinoxylanes (valeur inférieure à 2 cm<sup>3</sup> µm m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup>) soit 1,06.10<sup>-18</sup> mol.m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup> en unité du système international. Cependant, les films de glucuronoxylanes du bois dur plastifié avec 35% de glycérol enregistrent la plus faible valeur de perméabilité de 0,21 cm<sup>3</sup> µm m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup> soit 1,11.10<sup>-19</sup> mol m<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>.Pa<sup>-1</sup> (Grondahl, Eriksson et al. 2004) rencontrée à ce jour pour un polymère biosourcé à notre connaissance. Cette valeur est proche de celle des polymères de synthèse

barrière (Hansen and Plackett 2008). Il faut préciser que Höjje et al. (Höjje, Sternemalm et al. 2008) ont étudié la perméation de l'oxygène de films d'arabinoxylane (AX) de seigle préparés à partir d'AX natif (Ara/Xyl=0,50) modifié par voie enzymatique pour atteindre des rapports Ara/Xyl inférieurs (rapport arabinose/xylose) (Ara/Xyl= 0,37, 0,30 et 0,20). Les résultats ont révélé que la perméabilité à l'oxygène diminue systématiquement avec le taux de substitution des résidus xylose par les arabinosyls.



**Figure 22 :** Perméabilité à l'oxygène mesurée à 23°C et 50% HR d'après (Grondahl, Eriksson et al. 2004; Hansen and Plackett 2008; Höjje, Sternemalm et al. 2008; Mikkonen, Heikkilä et al. 2010)

#### - *Le coefficient de diffusion de l'oxygène*

Le coefficient de diffusion « décrit » la migration des molécules pénétrantes à travers la membrane et représente donc une propriété cinétique du système polymère/perméant. Il est intéressant de le déterminer afin de pouvoir estimer si une modification de perméabilité est gouvernée par ce paramètre *via* la relation  $P = D \cdot S$ . Pour les polymères, la méthode dite du time-lag ou du temps de demi-sorption ou de fin de sorption peut être utilisée. Dans la littérature, la méthode du time-lag semble être la plus utilisée pour estimer les coefficients de diffusion. La

deuxième loi de Fick à une dimension définit le coefficient de diffusion:  $\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$  [1] où

$C(x,t)$  est la concentration locale à la position  $x$  au temps  $t$ ,  $D$  est le coefficient de diffusion. Si le coefficient de diffusion est indépendant de la coordonnée  $x$  et la concentration  $C$ , le volume total de gaz  $Q_t$  qui a pénétré la membrane à partir du début de l'expérience, peut être calculé à partir

de cette équation :  $Q_t = A \int_0^t \left( -D \frac{\partial c}{\partial x} \Big|_{x=l} \right) dt$  [2]. Si l'espace en aval de la membrane est

infiniment grand, ou si le changement de pression en amont de la membrane est négligeable, la quantité totale de pénétrant  $Q_t$  ayant traversé la membrane au temps  $t$  est exprimé par l'équation 3 :

$$\frac{Q_t}{lc_i} = \frac{Dt}{l^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_1^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{l^2}\right) [3]$$

où  $C_i$  est la concentration du pénétrant à l'interface membrane compartiment aval,  $l$  est l'épaisseur de la membrane. Quand  $t$  tend vers l'infini, la somme du terme exponentiel va être infiniment proche de zéro et l'équation 3 va devenir linéaire en fonction du temps. Cette courbe

linéaire, avec l'extrapolation, croise l'axe du temps au temps  $t = \frac{l^2}{6D}$ . Le coefficient de

diffusion peut être calculé à partir de l'équation:  $D = \frac{l^2}{6\theta}$ . Le Tableau 14 présente les valeurs de coefficients de diffusion à l'oxygène obtenu pour diverses membranes. Peu de données sont disponibles dans la littérature pour les films biosourcés et aucune, à notre connaissance, pour les films à base d'hémicellulose.

| Film                               | Diffusion d'oxygène (cm <sup>2</sup> /s) | Référence                                 |
|------------------------------------|--|---|
| PET                                | $0,0407 \times 10^{-7}$                  | (Rharbi, Yekta et al. 1999)               |
| Polystyrène                        | $1,90 \times 10^{-7}$                    |   |
| Polyéthylène                       | $0,7 \times 10^{-7}$                     |   |
| Chitosan + Amidon                  | $2.42 \times 10^{-7}$                    | (Lide D.R. (Ed.) 2007-2008)               |
| Amidon de pomme de terre + 19% eau | $5 \times 10^{-7}$                       | (Arvanitoyannis, Kalichevsky et al. 1994) |
| Amidon de riz + 12% eau            | $0.2 \times 10^{-7}$                     |   |
| Cellulose microfibrillée           | $0.00003 \times 10^{-7}$                 | (Belbekhouche, Bras et al. 2011)          |

**Tableau 14 :** Valeurs de coefficient de diffusion de l'oxygène dans diverses membranes.

- *La solubilité de l'oxygène*

La solubilité ou concentration en gaz dans un film de polymère hydrophile peut être mesurée par sorption microgravimétrique (Dole, Joly et al. 2004) ou par sorption volumétrique (Koros and Paul 1976). Cependant, les solubilités des gaz sont souvent calculées à partir de l'équation  $P=D*S$ , P et D étant obtenus lors d'une expérience de perméation. Peu de valeurs de solubilité d'oxygène (déterminées expérimentalement) sont proposées dans la littérature. Des valeurs de solubilité d'oxygène de différents films tirées de la bibliographie sont proposées dans le Tableau 15. Les valeurs sont difficiles à obtenir expérimentalement car très faibles, parfois de l'ordre de grandeur de la précision des appareillages utilisés.

|  | Solubilité d'oxygène    |          |                              |
|--|-------------------------|----------|------------------------------|
|  | 0% HR                   | 50% HR   | Référence                    |
| Film à base d'amidon (pomme de terre)                    | 0,04 wt.%               | 5 wt.%   | (Dole, Joly et al. 2004)     |
| Film à base d'amidon (pomme de terre) + 12 wt.% glycérol | 0,03 wt.%               | 5,9 wt.% |                              |
| EVOH (50% éthylène)                                      | 0,012 wt.% <sup>a</sup> | -        | (Marais, Bureau et al. 2004) |
| PVC chlorure de polyvinyle                               | 0,007 wt.% <sup>a</sup> | -        |                              |

**Tableau 15** : la solubilité d'oxygène des films.

<sup>a</sup>: les valeurs sont calculées en teneur par rapport mass sèche ( La densité de film EVOH : 1,2 g/cm<sup>2</sup> d'après (Kothapalli and Sadler 2003) et la densité de film PVC :1,4 g/cm<sup>2</sup> d'après (<http://www.pvc.org/en/p/specific-gravity-density>))

De plus, si la mesure de solubilité de l'oxygène est toutefois réalisable à état sec (0% RH) par les deux méthodes, il est très délicat d'effectuer cette même mesure sans biais sur des matériaux hydratés qui reflètent plus exactement les conditions de contact alimentaire réelles. Ces mesures peuvent cependant être effectuées par gravimétrie. Les biais sont relatifs à la régulation de la température qui doit être très fine, à la poussée d'Archimède non parfaitement compensée par le calcul si la microbalance n'est pas symétrique, ou à la difficulté d'obtenir des mélanges oxygène hydraté homogènes en temps réel...). De plus, à l'état humide, la solubilité de l'oxygène dans le film est négligeable (<0,1%) devant la quantité d'eau sorbée (quelques pourcents à quelques dizaines de pourcents massiques selon les matériaux) (Pénicaud 2009).

Cependant, pour l'amidon des valeurs de solubilité ont été obtenues par méthode gravimétrique sur balance symétrique (Tableau 15). Elles reflètent une augmentation très importante de solubilité avec l'augmentation de l'humidité relative (0 à 50%). Les auteurs expliquent dans ce cas que l'augmentation concomitante de perméabilité est gouvernée par la

solubilité plutôt que par la diffusivité dans le cas de cette plastification à l'eau, les coefficients de diffusion ayant été déterminé parallèlement. Cependant, ces résultats (annoncés comme étant reproductibles) n'ont pas été retrouvés sur d'autres matrices polymères à notre connaissance.

- *La perméabilité de la vapeur d'eau*

La perméabilité à la vapeur d'eau est le plus souvent déterminée par mesure gravimétrique de l'eau ayant traversé un film placé dans une ambiance humide différentielle contrôlée. D'autres techniques reposent sur la détection infra rouge de l'eau transférée. Le taux de transmission de la vapeur d'eau (WVTR pour water vapor transmission rate) peut être déterminé par la formule suivante :  $WVTR = \frac{\Delta m}{\Delta t \times A}$ , [4]

où  $\Delta m$  est la prise de masse d'eau transférée,  $\Delta t$  est le temps de contact et A est la surface de film. La perméabilité à la vapeur d'eau peut être déterminée par la formule :  $WVP = \frac{WVTR \times L}{\Delta P}$ , [5]

où L est l'épaisseur du film et  $\Delta P$  est la différence de pression partielle de vapeur d'eau entre les compartiments amont et aval.

Le Tableau 16 présente les valeurs de perméabilité à la vapeur d'eau de différents films biosourcés. Les films hémicellulosiques tels que les xylanes d'avoine et les mannanes d'épicéa et de konjac montrent de plus faibles valeurs de perméabilité par rapport aux films d'amylose et d'amylopectine.

| Films                          | Perméabilité à la vapeur d'eau WVP (g mm m <sup>-2</sup> j <sup>-1</sup> kPa <sup>-1</sup> ) | Référence                      |
|--------------------------------|--|--------------------------------|
| Xylane d'avoine + 10% glycérol | 3,3  | Mikkonen et al. 2009           |
| Xylane d'avoine + 10% Sorbitol | 1,1  | Mikkonen et al. 2009           |
| Xylane d'avoine + 40% glycérol | 11   | Mikkonen et al. 2009           |
| Xylane d'avoine + 40% Sorbitol | 1,8  | Mikkonen et al. 2009           |
| Galactoglucomannanes           | 1,6  | Mikkonen et al. 2010           |
| Konjac glucomannanes           | 3,6  | Mikkonen et al. 2010           |
| Chitosane                      | 1,44   | Rhim et al. 2006               |
| Amylose + 40% glycérol         | 103  | Rindlav-Westling et al. (1998) |
| Amylopectine + 40% glycérol    | 124  | Rindlav-Westling et al. (1998) |

**Tableau 16 :** Perméabilité à la vapeur d'eau des films biosourcés à 23°C avec le gradient de RH de 0 à 54%.

### 3 Films nanocomposites

#### 3.1 Généralités

##### - Définition d'un nanocomposite

Un matériau nanocomposite est un matériau multiphasé solide dont l'une des phases possède des dimensions inférieures à 100 nanomètres. L'essor des nanocomposites s'explique par l'obtention de matériaux plus performants ou présentant de nouvelles propriétés d'usage (transparence, modulation des propriétés mécaniques, moindre hydrophilie...). L'utilisation de films à base de biopolymères est limitée en raison de problèmes liés à la performance tels que les propriétés mécaniques limitées, la sensibilité à l'eau (Vaidya and Bhattacharya 1994; Höije, Sternemalm et al. 2008). L'application des nanocomposites peut améliorer non seulement les propriétés des films biodégradables mais également le rapport coût-efficacité (Sorrentino, Gorrasi et al. 2007). Les types de renforcement peuvent être classés en deux parties : les nanocharges inorganiques (l'argile, le silicate...) et les nanocharges organiques (de type cellulose).

##### - Nanocharges inorganiques :

Les solides inorganiques stratifiés comme les argiles et les silicates ont été utilisés en raison de leur disponibilité, leur faible coût, et leur possibilité d'améliorations significatives de leur performance par des traitements simples. Les silicates stratifiés sont constitués de couches bidimensionnelles de dimensions caractéristiques variant du nanomètre de diamètre moyen à quelques micromètres de longueur. La présence des silicates stratifiés dans la formulation de polymère augmente la tortuosité du chemin de diffusion pour une molécule pénétrante ce qui conduit à de meilleures propriétés barrière par diminution significative du coefficient de diffusion apparent (Bharadwaj 2001; Cabedo, Giménez et al. 2004; Lu and Mai 2007). Cabedo et al. ont étudié les films nanocomposites à base d'EVOH. Le film pur EVOH possède un coefficient de perméabilité très faible de  $3.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \cdot \text{m} / \text{m}^2 \cdot \text{jour} \cdot \text{atm}$  (soit  $1,9 \times 10^{-23} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$ ) et de plus faibles valeurs ont été trouvées pour les films renforcés par la kaolinite (moins de  $10^{-5} (\text{cm}^3 \cdot \text{m}) / (\text{m}^2 \cdot \text{jour} \cdot \text{atm})$ ).

##### - Nanocharges organiques :

Les nanofibres de cellulose sont des matériaux largement disponibles de faible coût (Azeredo 2009). Ces nanocelluloses possèdent les propriétés de la cellulose telles que l'hydrophilie, des possibilités de modifications chimiques et une morphologie semi-cristalline. Il existe essentiellement trois types de nano-renforts qui peuvent être obtenus à partir de cellulose –

les microfibrilles de cellulose, les nanocristaux de cellulose (ou whiskers) et les celluloses bactériennes (Azizi Samir, Alloin et al. 2005). La Tableau 17 présente les trois types de nanocellulose et leurs sources habituellement rencontrés dans la littérature.

| Type de nanocharges de cellulose        | Sources                           | Dimension caractéristiques  |
|---|-----------------------------------|---|
| Microfibrilles                          | Bois, chanvre, betterave à sucre. | Diamètre : 5-60 nm<br>Longueur : quelques micromètres               |
| Nanocristaux de cellulose (ou whiskers) | Coton, bois, paille de blé, algue | Diamètre : 5-70 nm<br>Longueur : 100-250 nm                         |
| Cellulose batérienne                    | Sucre de faible masse, alcools.   | Diamètre : 20-100 nm<br>Longueur : de 100 nm à quelques micromètres |

**Tableau 17** : les trois types des nanocharges de cellulose et leurs origines botaniques d'après (Klemm, Kramer et al. 2011).

## 3.2 Nanocristaux de cellulose

### 3.2.1 Production

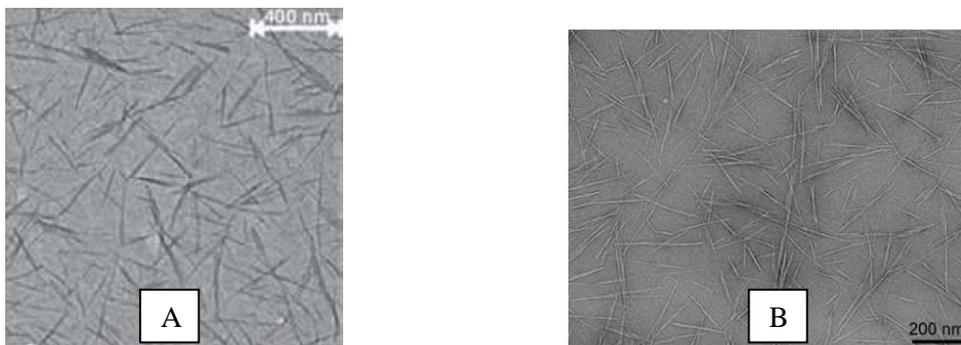
Des nanocristaux de cellulose ont été isolés à partir des diverses sources cellulosiques, telles que les plantes (Araki, Wada et al. 1998), les animaux (Terech, Chazeau et al. 1999), les bactéries et les algues, etc... (Revol 1982; Tokoh, Takabe et al. 1998). Les nanocristaux de cellulose sont produits par actions des acides minéraux. La biomasse est tout d'abord généralement prétraitée par NaOH pour purifier la cellulose par élimination des autres constituants (hémicellulose et lignine). Ensuite, le processus de préparation a pour objectif le clivage et la destruction des régions amorphes qui sont les plus facilement accessibles et cela conduit à libérer des nanocristaux de cellulose de forme bâtonnets. La suspension résultante est ensuite diluée, les acides résiduels et les impuretés sont éliminés par centrifugation et dialyse contre l'eau distillée. L'hydrolysate est ensuite traité mécaniquement aux ultrasons afin d'obtenir une suspension homogène stable. La structure, les propriétés et le comportement des suspensions des nanocristaux sont influencés par la nature du substrat de base, le type d'acide minéral utilisé et sa concentration, la température et la durée de l'hydrolyse. (Beck-Candanedo, Roman et al. 2005; Bondeson, Mathew et al. 2006; Dufresne 2010).

La concentration de l'acide affecte également la morphologie des nanocristaux (Revol, Bradford et al. 1992). Une diminution de la longueur des nanocristaux et une augmentation de charge surfacique ont été observées pour une durée d'hydrolyse prolongée. L'utilisation de l'acide sulfurique conduit à une surface chargée négativement et dans ce cas la suspension des nanocristaux est plus stable sur un plus large éventail de valeurs de pH. Les nanocristaux

préparés par l'acide chlorhydrique ne sont pas chargés à la surface et ils présentent une mauvaise stabilité colloïdale (Sugiyama, Chanzy et al. 1992; Araki, Wada et al. 1998). Au cours de l'hydrolyse par l'acide sulfurique, les groupements acides esters de sulfate se forment à la surface des nanocristaux. La suspension de nanocristaux est stabilisée par la forte répulsion électrostatique entre les sulfates d'ester (Sugiyama, Chanzy et al. 1992).

### 3.2.2 Morphologie

Les nanocristaux de cellulose se présentent sous forme de bâtonnets allongés. Généralement la longueur mesure quelques centaines de nanomètres et le diamètre est de l'ordre de quelques nanomètres. La géométrie des nanocristaux dépend de plusieurs facteurs tels que le type de source, les conditions d'hydrolyse et la force ionique. Le diamètre est d'environ 3 nm pour la cellulose du bois, 5 nm pour le coton (Fengel and Wegener 1984) et 10-20 nm pour la tunicine et l'algue (Figure 23). La longueur varie de 100 à 300 nm pour les nanocristaux obtenus à partir des celluloses du bois; de 200 nm à 350 nm pour la cellulose du coton et de 100 nm à quelques micromètres pour les nanocristaux obtenus à partir de tunicine et d'algue (Terech, Chazeau et al. 1999). Le facteur de forme ( $l/d$ ) des whiskers est le rapport de la longueur sur le diamètre. Ce facteur de forme varie entre 10 pour la cellulose extraite du coton et 67 pour la tunicine respectivement (Dufresne 2010).



**Figure 23** : Observation des suspensions des nanocristaux par MET. A : nanocristaux de coton (Grunert and Winter 2002) B : nanocristaux de tunicine (Garcia de Rodriguez, Thielemans et al. 2006).

### 3.2.3 Applications

Les nanocristaux de cellulose sont souvent utilisés pour le renforcement des polymères. La première étude française a été réalisée par Favier et al. en 1995 (Favier, Chanzy et al. 1995) donnant lieu à une amélioration des propriétés thermiques et mécaniques des nanocomposites. D'autres applications ont été envisagées exploitant les propriétés optiques des phases nématiques

chirales des nanocristaux de cellulose (Zhang, Winter et al. 2005) ou visant des applications dans le domaine médical. (Dong and Roman 2007).

### **3.3 Cellulose bactérienne**

La cellulose bactérienne est générée par les bactéries aérobies, comme les bactéries d'acide acétique du genre *Gluconacetobacter*. La cellulose bactérienne est formée par procédé biotechnologique à partir de sources de carbone de faible poids moléculaire, tels que la D-glucose. Les bactéries sont cultivées dans un milieu aqueux contenant des nutriments, et la cellulose est excrétée sous forme d'exopolysaccharides. L'hydrogel de cellulose bactérienne résultant est composé d'un réseau de nanofibres. Leur diamètre varie de 20 nm à 100 nm (Klemm, Kramer et al. 2011) . La cellulose bactérienne présente une cristallinité élevée (80–90 %) et une bonne stabilité mécanique.

### **3.4 Cellulose microfibrillée**

La cellulose microfibrillée est généralement fabriquée à partir du bois par homogénéisation de pulpe pré-traitée à haute pression. Elle est composée de microfibrilles semi-cristallines libérées (Mikkonen, Stevanic et al. 2011). Le processus de délamination peut être assisté par ajout de polymères hydrophiles (carboxyméthyl cellulose, méthyl cellulose, hydroxypropyl cellulose ou acide polyacrylique...). Ces polymères peuvent diminuer la tendance au colmatage et améliorer la consistance de la pulpe (Klemm, Kramer et al. 2011). La cellulose microfibrillée présente un diamètre de 5 à 60 nm et une longueur de quelques micromètres (Wagberg, Decher et al. 2008).

### **3.5 Renforcement des films par les nanocristaux de cellulose**

#### **3.5.1 Mise en œuvre**

Une bonne dispersion de nanocristaux dans la matrice polymère est une condition préalable pour fabriquer des nanocomposites. En raison du caractère hydrophile des nanocristaux de cellulose, l'eau est le milieu privilégié pour leur mise en œuvre. Ce système a été utilisé pour préparer des matériaux nanocomposites à base d'amidon (Anglès and Dufresne 2000; Mathew and Dufresne 2002), de polyoxyéthylène (POE) (Azizi Samir, Alloin et al. 2004), d'alcool polyvinylique (PVA) (Roohani, Habibi et al. 2008) etc. Les polymères sont généralement mélangés avec les nanocristaux en milieux aqueux sous simple agitation à température ambiante, et parfois sous vide pour éviter la présence de bulles d'air dans le film final (Ljungberg, Cavallé

et al. 2006). Les films peuvent être formés à partir de ces mélanges par coulée du film (casting) où le solvant est évaporé à une température modérée, ou par des procédés classiques tels que le pressage à chaud ou l'extrusion.

L'utilisation de solvants organiques est également discutée. La suspension de nanocristaux est alors préparée dans un solvant organique polaire N, N-diméthylformamide (DMF) (Azizi Samir, Alloin et al. 2004). Les solvants non miscibles à l'eau et de faible polarité, comme le toluène, ont aussi été largement utilisés. Cependant, la mise en œuvre nécessite une étape d'échange de solvants par l'acétone par exemple (Habibi, Lucia et al. 2010).

Une autre technique de mise en œuvre consiste en la modification de surface telle que l'estérification et la silylation en utilisant des agents de greffage. (Goussé, Chanzy et al. 2002; Angellier, Molina-Boisseau et al. 2005; Yuan, Nishiyama et al. 2006). Cette modification de surface peut améliorer la dispersion des nanocristaux dans les solvants organiques de polarité moyenne ou faible et la compatibilité avec la matrice non polaire. Cependant la modification chimique peut entraîner la perte de propriétés mécaniques (Klemm, Kramer et al. 2011).

### **3.5.2 Microstructure**

La microscopie électronique à balayage (MEB) est utilisée pour étudier la structure des nanocomposites (Azizi Samir, Alloin et al. 2005; Roohani, Habibi et al. 2008) en observant qualitativement la dispersion et l'orientation des nanocristaux dans la matrice, la présence d'agrégat ou de vides et la sédimentation. Du fait de leur taille inférieure à la résolution du MEB, les nanocristaux apparaissent seulement sous forme de points blancs, identifiés par comparaison des faciès de rupture de la matrice et des composites. Helbert et al. (Helbert, Cavallé et al. 1996) ont remarqué que la dispersion des nanocristaux dans la matrice dépend de la technique de mise en œuvre. Par rapport à la lyophilisation-pressage à chaud, le film obtenu par coulée évaporation (film casting) est moins homogène et présente un gradient de concentration de nanocristaux entre les faces supérieure et inférieure du film nanocomposite.

La microscopie électronique en transmission (MET), la diffusion des rayons X (SAXS) et des neutrons aux petits angles (SANS) ont été aussi utilisées pour examiner la microstructure et la dispersion des nanocristaux dans la matrice. La technique MET exige que les échantillons présentent une épaisseur d'environ 50 nm (ultramicrotomie). Chazeau et al. (Chazeau, Cavallé et al. 1999) ont utilisé la MET et la SAXS pour observer des films de PVC renforcé par les

nanocristaux de tunicine. La MET permet de confirmer que la longueur des nanocristaux n'a pas été modifiée lors de la préparation des composites. La SAXS permet d'observer quant à elle la dispersion isotropique des nanocristaux (sans agrégats).

L'imagerie par microscopie à force atomique (AFM) est une bonne alternative technique (Kvien, Tanem et al. 2005) utilisée pour analyser la microstructure des nanocomposites avec une haute résolution.

### **3.5.3 Propriétés des nanocomposites**

L'utilisation de biopolymères est parfois limitée en raison de problèmes liés à leur performance comme la fragilité, la sensibilité à l'eau et les faibles propriétés mécaniques. Depuis les travaux de Favier (Favier, Chanzy et al. 1995), les matériaux nanocomposites par incorporation des nanocristaux de cellulose se sont développés dans des matrices polymères de diverses natures. La modification attendue des propriétés par addition de ces renforts dépend des aspects morphologiques et des interactions interfaciales entre les nanocristaux et la matrice polymère (Azizi Samir, Alloin et al. 2005).

#### **- Renforcement et propriétés thermiques des polymères**

Les études basées sur le renforcement et les propriétés thermiques des polymères par des nanocharges aboutissent à des résultats controversés. Dans de nombreuses études portant sur les nanocomposites, les auteurs ont montré que la température de transition vitreuse ( $T_g$ ) ne semble pas affectée par l'ajout de nanocharges (Chazeau, Cavailé et al. 1999; Chazeau, Cavailé et al. 1999; Dufresne, Kellerhals et al. 1999). Cependant, d'autres auteurs ont montré que l'ajout de nanocharges affecte la  $T_g$ . Par exemple, pour l'amidon plastifié avec du glycérol et renforcé par des nanocristaux de linters de coton, une augmentation de  $T_g$  avec le taux de charges a été observée et attribuée aux interactions cellulose/amidon. Des nanocomposites à base de PVA renforcé par des nanocristaux de linters de coton présentent une augmentation de  $T_g$  uniquement à haute humidité relative (Roohani, Habibi et al. 2008) que les auteurs attribuent à une relocalisation de l'eau. Des films à base de glucomannanes plastifiés avec 40% glycérol montrent également une augmentation de  $T_g$  (Mikkonen, Stevanic et al. 2011). Ces augmentations de  $T_g$  sont toujours expliquées par le développement d'interactions fibres/matrice parfois compliquées du fait de la présence de plastifiant : une diminution de l'effet plastifiant

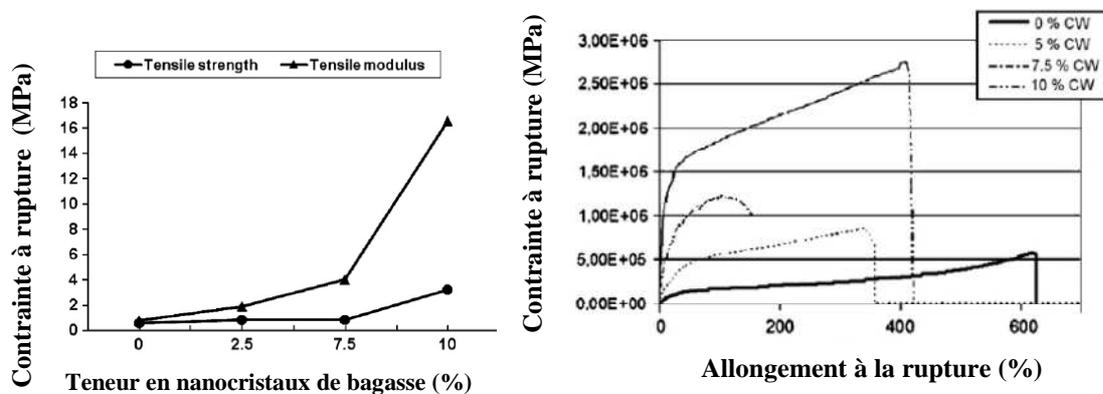
peut également être responsable de cette augmentation de  $T_g$  par suite d'interactions plastifiants/nanocharges.

#### - **Renforcement et propriétés mécaniques**

Les nanocristaux de cellulose présentant des dimensions nanométriques et des propriétés mécaniques intrinsèquement élevées sont considérés comme des candidats idéaux pour améliorer les propriétés mécaniques d'un matériau polymère. La valeur théorique du module de Young des nanocristaux de cellulose a été estimée par plusieurs auteurs : par exemple 167,5 GPa (Tashiro and Kobayashi 1991), ou 143 GPa (Šturcová, Davies et al. 2005) pour les nanocristaux de tunicine ou 105 GPa (Rusli and Eichhorn 2008) pour le coton. Plusieurs études ont été réalisées sur l'utilisation de nanocharges de cellulose comme renfort mécanique dans une matrice polymère. Par exemple, l'incorporation de nanocristaux de tunicine dans l'amidon a montré un effet positif à la fois sur le module d'élasticité et la résistance à la traction des composites. Cependant, l'ajout de nanocristaux de cellulose pourrait avoir tendance à diminuer l'allongement à la rupture (Hajji, Cavaillé et al. 1996; Chazeau, Cavaillé et al. 1999; Anglès and Dufresne 2001). Les trois paramètres principaux qui peuvent affecter les propriétés mécaniques des nanocomposites sont le facteur de forme ( $l/d$ ) ; la méthode de mise en œuvre de nanocomposites et les interactions compétitives entre matrice/nanocharges et nanocharges/nanocharges.

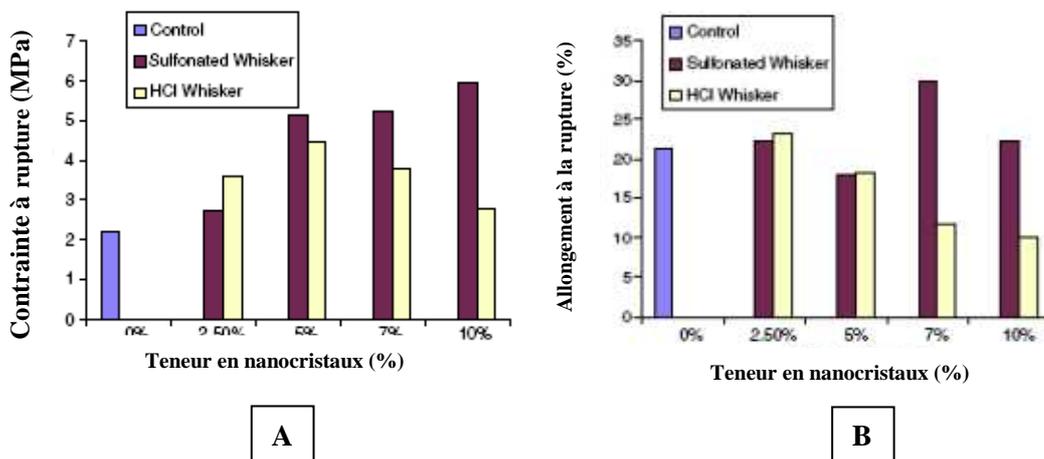
Bras et al. (Bras, Hassan et al. 2010) ont étudié le renforcement du caoutchouc naturel par des nanocristaux de bagasse. La Figure 24A montre que le module de Young et la résistance à la traction augmentent en fonction du taux de charge de nanocristaux. La Figure 24B montre que la résistance à la traction augmente significativement lors de l'ajout des nanocristaux dans la matrice tandis que l'allongement à la rupture diminue. Des résultats similaires ont été obtenus par Roohani et al. (Roohani, Habibi et al. 2008) pour des nanocomposites (renforcé par nanocristaux de coton): l'allongement à la rupture a diminué d'un facteur 3 (de 30% à 10%) en présence de 12% (massique) de renforts. Mikkonen et al. (Mikkonen, Mathew et al. 2010) ont renforcé des glucomannanes avec des nanocharges de cellulose. L'ajout de nanocharges n'a pas affecté significativement le module de Young et la contrainte a augmenté avec le taux de charge de nanocristaux. Stevanic et al. (Stevanic, Joly et al. 2011) ont préparé des films nanocomposites à base d'arabinoxylanes (AX) de seigle renforcés par des fibres de cellulose bactérienne. Les AX de faible degré de substitution par l'arabinose ( $Ara/Xyl=0,16$ ) présentent une augmentation de contrainte et de l'allongement à la rupture par les nanocharges. Pour les AX de haut degré de substitution ( $Ara/Xyl = 0,50$ ), la résistance à la traction n'a augmenté qu'en

présence de 5% de taux de charges. Une diminution significative de l'allongement à rupture a été obtenue pour les AX mélangés avec 15% de cellulose bactérienne. La Figure 25 montre des xylanes d'avoine renforcés par les nanocristaux de bois préparés par traitements à l'acide sulfurique ou chlorhydrique (Saxena, Elder et al. 2009). La résistance à la traction augmente systématiquement en fonction du taux de charges de cellulose sulfonée. L'ajout de 7% de cellulose sulfonée permet l'augmentation de la contrainte à rupture de 141%. La même amélioration a été observée avec des xylanes renforcés avec 5% nanocristaux préparé par l'acide chlorhydrique, mais au delà de 5% de nanocristaux, une diminution progressive de la contrainte à la rupture est observée. L'allongement à la rupture diminue progressivement avec le taux de nanocristaux préparés par l'acide chlorhydrique.



**24A : Contrainte à rupture et module d'Young 24B : Allure des courbes contrainte/allongement**

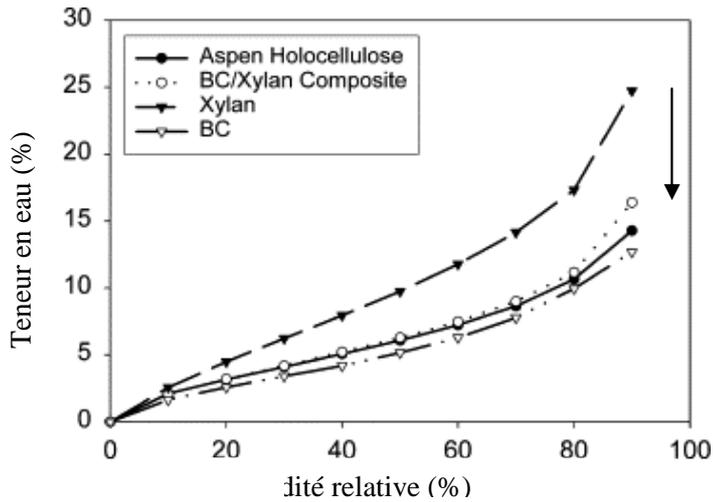
**Figure 24:** Propriétés mécaniques en traction de nanocomposites caoutchouc naturel/ nanocristaux de bagasse en fonction du taux de charge d'après (Bras, Hassan et al. 2010) 24A : Contrainte à rupture et module d'Young, 24B Allure des courbes contrainte/allongement avec CW : cellulose whiskers)



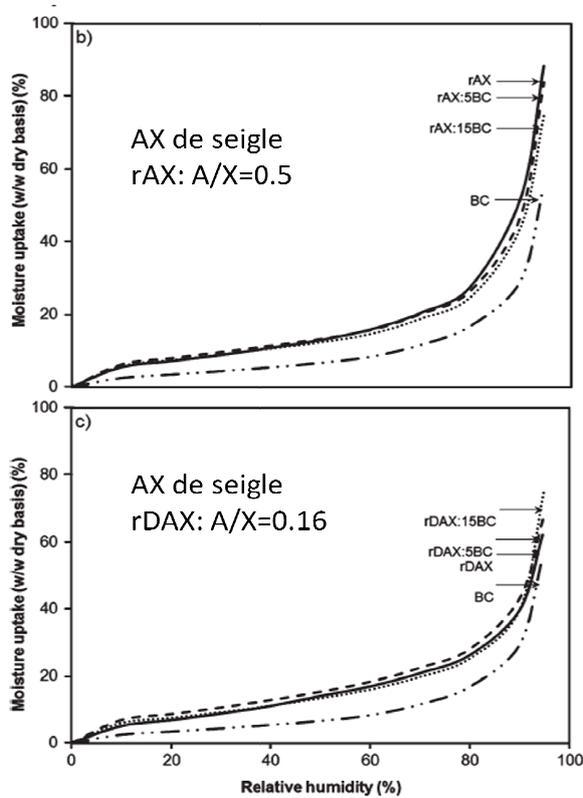
**Figure 25 :** Résistance à la traction (A) et allongement à la rupture (B) de films de xylanes renforcés avec des nanocristaux du bois préparés par l'acide sulfurique ou l'acide chlorhydrique. (Control : le pur xylanes film ; sulfonated whisker : les nanowhiskers préparés avec l'acide sulfurique ; HCL whisker : les nanowhiskers préparés par l'acide chlorhydrique)

#### - **Renforcement et propriétés de sorption d'eau**

Les études sur les matériaux nanocomposites montrent que le renforcement limite la reprise en eau. Par exemple, pour l'amidon plastifié avec du glycérol, la teneur en eau diminue de 60% à 37% (à 98% HR au terme de 300 heures) lors de l'ajout de 30% de nanocristaux de cellulose de coton (Lu, Weng et al. 2005). Anglès et al. (Anglès and Dufresne 2000) ont remarqué également une diminution de la reprise en eau quand l'amidon thermoplastique est renforcé par les nanocristaux de tunicine (0-25% p/p). L'effet de renforcement sur les propriétés de sorption d'eau a été étudié pour les films hémicellulosiques. Des glucomannanes de Konjac plastifiés avec 40% glycérol et les galactoglucomannanes plastifiés avec 40% glycérol présentent une diminution de teneur en eau fonction de taux de charge à 76% HR. En revanche, ce phénomène n'a pas été observé à 54% HR (Mikkonen, Mathew et al. 2010). Des xylanes d'avoine renforcés par la cellulose bactérienne ont absorbé moins d'eau sur une large gamme d'humidité relative (10% à 90% HR) (Dammström, Salmén et al. 2005) (Figure 26). Stevanic et al. (Stevanic, Joly et al. 2011) ont préparé des films d'arabinoxylanes de seigle natifs (rAX) et modifiés (rDAX) enzymatiquement par une arabinosidase (modification du rapport Ara/Xyl). Les teneurs en eau ont diminué de 90% à 75% massique à 95% HR pour les xylanes natifs renforcés par 15 wt.% la cellulose bactérienne. Les xylanes modifiés ont présenté un résultat surprenant : une augmentation de la reprise en eau à haute HR a été observée après avoir ajouté les nanocristaux (Figure 27).



**Figure 26:** Isothermes de sorption d'eau de xylanes d'avoine chargés ou non de cellulose bactérienne (BC) d'après (Dammström, Salmén et al. 2005)



**Figure 27:** Isothermes de sorption d'eau des arabinoxylanes de seigles (AX) chargés ou non de 5 ou 15 % (m/m) de cellulose bactérienne à 20°C d'après (Stevanic, Joly et al. 2011) Codification : rAX : arabinoxylanes non modifiés (Ara/Xyl = 0,5), rdAX : arabinoxylanes modifiés (Ara/Xyl = 0,16). Exemple de nomenclature : rDAX :15BC : AX modifiés contenant 15% de cellulose bactérienne

### - Renforcement et propriétés barrière

L'amélioration des propriétés barrière à l'oxygène et à la vapeur d'eau a été observée après renforcement par des nanocharges. Le taux de transmission de la vapeur d'eau diminue de  $0,078 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{jour}^{-1}$  pour un polymère à base d'amidon de maïs non chargé à  $0,043 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{jour}^{-1}$

pour le composite chargé (Angellier, Molina-Boisseau et al. 2005) (à même épaisseur). Pour des nanocomposites à base de PLA renforcé par 10% de nanocristaux de coton, la perméation à la vapeur d'eau a diminué de plus de la moitié (Paralikal, Simonsen et al. 2008). Dans le cas de polymères hémicellulosiques, Mikkonen et al. (Mikkonen, Mathew et al. 2010) ont remarqué qu'un film de glucomannanes de konjac montre une faible diminution du coefficient de perméabilité à la vapeur d'eau, de 3,7 g.mm/m<sup>2</sup>. j. kPa à 2,6 g.mm/m<sup>2</sup>. j. kPa après ajout de 5% de nanocharges. La perméation à la vapeur d'eau de films de xylanes d'avoine a été également étudié par Saxena et al. (Saxena, Elder et al. 2011). L'ajout de 5% de nanocristaux de cellulose du bois a entraîné une diminution de moitié de taux de transmission à la vapeur d'eau.

L'impact d'un renforcement par des nanocharges sur la perméation à l'oxygène a également été étudié et a montré que celle-ci diminuait. Par exemple, Angellier et al. (Angellier, Molina-Boisseau et al. 2005) ont noté que la perméation à l'oxygène diminue de 25 barrer (16,2 cm<sup>3</sup> μm m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> kPa<sup>-13</sup> ou 8,37.10<sup>-15</sup> mol/m s Pa en unité SI) pour le caoutchouc naturel à 21,1 barrer quand ce matériau est mélangé avec 10% de nanocristallites d'amidon et à 8,9 barrer quand il est chargé avec 30% de nanocristaux. Des films à base de galactoglucomannanes isolés à partir d'épicéa présentent une faible perméabilité à l'oxygène, et les composites renforcés par 5% nanocristaux de cellulose ne présentent pas de différence significative sur la perméabilité de l'oxygène. Dans le cas de films à base de glucomannanes de konjac, une faible diminution de perméabilité après renfort par 5% de nanocristaux (Mikkonen, Mathew et al. 2010) a été observée. Saxena et al. (Saxena, Elder et al. 2010) ont quant à eux observé une diminution drastique inégalée de la perméabilité à l'oxygène sur des films de xylanes d'avoine plastifiés au sorbitol. Les valeurs de perméabilité diminuent de 189 à 1,14 cm<sup>3</sup> μm m<sup>-2</sup> j<sup>-1</sup> kPa<sup>-1</sup> (6,02.10<sup>-19</sup> mol/m<sup>2</sup> s Pa) pour le composite contenant 5% de nanocristaux de cellulose. Les auteurs ont cependant noté la présence de micro craquelures sur la matrice de référence et ont conclu à une augmentation de l'intégrité des films grâce à l'addition de fibres.

---

<sup>13</sup> Cette unité (non SI) est utilisée car retrouvée systématiquement dans la littérature pour les matériaux hémicellulosiques

## Références

- Åman, P. and S. Bengtsson (1991). "Periodate oxidation and degradation studies on the major water-soluble arabinoxylan in rye grain." Carbohydrate Polymers **15**(4): 405-414.
- Aman, P. and E. Nordkvist (1983). "Chemical composition and in vitro degradability of botanical fractions of cereal straw." Swedish Journal of agriculture research **13**: 61-67.
- Andrewartha, K. A., D. R. Phillips, et al. (1979). "Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans." Carbohydrate Research **77**(1): 191-204.
- Angellier, H., S. Molina-Boisseau, et al. (2005). "Surface Chemical Modification of Waxy Maize Starch Nanocrystals." Langmuir **21**(6): 2425-2433.
- Angellier, H., S. Molina-Boisseau, et al. (2005). "Processing and Structural Properties of Waxy Maize Starch Nanocrystals Reinforced Natural Rubber." Macromolecules **38**(9): 3783-3792.
- Anglès, M. N. and A. Dufresne (2000). "Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Analysis." Macromolecules **33**(22): 8344-8353.
- Anglès, M. N. and A. Dufresne (2001). "Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposite Materials. 2. Mechanical Behavior." Macromolecules **34**(9): 2921-2931.
- Annisson, G., P. J. Moughan, et al. (1995). "Nutritive activity of soluble rice bran arabinoxylans in broiler diets." British Poultry Science **36**(3): 479-488.
- Araki, J., M. Wada, et al. (1998). "Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose." Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **142**(1): 75-82.
- Arvanitoyannis, I. and C. G. Biliaderis (1999). "Physical properties of polyol-plasticized edible blends made of methyl cellulose and soluble starch." Carbohydrate Polymers **38**(1): 47-58.
- Arvanitoyannis, I., M. Kalichevsky, et al. (1994). "Study of diffusion and permeation of gases in undrawn and uniaxially drawn films made from potato and rice starch conditioned at different relative humidities." Carbohydrate Polymers **24**(1): 1-15.
- Azeredo, H. M. C. d. (2009). "Nanocomposites for food packaging applications." Food Research International **42**(9): 1240-1253.
- Azizi Samir, M. A. S., F. Alloin, et al. (2005). "Review of Recent Research into Cellulosic Whiskers, Their Properties and Their Application in Nanocomposite Field." Biomacromolecules **6**(2): 612-626.
- Azizi Samir, M. A. S., F. Alloin, et al. (2004). "Nanocomposite Polymer Electrolytes Based on Poly(oxyethylene) and Cellulose Nanocrystals." The Journal of Physical Chemistry B **108**(30): 10845-10852.
- Azizi Samir, M. A. S., F. Alloin, et al. (2004). "Preparation of Cellulose Whiskers Reinforced Nanocomposites from an Organic Medium Suspension." Macromolecules **37**(4): 1386-1393.
- Bacic, A and S. BA (1981). "Isolation and Ultrastructure of Aleurone Cell Walls From Wheat and Barley." Australian Journal of Plant Physiology **8**: 453-474.
- Baiardo, M., G. Frisoni, et al. (2003). "Thermal and mechanical properties of plasticized poly(L-lactic acid)." Journal of Applied polymer science **90**(7): 1731-1738.
- Bataillon, M., P. Mathaly, et al. (1998). "Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale." Industrial Crops and Products **8**(1): 37-43.
- Beaugrand, J. (2004). "Thesis."
- Beck-Candanedo, S., M. Roman, et al. (2005). "Effect of Reaction Conditions on the Properties and Behavior of Wood Cellulose Nanocrystal Suspensions." Biomacromolecules **6**(2): 1048-1054.

- Belbekhouche, S., J. Bras, et al. (2011). "Water sorption behavior and gas barrier properties of cellulose whiskers and microfibrils films." *Carbohydrate Polymers* **83**(4): 1740-1748.
- Bengtsson, S. and P. Åman (1990). "Isolation and chemical characterization of water-soluble arabinoxylans in rye grain." *Carbohydrate Polymers* **12**(3): 267-277.
- Bergmans, M. E. F., G. Beldman, et al. (1996). "Optimisation of the Selective Extraction of (Glucurono)arabinoxylans from Wheat Bran: Use of Barium and Calcium Hydroxide Solution at Elevated Temperatures." *Journal of Cereal Science* **23**(3): 235-245.
- Bharadwaj, R. K. (2001). "Modeling the Barrier Properties of Polymer-Layered Silicate Nanocomposites." *Macromolecules* **34**(26): 9189-9192.
- Bondeson, D., A. Mathew, et al. (2006). "Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis." *Cellulose* **13**(2): 171-180.
- Bras, J., M. L. Hassan, et al. (2010). "Mechanical, barrier, and biodegradability properties of bagasse cellulose whiskers reinforced natural rubber nanocomposites." *Industrial Crops and Products* **32**(3): 627-633.
- Brillouet, J.-M. and J.-P. Joseleau (1987). "Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran) of wheat kernel." *Carbohydrate Research* **159**(1): 109-126.
- Browning, B. L. (1967). "Methods of wood chemistry. Vol II. Interscience Publishers. pp882."
- Butler, B. L., P. J. Vergano, et al. (1996). "Mechanical and Barrier Properties of Edible Chitosan Films as affected by Composition and Storage." *Journal of Food Science* **61**(5): 953-956.
- Cabedo, L., E. Giménez, et al. (2004). "Development of EVOH-kaolinite nanocomposites." *Polymer* **45**(15): 5233-5238.
- Chazeau, L., J. Y. Cavallé, et al. (1999). "Viscoelastic properties of plasticized PVC reinforced with cellulose whiskers." *Journal of Applied polymer science* **71**(11): 1797-1808.
- Chazeau, L., J. Y. Cavallé, et al. (1999). "Mechanical behaviour above T<sub>g</sub> of a plasticised PVC reinforced with cellulose whiskers; a SANS structural study." *Polymer* **40**(19): 5333-5344.
- Cherian, G., A. Gennadios, et al. (1995). "Thermomechanical behavior of wheat gluten films: effect of sucrose, glycerin, and sorbitol." *Cereal Chemistry* **72**(1): 1-6.
- Coimbra, M. A., K. W. Waldron, et al. (1995). "Isolation and characterisation of cell wall polymers from the heavily lignified tissues of olive (*Olea europaea*) seed hull." *Carbohydrate Polymers* **27**(4): 285-294.
- Dammström, S., L. Salmén, et al. (2005). "The effect of moisture on the dynamical mechanical properties of bacterial cellulose/glucuronoxylan nanocomposites." *Polymer* **46**(23): 10364-10371.
- Dervilly-Pinel, G., J.-F. Thibault, et al. (2001). "Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans." *Carbohydrate Research* **330**(3): 365-372.
- Dervilly-Pinel, G., V. Tran, et al. (2004). "Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour." *Carbohydrate Polymers* **55**(2): 171-177.
- Dervilly, G., L. Saulnier, et al. (2000). "Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(2): 270-278.
- Digabel-houllier, F. I. (2004). *Thesis*.
- Dole, P., C. Joly, et al. (2004). "Gas transport properties of starch based films." *Carbohydrate Polymers* **58**(3): 335-343.
- Doner, L. W., & Hicks, K. B. (1997). Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chemistry*, **74**(2), 176-181.

- Dong, S. and M. Roman (2007). "Fluorescently Labeled Cellulose Nanocrystals for Bioimaging Applications." Journal of the American Chemical Society **129**(45): 13810-13811.
- Donnelly, B. J., J. L. Helm, et al. (1973). "The Carbohydrate Composition of Corn Cob Hemicelluloses." Cereal Chemistry **50**: 548-552.
- Dufresne, A. (2010). "Les nanotechnologies dans l'industrie papetière." Edition: Technique Ingénieur.
- Dufresne, A., M. B. Kellerhals, et al. (1999). "Transcrystallization in Mcl-PHAs/Cellulose Whiskers Composites." Macromolecules **32**(22): 7396-7401.
- Ebringerová, A. (2005). "Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses." Macromolecular Symposia **232**(1): 1-12.
- Ebringerová, A. and T. Heinze (2000). Macromol. Rapid Commun. **21**: 542.
- Ebringerová, A. and T. Heinze (2000). "Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylns structures, isolation procedures and properties." Macromolecular Rapid Communications **21**(9): 542-556.
- Ebringerová, A. and Z. Hromádková (1992). "Flow properties of rye bran arabinoxylan dispersions." Food Hydrocolloids **6**(5): 437-442.
- Ebringerová, A., Z. Hromádková, et al. (1992). "Structural and solution properties of corn cob heteroxylns." Carbohydrate Polymers **19**(2): 99-105.
- Ebringerová, A., Z. Hromádková, et al. (2005). Hemicellulose. Polysaccharides I. T. Heinze, Springer Berlin / Heidelberg. **186**: 1-67.
- Ebringerová, A., Z. Hromádková, et al. (1997). "Effect of ultrasound on the immunogenic corn cob xylan." Ultrasonics Sonochemistry **4**(4): 311-315.
- Edlund, U., Y. Z. Ryberg, et al. (2010). "Barrier Films from Renewable Forestry Waste." Biomacromolecules **11**(9): 2532-2538.
- Famá, L., S. Goyanes, et al. (2007). "Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films." Carbohydrate Polymers **70**(3): 265-273.
- Fang, J. M., R. C. Sun, et al. (2000). "Isolation and characterization of hemicelluloses and cellulose from rye straw by alkaline peroxide extraction." Cellulose **7**(1): 87-107.
- Favier, V., H. Chanzy, et al. (1995). "Polymer Nanocomposites Reinforced by Cellulose Whiskers." Macromolecules **28**(18): 6365-6367.
- Fengel, D. and G. Wegener (1984). Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter: New York, NY: 613 pp.
- Fengel, D. and G. Wegener (1989). Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter.
- Finch, C. A. (1985). "Cellulose chemistry and its applications edited by T. P. Nevell and S. H. Zeronian, Ellis Horwood, Chichester, 1985. pp. 552, price £55.00. ISBN 0-85312-463-9." British Polymer Journal **17**(3): 321-321.
- Foley, K. (1978). "Physical Properties, Chemical Properties and Uses of the Anderson's Corn cob Products." The Andersons, Maumee, OH.
- Fringant, C., J. Desbrières, et al. (1996). "Characterisation of sorbed water molecules on neutral and ionic polysaccharides." International Journal of Biological Macromolecules **18**(4): 281-286.
- Gabrielii, I., P. Gatenholm, et al. (2000). "Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood." Carbohydrate Polymers **43**(4): 367-374.
- Galiotta, G., L. Di Gioia, et al. (1998). "Mechanical and Thermomechanical Properties of Films Based on Whey Proteins as Affected by Plasticizer and Crosslinking Agents." Journal of Dairy Science **81**(12): 3123-3130.
- Garcia de Rodriguez, N. L., W. Thielemans, et al. (2006). "Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites." Cellulose **13**(3): 261-270.

- Gaudin, S., D. Lourdin, et al. (2000). "Antiplasticisation and oxygen permeability of starch-sorbitol films." Carbohydrate Polymers **43**(1): 33-37.
- Gaudin, S., D. Lourdin, et al. (1999). "Plasticisation and Mobility in Starch-Sorbitol Films." Journal of Cereal Science **29**(3): 273-284.
- Girhammar, U. and B. M. Nair (1995). "Rheological properties of water soluble non-starch polysaccharides from whole grain rye flour." Food Hydrocolloids **9**(2): 133-140.
- Godbillot, L., P. Dole, et al. (2006). "Analysis of water binding in starch plasticized films." Food Chemistry **96**(3): 380-386.
- Goussé, C., H. Chanzy, et al. (2002). "Stable suspensions of partially silylated cellulose whiskers dispersed in organic solvents." Polymer **43**(9): 2645-2651.
- Grondahl, M., L. Eriksson, et al. (2004). "Material properties of plasticized hardwood Xylans for potential application as oxygen barrier films." Biomacromolecules **5**(4): 1528-1535.
- Grunert, M. and W. T. Winter (2002). "Nanocomposites of Cellulose Acetate Butyrate Reinforced with Cellulose Nanocrystals." Journal of Polymers and the Environment **10**(1): 27-30.
- Habibi, Y., L. A. Lucia, et al. (2010). "Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications." Chemical Reviews **110**(6): 3479-3500.
- Hajji, P., J. Y. Cavallé, et al. (1996). "Tensile behavior of nanocomposites from latex and cellulose whiskers." Polymer Composites **17**(4): 612-619.
- Hansen, N. M. L. and D. Plackett (2008). "Sustainable Films and Coatings from Hemicelluloses: A Review." Biomacromolecules **9**(6): 1493-1505.
- Hartman, J. (2006). "Hemicellulose as Barrier Material." Thesis.
- Hartman, J., A. C. Albertsson, et al. (2006). "Oxygen barrier materials from renewable source: Materials properties of softwood hemicellulose-based films." Journal of Applied Polymer Science **100**: 2985-2991
- Helbert, W., J. Y. Cavallé, et al. (1996). "Thermoplastic nanocomposites filled with wheat straw cellulose whiskers. Part I: Processing and mechanical behavior." Polymer Composites **17**(4): 604-611.
- Hoffmann, R. A., T. Geijtenbeek, et al. (1992). "1H-N.m.r. study of enzymically generated wheat-endosperm arabinoxylan oligosaccharides: structures of hepta- to tetradecasaccharides containing two or three branched xylose residues." Carbohydrate Research **223**(0): 19-44.
- Hoffmann, R. A., J. P. Kamerling, et al. (1992). "Structural features of a water-soluble arabinoxylan from the endosperm of wheat." Carbohydrate Research **226**(2): 303-311.
- Höije, A., M. Gröndahl, et al. (2005). "Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks." Carbohydrate Polymers **61**(3): 266-275.
- Höije, A., C. Sandström, et al. (2006). "Evidence of the presence of 2-O-β-d-xylopyranosyl-α-l-arabinofuranose side chains in barley husk arabinoxylan." Carbohydrate Research **341**(18): 2959-2966.
- Höije, A., E. Sternemalm, et al. (2008). "Material Properties of Films from Enzymatically Tailored Arabinoxylans." Biomacromolecules **9**(7): 2042-2047.
- Hollmann, J. and M. G. Lindhauer (2005). "Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran." Carbohydrate Polymers **59**(2): 225-230.
- <http://www.pvc.org/en/p/specific-gravity-density>.
- Imberty, A., A. Buléon, et al. (1991). "Recent Advances in Knowledge of Starch Structure." Starch - Stärke **43**(10): 375-384.
- Irvine, G. M. (1984). "The glass transitions of lignin and hemicellulose and their measurement by differential thermal analysis." Tappi journal **67**(5): 118-121.

- Izydorczyk, M. S. and C. G. Biliaderis (1992). "Influence of structure on the physicochemical properties of wheat arabinoxylan." Carbohydrate Polymers **17**(3): 237-247.
- Izydorczyk, M. S. and C. G. Biliaderis (1994). "Studies on the structure of wheat-endosperm arabinoxylans." Carbohydrate Polymers **24**(1): 61-71.
- Izydorczyk, M. S. and C. G. Biliaderis (1995). "Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties." Carbohydrate Polymers **28**(1): 33-48.
- Izydorczyk, M. S. and A. W. MacGregor (2000). "Evidence of intermolecular interactions of  $\beta$ -glucans and arabinoxylans." Carbohydrate Polymers **41**(4): 417-420.
- Izydorczyk, M. S., L. J. Macri, et al. (1998). "Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides -- I. Water-extractable [beta]-glucans and arabinoxylans." Carbohydrate Polymers **35**(3-4): 249-258.
- Jacobs, A. and O. Dahlman (2001). "Characterization of the Molar Masses of Hemicelluloses from Wood and Pulps Employing Size Exclusion Chromatography and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry." Biomacromolecules **2**(3): 894-905.
- Jain, R. K., M. Sjöstedt, et al. (2000). "Thermoplastic Xylan Derivatives with Propylene Oxide." Cellulose **7**(4): 319-336.
- Jannot, Y. (2008). "Isotermes de sorption d'eau: Modèles et Détermination."
- Kacuráková, M., N. Wellner, et al. (1999). "Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies." Food Hydrocolloids **13**(1): 35-41.
- Kaliyan, N. and R. V. Morey (2010). "Densification characteristics of corn cobs." Fuel Processing Technology **91**(5): 559-565.
- Kamm, B. and M. Kamm (2004). "Principles of biorefineries." Applied Microbiology and Biotechnology **64**(2): 137-145.
- Klemm, D., F. Kramer, et al. (2011). "Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials." Angewandte Chemie International Edition **50**(24): 5438-5466.
- Koros, W. J. and D. R. Paul (1976). "Design considerations for measurement of gas sorption in polymers by pressure decay." Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition **14**(10): 1903-1907.
- Kothapalli, A. and G. Sadler (2003). "Determination of non-volatile radiolytic compounds in ethylene co-vinyl alcohol." Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms **208**(0): 340-344.
- Kvien, I., B. S. Tanem, et al. (2005). "Characterization of Cellulose Whiskers and Their Nanocomposites by Atomic Force and Electron Microscopy." Biomacromolecules **6**(6): 3160-3165.
- Lide D.R. (Ed.) (2007-2008). "CRC handbook of Chemistry and Physics Online 88th ed., CRC press."
- Lin, J. S., M.-Y. Tang, et al. (1987). Fractal Analysis of Cotton Cellulose as Characterized by Small-Angle X-ray Scattering. The Structures of Cellulose, American Chemical Society. **340**: 233-254.
- Ljungberg, N., J. Y. Cavallé, et al. (2006). "Nanocomposites of isotactic polypropylene reinforced with rod-like cellulose whiskers." Polymer **47**(18): 6285-6292.
- Lu, C. and Y.-W. Mai (2007). "Permeability modelling of polymer-layered silicate nanocomposites." Composites Science and Technology **67**(14): 2895-2902.
- Lu, Y., L. Weng, et al. (2005). "Biocomposites of Plasticized Starch Reinforced with Cellulose Crystallites from Cottonseed Linter." Macromolecular Bioscience **5**(11): 1101-1107.
- Marais, S., E. Bureau, et al. (2004). "Transport of water and gases through EVA/PVC blend films—permeation and DSC investigations." Polymer Testing **23**(4): 475-486.

- Maréchal, P. (2001). "Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bi-vis – Obtention d'agro-matériaux." Thèse, INP Toulouse.
- Mares, D. J. and B. A. Stone (1973). "Studies on wheat endosperm. II. Properties of the wall components and studies on their organization in the wall." Australian Journal of Biology and Science **26**: 813-830.
- Mathew, A. P. and A. Dufresne (2002). "Morphological Investigation of Nanocomposites from Sorbitol Plasticized Starch and Tunicin Whiskers." Biomacromolecules **3**(3): 609-617.
- Mazeau, K., C. Moine, et al. (2005). "Conformational analysis of xylan chains." Carbohydrate Research **340**(18): 2752-2760.
- Mazza, M. (2009). Thesis.
- Michniewicz, J., C. G. Biliaderis, et al. (1990). "Water-Insoluble Pentosans of Wheat: Composition and Some Physical Properties." Cereal Chemistry **67**(5): 434.
- Mikkonen, K., A. Mathew, et al. (2010). "Glucomannan composite films with cellulose nanowhiskers." Cellulose **17**(1): 69-81.
- Mikkonen, K., J. Stevanic, et al. (2011). "Composite films from spruce galactoglucomannans with microfibrillated spruce wood cellulose." Cellulose **18**(3): 713-726.
- Mikkonen, K. S., M. I. Heikkilä, et al. (2010). "Spruce galactoglucomannan films show promising barrier properties." Carbohydrate Polymers **79**(4): 1107-1112.
- Mikkonen, K. S., S. Heikkinen, et al. (2009). "Films from oat spelt arabinoxylan plasticized with glycerol and sorbitol." Journal of Applied polymer science **114**(1): 457-466.
- Mikkonen, K. S., H. Rita, et al. (2007). "Effect of polysaccharide structure on mechanical and thermal properties of galactomannan-based films." Biomacromolecules **8**(10): 3198-3205.
- Mikkonen, K. S., H. Rita, et al. (2007). "Effect of Polysaccharide Structure on Mechanical and Thermal Properties of Galactomannan-Based Films." Biomacromolecules **8**(10): 3198-3205.
- Miyamoto, T. and E. H. Everson (1958). "Biochemical and Physiological Studies of Wheat Seed Pigmentation1." Agron. J. **50**(12): 733-734.
- Monnet, D., C. Joly, et al. (2010). "Enhanced mechanical properties of partially beta-amylase trimmed starch for material applications." Carbohydrate Polymers **80**(3): 747-752.
- Montané, D., X. Farriol, et al. (1998). "Fractionation of Wheat Straw by Steam-Explosion Pretreatment and Alkali Delignification. Cellulose Pulp and Byproducts from Hemicellulose and Lignin." Journal of Wood Chemistry and Technology **18**(2): 171-191.
- Nieduszynski, I. A. and R. H. Marchessault (1972). "Structure of  $\beta$ ,D(1 $\rightarrow$ 4')-xylan hydrate." Biopolymers **11**(7): 1335-1344.
- Nilsson, M., R. Andersson, et al. (2000). "Heterogeneity in a water-extractable rye arabinoxylan with a low degree of disubstitution." Carbohydrate Polymers **41**(4): 397-405.
- Olsson, A.-M. and L. Salmén (2003). The Softening Behavior of Hemicelluloses Related to Moisture. Hemicelluloses: Science and Technology. Washington, DC, American Chemical Society: 184-197.
- Paralikar, S. A., J. Simonsen, et al. (2008). "Poly(vinyl alcohol)/cellulose nanocrystal barrier membranes." Journal of Membrane Science **320**(1-2): 248-258.
- Pastell, H., L. Virkki, et al. (2009). "Presence of 1 $\rightarrow$ 3-linked 2-O-[beta]-d-xylopyranosyl-[alpha]-l-arabinofuranosyl side chains in cereal arabinoxylans." Carbohydrate Research **344**(18): 2480-2488.
- Pauly, M. and K. Keegstra (2008). "Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels." The Plant Journal **54**(4): 559-568.
- Pearce, G., J. Beard, et al. (1979). "Variability in the chemical composition of cereal straws and in vitro digestibility with and without sodium hydroxide treatment." Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry **19**: 350-353.

- Pénicaud, C. (2009). "Thesis."
- Pinto, J., A. Paiva, et al. (2011). "Corn's cob as a potential ecological thermal insulation material." Energy and Buildings **43**(8): 1985-1990.
- Pitkänen, L., M. Tenkanen, et al. (2011). "Behavior of polysaccharide assemblies in field-flow fractionation and size-exclusion chromatography." Analytical and Bioanalytical Chemistry **399**(4): 1467-1472.
- Pitkanen, L., P. Tuomainen, et al. (2008). "Structural comparison of arabinoxylans from two barley side-stream fractions." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(13): 5069-5077.
- Pitkanen, L., L. Virkki, et al. (2009). "Comprehensive Multidetector HPSEC Study on Solution Properties of Cereal Arabinoxylans in Aqueous and DMSO Solutions." Biomacromolecules **10**(7): 1962-1969.
- Radley, M. (1976). "The Development of Wheat Grain in Relation to Endogenous Growth Substances." Journal of Experimental Botany **27**(5): 1009-1021.
- Ramiah, M. V. (1970). "Thermogravimetric and differential thermal analysis of cellulose, hemicellulose, and lignin." Journal of Applied polymer science **14**(5): 1323-1337.
- Rao, R. S. P. and G. Muralikrishna (2007). "Structural characteristics of water-soluble feruloyl arabinoxylans from rice (*Oryza sativa*) and ragi (finger millet, *Eleusine coracana*): Variations upon malting." Food Chemistry **104**(3): 1160-1170.
- Rémond, C., I. Boukari, et al. (2008). "Action of a GH 51 [alpha]-l-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabino-xylooligosaccharides." Carbohydrate Polymers **72**(3): 424-430.
- Ren, J.-L. and R.-C. Sun (2010). Chapter 4 - Hemicelluloses. Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels. Amsterdam, Elsevier: 73-130.
- Revol, J. F. (1982). "On the cross-sectional shape of cellulose crystallites in *Valonia ventricosa*." Carbohydrate Polymers **2**(2): 123-134.
- Revol, J. F., H. Bradford, et al. (1992). "Helicoidal self-ordering of cellulose microfibrils in aqueous suspension." International Journal of Biological Macromolecules **14**(3): 170-172.
- Rharbi, Y., A. Yekta, et al. (1999). "A Method for Measuring Oxygen Diffusion and Oxygen Permeation in Polymer Films Based on Fluorescence Quenching." Analytical Chemistry **71**(22): 5045-5053.
- Rindlav-Westling, A., M. Stading, et al. (1998). "Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films." Carbohydrate Polymers **36**(2-3): 217-224.
- Roohani, M., Y. Habibi, et al. (2008). "Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites." European Polymer Journal **44**(8): 2489-2498.
- Rusli, R. and S. J. Eichhorn (2008). "Determination of the stiffness of cellulose nanowhiskers and the fiber-matrix interface in a nanocomposite using Raman spectroscopy " Applied Physics Letters **93**(3): 033111.
- Saake, B., T. Kruse, et al. (2001). "Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography." Bioresource Technology **80**(3): 195-204.
- Salmén, L. (1982). "Temperature and water induced softening behaviour of wood fiber based materials." Thesis(Departement of Paper Technology, The Royal Institute of Technology): Stockholm, Sweden.
- Sanjuán, R., J. Anzaldo, et al. (2001). "Morphological and Chemical Composition of Pith and Fibers from Mexican Sugarcane Bagasse." European Journal of Wood and Wood Products **59**(6): 447-450.
- Saxena, A., T. J. Elder, et al. (2010). "High oxygen nanocomposite barrier films based on xylan and nanocrystalline cellulose." Nano-Micro Letters **2**(4): 235-241.

- Saxena, A., T. J. Elder, et al. (2009). "Novel nanocellulosic xylan composite film." Composites Part B: Engineering **40**(8): 727-730.
- Saxena, A., T. J. Elder, et al. (2011). "Moisture barrier properties of xylan composite films." Carbohydrate Polymers **84**(4): 1371-1377.
- Scheller, H. V. and P. Ulvskov (2010). "Hemicelluloses." Annual Review of Plant Biology **61**(1): 263-289.
- Schooneveld-Bergmans, M. E. F., G. Beldman, et al. (1999). "Structural Features of (Glucurono)Arabinoxylans Extracted from Wheat Bran by Barium Hydroxide." Journal of Cereal Science **29**(1): 63-75.
- Si, L., M. V. Massa, et al. (2005). "Chain Entanglement in Thin Freestanding Polymer Films." Physical Review Letters **94**(12): 127801.
- Singh, N., J. Singh, et al. (2003). "Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources." Food Chemistry **81**(2): 219-231.
- Sjöström, E. (1991). "Carbohydrate degradation products from alkaline treatment of biomass." Biomass and Bioenergy **1**(1): 61-64.
- Sorrentino, A., G. Gorrasi, et al. (2007). "Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications." Trends in Food Science & Technology **18**(2): 84-95.
- Sternemalm, E., A. Höije, et al. (2008). "Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films." Carbohydrate Research **343**(4): 753-757.
- Stevanic, J. S., C. Joly, et al. (2011). "Bacterial nanocellulose-reinforced arabinoxylan films." Journal of Applied polymer science **122**(2): 1030-1039.
- Šturcová, A., G. R. Davies, et al. (2005). "Elastic Modulus and Stress-Transfer Properties of Tunicate Cellulose Whiskers." Biomacromolecules **6**(2): 1055-1061.
- Sugiyama, J., H. Chanzy, et al. (1992). "Orientation of cellulose microcrystals by strong magnetic fields." Macromolecules **25**(16): 4232-4234.
- Sun, R., J. M. Lawther, et al. (1995). "Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw." Industrial Crops and Products **4**(2): 127-145.
- Sun, R. C. and X. F. Sun (2002). "Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw." Carbohydrate Polymers **49**(4): 415-423.
- Talja, R. A. (2007). "Thesis."
- Tashiro, K. and M. Kobayashi (1991). "Theoretical evaluation of three-dimensional elastic constants of native and regenerated celluloses: role of hydrogen bonds." Polymer **32**(8): 1516-1526.
- Terech, P., L. Chazeau, et al. (1999). "A Small-Angle Scattering Study of Cellulose Whiskers in Aqueous Suspensions." Macromolecules **32**(6): 1872-1875.
- Teyssède, G. and C. Lacabanne (1997). "Caractérisation des polymères par analyse thermique." Techniques d'ingénieur(Référence AM3274).
- Thiebaud, S. (1995). "Thesis."
- Timell, T. E. (1967). "Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses." Wood Science and Technology **1**(1): 45-70.
- Tokoh, C., K. Takabe, et al. (1998). "Cellulose Synthesized by Acetobacter Xylinum in the Presence of Acetyl Glucosaminan." Cellulose **5**(4): 249-261.
- Torre, P., B. Aliakbarian, et al. (2008). "Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis." Biochemical Engineering Journal **40**(3): 500-506.
- Tunc, M. S. and A. R. P. van Heiningen (2008). "Hemicellulose Extraction of Mixed Southern Hardwood with Water at 150 °C: Effect of Time." Industrial & Engineering Chemistry Research **47**(18): 7031-7037.

- Vaidya, U. R. and M. Bhattacharya (1994). "Properties of blends of starch and synthetic polymers containing anhydride groups." Journal of Applied polymer science **52**(5): 617-628.
- Van Tuil, R., P. Fowler, et al. (2000). "Biobased packaging materials for the food industry: Status and perspectives; Weber,." Weber, C. J., Ed.; KVL, Department of Dairy and Food Science: Frederiksberg C, Denmark; 13-44.
- Wagberg, L., G. Decher, et al. (2008). "The Build-Up of Polyelectrolyte Multilayers of Microfibrillated Cellulose and Cationic Polyelectrolytes." Langmuir **24**(3): 784-795.
- White, N. M. and M. P. Ansell (1983). "Straw-reinforced polyester composites." Journal of Materials Science **18**(5): 1549-1556.
- Wilkie, K. C. B. (1979). The Hemicelluloses of Grasses and Cereals. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. R. S. Tipson and H. Derek, Academic Press. **Volume 36**: 215-264.
- [www.soarnol.com/eng/s\\_data/index.html](http://www.soarnol.com/eng/s_data/index.html).
- [www.xylophane.com](http://www.xylophane.com).
- Ying, R., L. Saulnier, et al. (2011). "Films of arabinoxylans and [beta]-glucans extracted from cereal grains: Molecular motions by TD-NMR." Carbohydrate Polymers **86**(2): 812-822.
- Yuan, H., Y. Nishiyama, et al. (2006). "Surface Acylation of Cellulose Whiskers by Drying Aqueous Emulsion." Biomacromolecules **7**(3): 696-700.
- Zeitoun, R., P. Y. Pontalier, et al. (2010). "Twin-screw extrusion for hemicellulose recovery: Influence on extract purity and purification performance." Bioresource Technology **101**(23): 9348-9354.
- Zhang, P. and R. L. Whistler (2004). "Mechanical properties and water vapor permeability of thin film from corn hull arabinoxylan." Journal of Applied Polymer Science **93**(6): 2896-2902.
- Zhang, S., W. Winter, et al. (2005). "Water-activated cellulose-based electrorheological fluids." Cellulose **12**(2): 135-144
- Zhang, Y. H. (2008). "Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(5): 367-375.

## **Matériels et méthodes**

## 1 Matériels

### 1.1 Les diverses ressources végétales utilisées

#### - Son de blé

Le son de blé désamidonné a été fourni par Agro-industrie Recherches et Développement (ARD, Pomacle, France).

#### - Paille de blé

La paille de blé est de variété Apache. Elle a été fournie par Agro-industrie Recherches et Développement (ARD, Pomacle, France). Il s'agit d'un lot récolté en 2005 qui a été broyé à 2 mm.

#### - Rafles de maïs

Les rafles de maïs Grit 100 ont été fournies par la société Eurocob (Maubourget, France).

### 1.2 Les enzymes

- **Lichenase** (*Bacillus subtilis*, Megazyme, Lot 70801) 330 UI/mL, pH optimum = 6.5 -7.0, Température optimale = 60°C.

-  **$\beta$ -glucosidase** (NS-50010, lot DCN00211, Novozymes) 250 CBU/g, pH optimum = 5.0, Température optimale = 50°C.

- **Xylanase Shearzyme** (*Aspergillus oryzae*, CD00220, endo-(1-4)-D-xylanase, Novozymes, Bagsvaerd, Danemark) 49100 nkat/mL, pH optimum = 6.0, Température optimale = 40°C.

-  **$\alpha$ -arabinofuranosidase** (*Cellvibrio japonicus*, Megazyme, lot 90601) 21 UI/mg, pH optimum = 5.5, Température optimale = 50°C

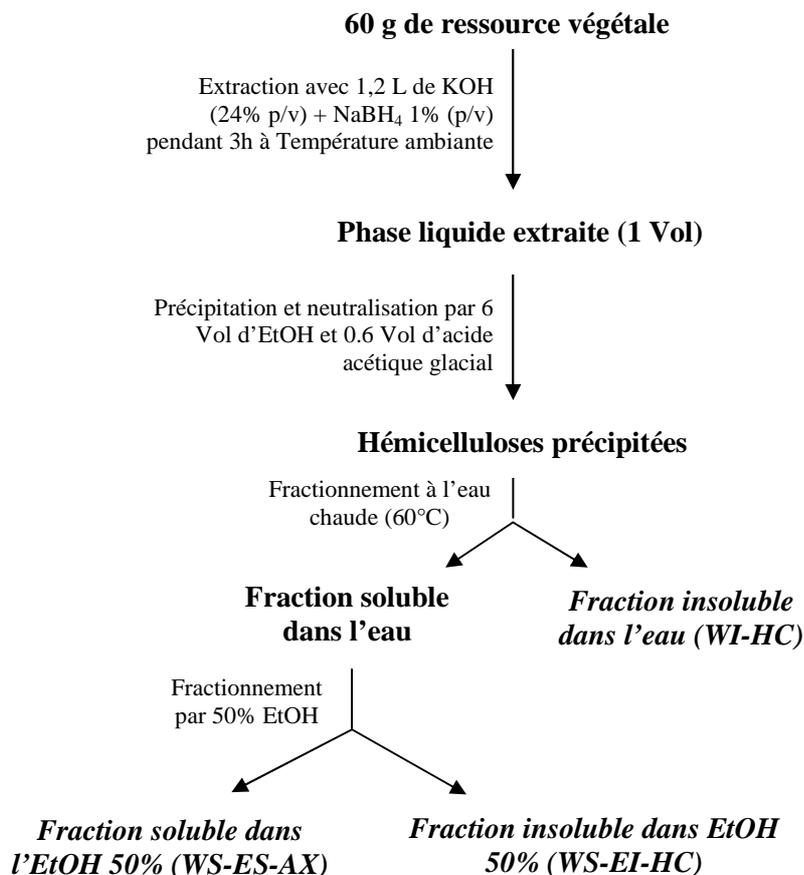
-  **$\alpha$ -arabinofuranosidase** (*Bifidobacterium sp.*, Megazyme, lot 31001) 200 UI /mL, pH optimum = 6.0, Température optimale = 50°C

## 2 Méthodes de production des xylanes et des whiskers de cellulose

### 2.1 Extraction des xylanes

60 g de ressource végétale (paille ou son de blé ou rafles de maïs) ont été mis en présence d'1,2 L d'une solution de KOH 24% (p/v) contenant 1% (p/v) de NaBH<sub>4</sub> pendant 3h à température ambiante sous agitation. La solution a été centrifugée 20 minutes à 9000 g et le surnageant a ensuite été précipité par 6 V d'éthanol à 95% (v/v) et 0,6 V d'acide acétique glacial (v/v) pendant une nuit à 4°C. Les xylanes ont été récupérés par filtration (verre fritté de porosité 40-100 µm) puis rincés par 1 L d'éthanol à 80% (v/v). Les xylanes ont ensuite été rincés 6 fois par 120 mL d'eau distillée chauffée à 60°C pendant 10 minutes. La fraction insoluble dans l'eau (WI-HC) a été récupérée par centrifugation (20 min à 9000g). Les xylanes solubles dans l'eau ont été précipités par de l'éthanol à une concentration finale de 50% (v/v) pendant une nuit à 4°C. Une centrifugation (20 min à 9000 g) a permis de séparer les fractions insolubles (WS-EI-HC) et solubles (WS-ES-AX) dans l'éthanol 50%.

Un schéma récapitulatif des différentes étapes est présenté Figure 1.



**Figure 1** : schéma d'extraction des hémicelluloses à partir de la ressource végétale.

## **2.2 Purification des xylanes par traitement à la lichenase**

Afin d'éliminer les  $\beta$ -glucanes co-extraits en même temps que les xylanes, un traitement à la lichenase a été effectué sur les fractions de xylanes dont l'analyse de la composition en sucres (voir 3.1) a montré une teneur importante en glucose. Ainsi, ont été traitées à la lichenase les fractions WI-HC et WS-EI-HC.

300 mg de chacune de ces fractions ont été incubés dans 30 mL de tampon Tris-HCl 50 mM de pH 6. 300  $\mu$ L de lichenase et 200  $\mu$ L de  $\beta$ -glucosidase (dilution 1/10<sup>ème</sup>) ont été ajoutés. Le traitement a été réalisé à 60°C pendant 24 heures sous agitation. Après 24 heures, la solution a été chauffée à 100°C pendant 10 minutes pour inactiver les enzymes. La solution a ensuite été dialysée (membrane de 3500 Da) contre l'eau distillée. Une lyophilisation a permis de récupérer les xylanes sous forme solide. Les fractions purifiées sont nommées WI-AX et WI-ES-AX.

## **2.3 Production des nanocristaux de cellulose à partir de linters de coton**

25 g de linters de coton ont été suspendus dans 1 L de 2 % NaOH (p/v) pendant 12 heures à température ambiante sous agitation. La suspension a ensuite été filtrée sur papier-filtre et rincée plusieurs fois par de l'eau distillée (jusqu'à pH neutre). Les fibres de coton ont été mélangées à 500 mL d'acide sulfurique (65% p/p) et l'hydrolyse acide a été réalisée dans un bécher placé dans un bain-marie à 45°C sous agitation mécanique (pour assurer l'homogénéité de température) et constante.

Après une durée d'hydrolyse de 45 minutes, la suspension a été lavée par une succession de 4 lavages à l'eau déionisée suivi de centrifugations (10 min à 15 000g). La suspension de nanocristaux a été dialysée contre de l'eau distillée (membrane de 6000 - 8000 Da) puis traitée par ultrasonication pendant 20 min (Branson Sonifier). La suspension a ensuite été filtrée (verre fritté de porosité 100-160  $\mu$ m) pour éliminer les agrégats. La concentration de nanocristaux a été déterminée par pesée avant et après lyophilisation.

Les moyennes des diamètres et des longueurs des nanocristaux ont été calculés lors d'une étude antérieure par analyse d'images numériques (Roohani, Habibi et al. 2008). Le diamètre et la longueur sont de  $14.6 \pm 3.9$  nm et  $171.6 \pm 48.2$  nm respectivement.

### 3 Méthodes de caractérisation des Hémicelluloses (HC) et des ArabinoXylanes (AX)

#### 3.1 Analyse de la composition en monosaccharides neutres

L'analyse de la composition en monosaccharides a été réalisée par chromatographie HPAEC-PAD (Dionex) après une hydrolyse à l'acide sulfurique.

10-20 mg d'échantillons ont été hydrolysés par 125  $\mu$ L d'acide sulfurique 12M pendant 2 heures sous agitation à température ambiante. Après 2 heures, le milieu a été dilué par ajout de 675  $\mu$ L d'eau ultrapure et de 200  $\mu$ L de fucose (10 mg/mL). L'hydrolyse s'est poursuivie durant 2 heures à 100°C dans un bain à huile. Après refroidissement, le milieu a été à nouveau dilué par ajout de 1 mL d'eau ultrapure puis centrifugé 10 minutes à 15 000g. Les analyses ont été réalisées après filtration des solutions (0,2  $\mu$ m).

Les monosaccharides neutres libérés lors de l'hydrolyse acide ont été identifiés et quantifiés par chromatographie d'échange d'anions sur colonne Carbowac PA1 (Dionex, 4x250 mm). La détection a été réalisée par ampérométrie pulsée (Dionex) avec une électrode de mesure en or (PAD2). Les sucres neutres ont été élués à l'aide d'un gradient de soude et d'acétate de sodium (méthode décrite dans le Tableau 1) avec un débit de 1 mL/min. L'utilisation d'un post colonne de NaOH 300 mM à un débit de 0,7 mL/min a permis d'augmenter la sensibilité de la détection ampérométrique.

| Temps en min | A (%) | B (%) | C (%) | D (%) |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| 0            | 1,2   | 66    | 0     | 32,8  |
| 32           | 1,2   | 66    | 0     | 32,8  |
| 32,1         | 0     | 66    | 1,2   | 32,8  |
| 50           | 0     | 0     | 100   | 0     |
| 50,1         | 100   | 0     | 0     | 0     |
| 55           | 100   | 0     | 0     | 0     |
| 55,1         | 1,2   | 66    | 0     | 32,8  |
| 65           | 1,2   | 66    | 0     | 32,8  |

**Tableau 1:** Gradient de NaOH et de NaOAc permettant la séparation des sucres monomériques

Voie A : NaOH 300mM

Voie B : H<sub>2</sub>O

Voie C : NaOH 300mM + NaOAc 300mM

Voie D : H<sub>2</sub>O

### 3.2 Analyse de la composition en monosaccharides acides

La détermination de la composition en sucres acides (acide glucuronique et son dérivé 4-*O*-méthylé, acide galacturonique) a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse acide.

La méthanolyse a été réalisée dans les conditions suivantes : 2 mL d'un mélange HCl 2M / méthanol (16% v/v) ont été utilisés pour dissoudre 10 mg de xylooligosaccharides. La solution HCl 2M / méthanol a été préparée par addition de 16 mL de chlorure d'acétyle (Fluka, St. Louis, MO, USA) dans du méthanol anhydre (Sigma, St. Louis, MO, USA) (volume final de 100 mL). Les échantillons ont été mis dans un four à 100 °C pendant 3 heures. 100 µL de pyridine anhydre (Merck, Darmstadt, Germany) et 250 µL de sorbitol (1mg/mL dans le méthanol) ont été ajoutés dans les solutions qui ont ensuite été évaporées à 40°C sous azote pendant 15 minutes. 100 µL de pyridine et 100 µL de réactif de silylation (1µL de chlorure de triméthylsilyle + 99 µL de bis (triméthylsilyl)trifluoroacétamide) ont été ajoutés. Les échantillons ont été ensuite chauffés à 60 °C pendant 30 minutes puis évaporés à 40°C sous azote pendant 15 minutes. 1 mL d'heptane (HPLC grade, Rathburn, Walkerburn, UK) a été ajouté et les solutions ont été mélangées puis filtrées (filtre Acrodisc, 0,45 µm) avant d'être analysées par GC-FID (Agilent 6890N, Santa Clara, CA, USA).

Pour l'analyse GC-FID, 1 µL d'échantillon silylé a été injecté dans une colonne DB-1 (Agilent J&W, California, USA) couplée à un détecteur à ionisation de flamme. Le programme de température était de 150 °C (3 min), 2 °C / min; 186 °C, 1 °C / min, 200 °C, 20 °C / min, 300 °C. Le gaz vecteur était l'hélium.

### 3.3 Dosages des teneurs en protéines et en lignine

La teneur en protéines a été déterminée par quantification de la teneur en N total avec un analyseur élémentaire (NA 1500, Carlo Erba) couplé à un spectromètre de masse (Fisons Isochrom, Milan, Italie). 3-5 mg d'échantillons ont été utilisés (triplicata répétition). La teneur en N total a été convertie en teneur en protéines avec l'équation:  $N \times 5,7$  (valeur adaptée pour le son de blé selon Beaugrand, Crônier et al. 2004). Le débit de gaz hélium était de 100 ml/min et la lucine a été utilisée comme standard pour la calibration.

La teneur en lignine Klason a été quantifiée en se basant sur le résidu acide insoluble (Monties, 1984) restant après une hydrolyse d'acide sulfurique. Les échantillons (300 mg) ont été suspendus dans 3 mL d'acide sulfurique (72%, p/p) pendant 2 heures à 20°C puis

hydrolysés à 100°C avec de l'acide sulfurique 1M. Les résidus ont été séchés à 105°C et les teneurs en lignines ont été déterminées après pesées et soustraction des cendres obtenues après 3 heures à 550°C.

### 3.4 Analyse des structures des arabinoxylanes

La détermination de la structure des arabinoxylanes a été basée sur leurs hydrolyses enzymatiques par une xylanase et par l'arabinosidase suivies d'une analyse des oligosaccharides générés par HPAEC-PAD couplée à une comparaison avec des oligosaccharides de structures connues.

Les échantillons d'AX, à 5 g/L dans le tampon acétate de sodium 0,02 M à pH 5, ont été hydrolysés par une xylanase Shearzyme à la concentration 10000 nkat/g xylane. Les solutions ont été incubées à 40°C pendant 48 heures. Après l'hydrolyse enzymatique, les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 10 minutes pour inactiver l'enzyme. Les hydrolysats filtrés (0,45 µm) ont été analysés par HPAEC-PAD sur colonne PA1 (Dionex) et la séparation des oligosaccharides a été obtenue avec un gradient de soude et d'acétate de sodium (voir Tableau 2).

|   | Time (min) | Flow (ml/min) | %A | %B  | %C |
|---|------------|---------------|----|-----|----|
| 1 |            | 1             | 0  | 100 | 0  |
| 2 | 15         | 1             | 0  | 100 | 0  |
| 3 | 35         | 1             | 12 | 88  | 0  |
| 4 | 40         | 1             | 12 | 88  | 0  |
| 5 | 45         | 1             | 0  | 100 | 0  |
| 6 | 50         | 1             | 0  | 100 | 0  |

**Tableau 2** : Gradient de NaOH et de NaOAc permettant la séparation des oligosaccharides

Solution A: 1 M NaOAc dans 100 mM NaOH; Solution B: 100 mM NaOH

Les pics correspondant aux oligosaccharides ont été identifiés en fonction de leur temps de rétention par comparaison avec des oligosaccharides commerciaux (xylose, xylobiose, xylotriose) et aussi des oligosaccharides purifiés et dont les structures ont été déterminées lors d'études antérieures (Pastell, Tuomainen et al. 2008): A<sup>3</sup>X ( $\alpha$ -L-Araf-(1 → 3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xyl), A<sup>2+3</sup>X ( $\alpha$ -L-Araf-(1→2)-[ $\alpha$ -L-Araf-(1→3)]- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-

Xylp) et A<sup>2+3</sup>XX ( $\alpha$ -L-Araf-(1→2)-[ $\alpha$ -L-Araf-(1→3)]- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xylp).

L'identification des oligosaccharides a également été complétée par une hydrolyse enzymatique des résidus arabinosyl des oligosaccharides des hydrolysats. 500  $\mu$ L des hydrolysats contenant les oligosaccharides produits par la xylanase Shearzyme ont été prélevés et traités avec une  $\alpha$ -arabinofuranosidase de *Cellvibrio japonicus* (5000 nkat/g xylanes). La réaction a été réalisée pendant 24 heures à 40°C pour libérer les substitutions d'arabinose. Les échantillons ont été ensuite analysés par HPAEC-PAD (Dionex) sur colonne PA1 (selon le protocole décrit ci-dessus).

Par ailleurs, afin d'évaluer la représentativité des structures des AX déterminées à partir des oligosaccharides, l'efficacité de la xylanase Shearzyme a été déterminée par mesure des sucres réducteurs produits par l'enzyme. Pour ce faire, un dosage DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) a été réalisé en utilisant la xylose comme standard. 2 mL de chaque échantillon hydrolysé ont été prélevés et 3mL de DNS a été ensuite ajouté aux échantillons. Après agitation, les mélanges ont été placés à 100°C pendant 5 min. L'absorbance a été mesurée à 540 nm. La concentration de sucres réducteurs a été déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des xyloses. De plus, les oligosaccharides tels que la xylose, le xylobiose et le xylotriose ont été quantifiés par HPAEC-PAD (Dionex) selon le protocole décrit ci-dessus.

### **3.5 Traitement enzymatique par les arabinofuranosidases**

Les arabinoxyanes de son de blé ont été traités par  $\alpha$ -arabinosidase de *Cellvibrio japonicas*, de *Bifidobacterium sp.* et les deux enzymes combinés respectivement. Les arabinoxyanes traitées par l'arabinosidase de *Cellvibrio japonicas* ont été dissous dans le tampon d'acétate de sodium, 20mM à pH 5.5 en utilisant un dosage enzymatique 5000 nkat /g xylane à 40°C. Les arabinoxyanes traitées par  $\alpha$ -arabinosidase de *Bifidobacterium sp.* ont été dissous dans un tampon phosphate de sodium 50 mM à pH 6.5 en utilisant un dosage enzymatique 1000 nkat / g xylane à 40°C. Des traitements enzymatiques ont également été réalisés dans le tampon d'acétate de sodium, 20mM à pH 5.5 avec les deux arabinosidases simultanément (5000 et 1000 nkat/g xylanes respectivement pour l'arabinosidase de *Cellvibrio japonicus* et pour celle de *Bifidobacterium sp.*). Les arabinoses libérées ont été

quantifié avec le dosage de kit lactose / galactose (K-LACGAR Megazyme) après 5h, 24h et 48h de traitement. Une solution d'arabinose (0,01 g/L) a été utilisée comme un standard.

### **3.6 Analyse par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC)**

La masse molaire des arabinoxylanes a été étudiée par chromatographie d'exclusion stérique dans deux milieux : une solution d'eau avec 0.1M de NaNO<sub>3</sub> et une solution de DMSO. Dans le premier cas (système eau), 4 mg d'arabinoxylanes ont été dissous dans 2 mL de solution aqueuse alors que dans le deuxième cas (système DMSO), 8 mg d'arabinoxylanes ont été dissous dans 2 mL de DMSO contenant 0.01M LiBr. La dissolution des échantillons a été réalisée à température ambiante pendant 4 jours. Les échantillons ont été filtrés (0,45 µm, filtres GHP Acrodisc 13, Pall Corp, Ann Arbor, MI, USA) avant injection.

La chromatographie d'exclusion stérique a été effectuée avec un système comprenant un passeur d'échantillons, une pompe (max GPC, Viscotek Corp, Houston, TX, USA), deux colonnes de type linéaire (Shodex LF-804, 8 x 300 mm, Showa Denko, Tokyo, Japon), une colonne de garde (Shodex LF-G, 4,6 x 10 mm), un détecteur UV (Waters 486 accordable Absorbance Detector, Milford, MA, USA), un détecteur de diffusion de la lumière combiné avec un détecteur viscosimétrique (270 dual detector, Viscotek Corp) et un détecteur de l'indice de réfraction (RI) (VE 3580, Viscotek Corp). Le détecteur de diffusion de la lumière ( $\lambda_0 = 670$  nm) comprend deux angles de diffusion: 7° (diffusion de la lumière à faible angle, LALS) et 90° (diffusion de la lumière à angle droit, RALS). Le détecteur de l'indice de réfraction (RI) et les détecteurs combinés de diffusion de la lumière et viscosimétrique ont été calibrés avec du pullulane (Mw = 47300, Polymer Laboratories, Shropshire, Royaume-Uni).

Le débit est de 1 mL/min et les colonnes ont été thermorégulées dans un four (Crococil de 100 à 040-220P, Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-la-Grande, France) à 40 °C. Les masses molaire ont été calculées sur la base de la méthode « diffusion de lumière/viscosimétrie ». Les valeurs dn/dc utilisées sont de 0,064 mL/g (Goring and Timell, 1960) pour le système DMSO et de 0,146 mL/g pour le système d'eau (Dervilly, Leclercq et al. 2001). Le détecteur UV à  $\lambda_0 = 280$  nm a été utilisé pour détecter des impuretés comme des protéines et lignines.

## **4 Préparation des films**

### **4.1 Préparation des films d'hémicelluloses HC et d'arabinoxylanes AX**

Chaque film a été obtenu de la façon suivante : 400 mg d'HC ou d'AX ont été dissous dans 20 mL d'eau distillée. La solubilisation a été obtenue par chauffage à 95 °C sous agitation pendant 60 min. Après refroidissement à température ambiante, la solution a été étalée sur boîte de Pétri en polystyrène (diamètre = 29 mm). Le séchage a été effectué à température ambiante avec une humidité relative contrôlée de 50%. Les films obtenus sont transparents et homogènes.

### **4.2 Préparation des films nanocomposites AX-nanocristaux**

Les solutions d'AX ont été préparées avec 400 mg d'AX dans 20 mL d'eau distillée à 95 °C sous agitation pendant 60 min. Les solutions ont été ensuite maintenues sous agitation à température ambiante. La suspension de nanocristaux a été agitée (barreau magnétique) avant d'être utilisée. Les solutions d'AX ont été mélangées à différentes quantités de nanocristaux (concentrations finales de nanocristaux de 5 et 10 % (p/p) et agitées pendant 15 min à température ambiante. Les solutions ont ensuite été étalées sur boîtes de Pétri en polystyrène (diamètre = 29 mm). Le séchage a été réalisé à température ambiante avec une humidité relative de 50%.

### **4.3 Stockage et conditionnement des films**

Tous les films ont été stockés sous une humidité relative constante (33, 54, ou 75% HR) pendant une semaine à 23°C avant d'effectuer les diverses analyses requérant une hydratation préalable. L'humidité a été contrôlée grâce à des solutions aqueuses saturées en  $Mg(Cl)_2$  (33% HR),  $Mg(NO_3)_2$  (54% HR) et NaCl (75% HR) respectivement à 20 °C.

## **5 Méthodes de caractérisation des films**

### **5.1 Observation par microscopie optique**

Les observations par microscopie ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique (Nikon, ECLIPSE TE 300) équipé d'un système de polarisation de la lumière.

### **5.2 Observation de la morphologie des films par microscopie électronique à balayage (MEB)**

Un microscope électronique à balayage (JEOL JSM-6100) a été utilisé pour étudier la morphologie des films nanocomposites. Les échantillons ont été placés dans de l'azote liquide, puis fracturés, montés et recouverts d'or/palladium (pulvérisateur JEOL JFC-1100<sup>E</sup>), avant d'être observés. Les micrographies MEB ont été obtenues en utilisant 10 ou 12 kV en fonction des échantillons.

### 5.3 Analyse par rayons X

Les analyses par RX ont été réalisées au sein de deux laboratoires différents.

Dans un premier temps, les analyses ont été réalisées au sein du laboratoire d'Electrochimie et Chimie du Solide (Université de Reims Champagne-Ardenne). Dans ce cas, les films d'AX ont été caractérisés par diffraction des rayons X. La diffusion des rayons X aux grands angles a été effectuée avec un appareil D8 ADVANCE BRUKER en utilisant comme rayon incident la longueur d'onde correspondant à la raie K-alpha du Cuivre (longueur d'onde = 1,54 Å). L'angle  $2\theta$  de diffraction varie de 15 à 35 degrés à une vitesse de 1 ° par minute et un pas de 0,1°.

Dans un deuxième temps, des analyses RX complémentaires ont été réalisées dans le cadre d'un STSM<sup>14</sup> à l'Université d'Helsinki. Les conditions d'analyses étaient les suivantes. La diffusion des rayons X aux grands angles a été effectuée dans la géométrie de transmission perpendiculaire en utilisant le rayonnement du Cu  $K\alpha_1$ . Un tube de rayon X (point focus, PANalytical, Almelo, The Netherlands) et un détecteur à plaque image MAR-345 (Rayonix, Evanston, IL) ont été utilisés. Le faisceau était monochromatique et focalisé sur le détecteur avec un monochromateur Montel collimation multicouches. La diffraction enregistrée dans deux dimensions a été moyennée à un profil d'intensité de diffraction unidimensionnelle radialement. Les intensités de diffraction ont été modifiées pour tenir compte de l'atténuation du rayonnement à l'intérieur de l'échantillon et des différences de trajets des rayons diffractés par le détecteur plat. Les diagrammes de tous les échantillons ont été mesurés à température ambiante de 23 ° C et 20% d'humidité relative.

Les intensités de diffraction ont été tracées en fonction de l'angle de diffusion. Les angles de diffusion sont donnés par la loi de Bragg :  $\lambda = 2d_{hkl} \sin(\theta)$  avec  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement incident et  $d_{hkl}$  la distance entre les plans donnée par les indices de Miller hkl.

La diffraction d'une référence de xylane 100% cristallin a été calculée en utilisant la structure cristalline connue (Nieduszynski and Marchessault, 1972) et les coordonnées

---

<sup>14</sup> Short Term Scientific Mission, Action COST FP0901

atomiques des dihydrates de xylane. Les intensités de diffraction ont été utilisées pour évaluer la quantité relative de régions cristallines et amorphes dans les échantillons de xylanes. Un logiciel informatique PowderCell 2.4 a été utilisé pour calculer les positions, les intensités et les largeurs des réflexions de dihydrates xylanes dans le domaine angulaire de 5°-60°. La diffraction calculée est ensuite comparée aux profils mesurés. Les paramètres de maille (a,b et c) de structure hexagonale ont été affinés jusqu'à obtention d'un bon ajustement avec les données mesurées.

#### 5.4 La densité des films à l'état sec

Une microbalance de sorption IGA de HIDEN ISOHEMA est équipée en mode statique. Le gaz utilisé est l'argon car les interactions (sorption) argon/hémicelluloses sont très faibles. Le principe repose sur la prise en compte de la poussée d'Archimède du système global (film+équipement mobile) corrigée de celle de l'équipement mobile. Environ 30 mg d'échantillon sous forme de morceaux de film sont installés dans une nacelle en inox, préalablement tarée par la balance dans le réacteur. Ce réacteur est ensuite équipé d'une enveloppe en inox thermostatée à une température de 20°C.

L'expérience commence par la purge dynamique de la ligne et le séchage de l'échantillon. Pour cela, la ligne est mise sous vide puis à une pression de 1000 mbar. Cette action est répétée 20 fois. Ensuite l'échantillon est désorbé (« OUTGAS ») pendant 1500 min pour un séchage complet. A la fin de cette séquence, la masse sèche est enregistrée par la balance (set dry mass). Les incréments de pression choisis sont les suivants : 1000 ; 2000 ; 3000 ; 4000 ; 5000 ; 6000 ; 7000 ; 7500 mbar. Le logiciel trace ensuite la relation suivante: poids d'échantillon (mg)= f (pressions d'Ar en mbar). Les points sont alignés suivant une droite dont la pente est déterminée. Connaissant les caractéristiques du gaz Argon, de la masse sèche de l'échantillon et de la pente de la droite, le logiciel peut alors calculer la densité sèche de l'échantillon avec la formule ci-dessous :

$$\Delta m_b = \Delta p M \left[ \left( \frac{\delta V_c}{T_c} \right) - \frac{\delta V_s}{T_s} \right] / R$$

c : contre poids            s : échantillon (sample)

$\Delta p$  : changement de pression (bars) due aux incréments de pression

M : masse moléculaire

$\delta V$  : Volume déplacé

T : Température (K)

R :  $8.31 \times 10^{-5}$

## 5.5 Isothermes de sorption d'eau

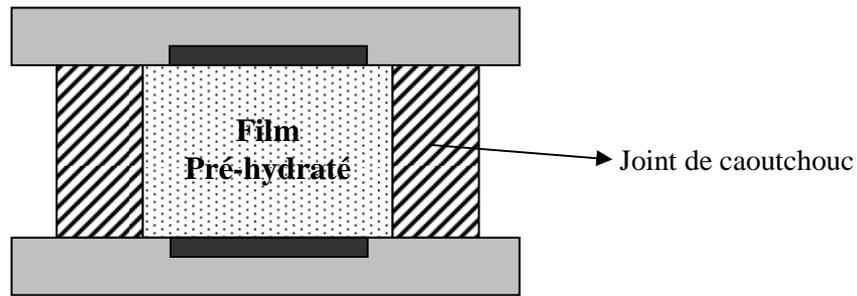
Les échantillons (2-5 mg) ont été placés dans une nacelle suspendue au fléau d'une microbalance (IGA, Intelligent analyseur gravimétrique, IGA-Hiden Ltd) à 20°C couplé à un générateur d'humidité. Les quantités d'eau sorbée ( $m_{\text{humide}}$ ) ont été enregistrées à l'équilibre pour des humidités relatives croissantes choisies (de 10 à 90%, intervalles de 10%). La masse sèche ( $m_{\text{sec}}$ ) a été obtenue dans un second temps après application d'une séquence de séchage (120 min à 40°C, puis 480 min à 20°C) sous flux d'azote sec.

La teneur en eau a été calculée par la relation suivante :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = 100 \frac{m_{\text{humide}} - m_{\text{sec}}}{m_{\text{sec}}}$$

## 5.6 Spectrométrie diélectrique (DEA)

Pour les mesures diélectriques, un DEA ou analyseur diélectrique dynamique (DEA, Waters) a été utilisé en mode multi-fréquences. Les films d'AX pré-hydratés (épaisseur  $\approx 30\mu\text{m}$ , diamètre  $\approx 5\text{ mm}$ ) ont été placés entre 2 électrodes parallèles pour film minces (dites « standard sputter coated »). Une force constante de 340 N a été appliquée sur le film au cours de la rampe de chauffage ( $3^\circ\text{C} / \text{min}$ ) sous flux d'azote. Une modification du porte-échantillon a été faite pour éviter l'évaporation de l'eau pendant les mesures. Un joint plat en caoutchouc fluoré et chargé noir de carbone a été ajouté (Figure 2) entre les deux électrodes. Ces joints sont spécialement fabriqués au laboratoire à partir d'une formulation crue de caoutchouc Viton®. Les joints sont réticulés sous presse chauffante et découpés à l'emporte pièce. La teneur en eau de l'échantillon équilibré ne variait pas jusqu'à 150°C pour les échantillons qui ne dépassaient pas initialement 20% de teneur en eau par rapport au poids sec. La température de transition a été prise à l'intensité maximale du pic de tangent delta.



 Partie de l'électrode en céramique (« sputter coated sensor pulvérisation revêtu standard »)

 Partie de l'électrode revêtue d'or

**Figure 2 :** DEA : montage de l'échantillon entre deux électrodes parallèles. L'étanchéité du système est réalisée grâce au joint plat.

## 5.7 Coefficients de perméabilité à l'oxygène par oxo luminescence

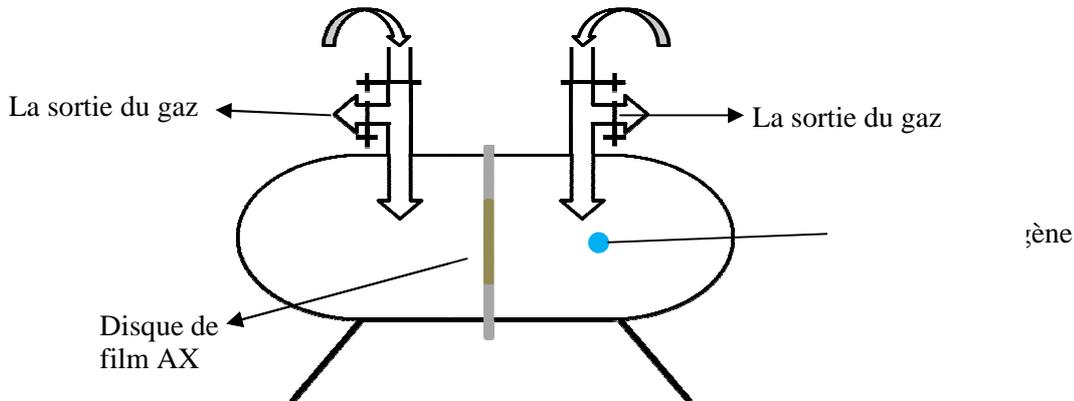
Les coefficients de perméabilité à l'oxygène des films d'AX ont été mesurés à 54% d'humidité relative à l'aide d'un montage (photo 1) mis au point au laboratoire dans le cadre de ce travail mais aussi à l'aide d'un appareillage commercial régulièrement calibré (cf paragraphe suivant).



**Photo 1 :** Cellule de perméation et collecte des pourcentages d'oxygène par utilisation de capteurs fluorescents.

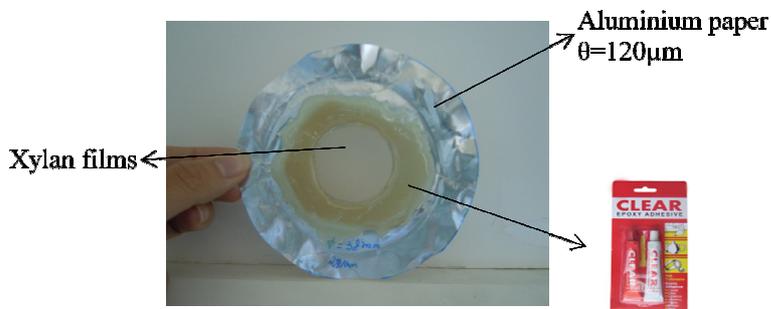
Une cellule de perméation de verre à double compartiments équipée de 4 vannes de purge – Figure 3) a été couplée avec un générateur de gaz humide (SETARAM Instrumentation; Caluire, FRANCE). Un capteur d'oxygène (Pst6, Presens®, Precision Sensing GmbH, Regensburg Germany) a été placé dans le compartiment aval pour suivre la

remontée d'oxygène due à son transport à travers le film testé. (Précision des capteurs Pst 6 : 25 ppm volumique).



**Figure 3 :** Perméamètre à oxygène développé au laboratoire

Les films d'AX réalisés ont été collés sur un masque d'aluminium à l'aide de colle époxy à deux composants et prise rapide (photo 2) afin de réduire la surface d'essai pour des raisons d'économie de matière. Le disque a ensuite été placé au centre de la cellule de perméation et les deux compartiments ont été maintenus par un collier de serrage (photo 1). L'étanchéité du système est assurée par la présence de 2 joints (PTFE) à lèvres de part et d'autre du disque d'aluminium.



**Photo 2 :** Montage d'un film d'AX (épaisseur type = 20  $\mu\text{m}$ ) sur un masque d'aluminium (épaisseur = 120  $\mu\text{m}$ )

Dans un premier temps, le système a été purgé à l'azote humidifié pendant 1 heure (compartiments amont et aval) pour éliminer l'oxygène présent dans la cellule et initialement sorbé dans le film. A l'issue de cette purge, les vannes avales ont été fermées (côté capteur). 1 bar d'oxygène humide (flux gazeux) a été appliqué en amont. La pression partielle d'oxygène transmis en aval a été mesurée en fonction du temps *via* le capteur d'oxygène (capteur à fibres optiques). L'humification est réalisée à l'aide d'un générateur d'humidité (Wetsys, Setaram, France) connecté à notre montage.

Le principe de la mesure de la concentration en oxygène par voie optique est basé sur les variations de fluorescence ou extinction de fluorescence (Figure 4) d'un capteur spécifique constitué d'une couche de polymère non barrière formulée à base de molécules fluorescentes (annexe 1). Les molécules émissives fixées (luminophores) sont excitées par une source de lumière de domaine bleu/vert ( $\lambda = 505 \text{ nm}$ ) via la fibre optique. La collision entre le luminophore dans son état excité et l'extincteur (la molécule d'oxygène) aboutit à une désactivation radiative. Après la collision, le transfert d'énergie a lieu de la molécule-indicateur excitée par l'oxygène qui est transférée à partir de son état fondamental (état triplet) à son état singlet excité. En conséquence, la molécule-indicateur ne peut pas émettre la luminescence et le signal mesurable de luminescence est diminué.

La relation entre la concentration d'oxygène et l'intensité de luminescence est établie par l'équation de SternVolmer :

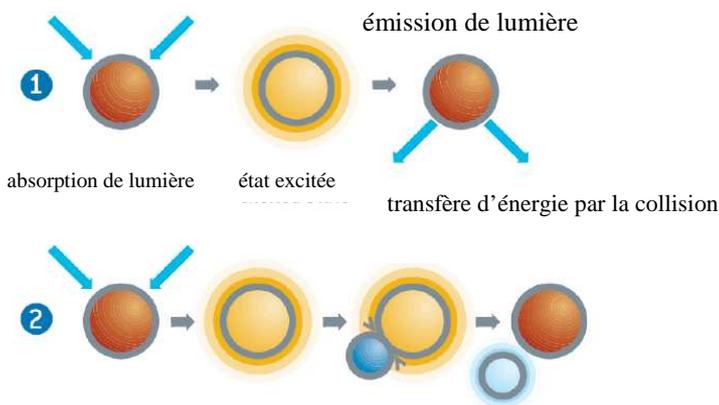
$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \cdot p_{O_2}$$

$I_0$  = Intensité de luminescence en absence d'oxygène

$I$  = Intensité de luminescence en présence d'oxygène

$K_{SV}$  : Constante de Stern Volmer

$p_{O_2}$  : pression d'oxygène (hPa)



**Figure 4 :** Le principe de l'extinction de fluorescence.

1 : procédure de luminescence en absence d'oxygène

2 : désactivation de luminescence en présence de molécules d'oxygène

L'étanchéité du système a été analysée en utilisant un disque d'aluminium non intègre (disque d'aluminium de diamètre égal à celui du film testé collé sur disque d'aluminium – diamètre cellule). La même méthode a été mise en œuvre pour mesurer le blanc. La valeur de

blanc a été obtenue après avoir réalisé dix répétitions. La perméation des films d'arabinoxylanes a été calculée après soustraction du blanc.

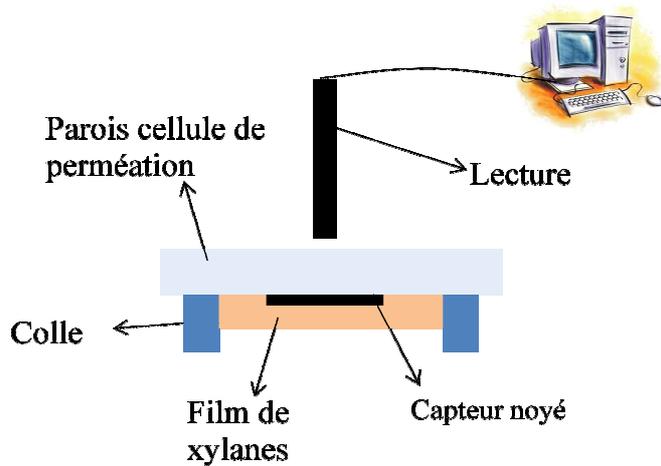
### **5.8 Mesure des coefficients de perméabilité à l'aide d'un perméamètre commercial Systech 8001**

La transmission d'oxygène a été mesurée avec ASTM D3985-81 en utilisant l'équipement *SYSTECH 8001* (Gruter&Marchand, France) avec un capteur d'oxygène coulométrique. La surface des films était de 5 cm<sup>2</sup>, et l'analyse a été faite à 50% humidité relative après avoir conditionné les films. Les données ont été collectées pendant 24 heures. La perméabilité a été calculée à partir de la transmission et de l'épaisseur du film avec une unité cm<sup>3</sup> μm/m<sup>2</sup> d KPa. Le perméamètre est calibré toutes les 5 semaines avec des films standards (certifiés, PIRA).

### **5.9 Le coefficient de diffusion d'oxygène et perméabilité relative (faibles quantités de films) : réalisation d'un micro-test de perméation**

Les quantités de films disponibles étant faibles, la mesure du coefficient de diffusion de l'oxygène a été réalisée en s'inspirant des mesures de coefficient de diffusion d'oxygène faites dans l'huile (Pénicaud, 2009). Nous avons développé un micro test de perméation. L'un des compartiments de la cellule de perméation a été utilisé à cette fin, un disque étanche d'aluminium étant placé au centre de la cellule. Un capteur d'oxygène (Presens<sup>®</sup>, Pst6, Precision Sensing GmbH, Regensburg Germany) a été revêtu par casting de matériau à tester. Le capteur a été auparavant positionné dans une petite enceinte dont les parois sont constituées de colle époxy afin de permettre la réalisation d'un film de plus forte épaisseur (Figure 5).

Le flux d'azote permet de purger l'oxygène dans la cellule, et dans le film pendant une nuit, ensuite une pompe de type pompe d'aquarium permettait l'humidification (en circuit fermé) de l'air ambiant par passage forcé dans un flacon contenant une solution saline saturée. Les solutions salines ont permis de générer une humidité relative contrôlée choisie (Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (54% HR), NaCl (75% HR) et KCl (85% HR)). La montée de pression partielle d'oxygène a été étudiée et enregistrée en fonction du temps à l'aide de la lecture déportée des capteurs revêtus (réalisé par le logiciel « Oxyview-PST6-V7.01»), les courbes obtenues présentent typiquement l'allure d'une courbe de perméation gazeuse avec régimes transitoires (« time-lag ») puis régime permanent.



**Figure 5:** Schéma du test de micro-perméation par capteur revêtu de film à analyser pour étudier le coefficient de diffusion et la perméabilité relative.

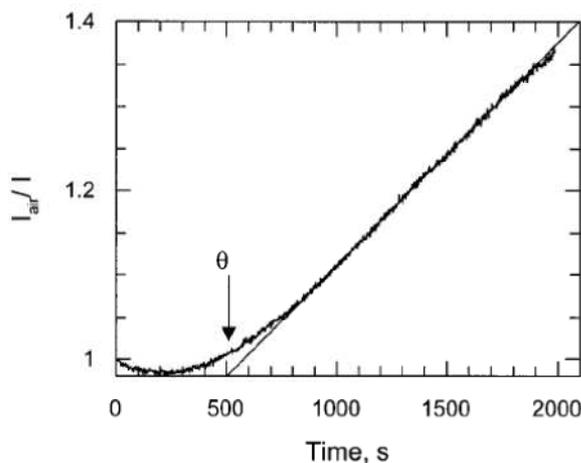
Les données ont été collectées par la lecture du capteur revêtu et enregistrées par le logiciel (« Oxyview-PST6-V7.01 »). Un exemple de profil est montré au niveau de la Figure 6 (Rharbi, Yekta et al. 1999). La valeur de Time-lag est donnée par le point d'intersection de la ligne horizontale ( $X = 0$ ). La formule suivante a été utilisée pour calculer le coefficient de diffusion du gaz :

$$D = \frac{l^2}{6\theta}$$

D : coefficient de diffusion ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

l : épaisseur du film (cm)

$\theta$  : valeur de Time lag



**Figure 6 :** profil typique pour la diffusion de gaz à travers un film de polymère d'après Rharbi, Yekta et al. 1999

Les données peuvent être exploitées de deux façons différentes :

- Pendant le régime permanent : les rapports de pente obtenus pour différents systèmes nous permettent de remonter au rapport des perméabilités des systèmes testés. Une détermination de la perméabilité réalisée par les techniques classiques (plus gourmande d'échantillon) pour un même film également testé par ce test de micro-perméation tient lieu de référence et permet alors de connaître la perméabilité des films testés par ce biais (méthodes des capteurs). Cette méthode baptisée « micro test de perméation » nous permet donc de mesurer la perméabilité des films avec une petite quantité de matière.
- Pendant le régime transitoire, le coefficient de diffusion est calculé par la méthode du time lag.

#### **5.10 Le coefficient de solubilité d'oxygène à l'état sec**

Cette expérience nécessite de connaître précisément la densité à l'état sec des échantillons. Cette mesure est réalisée logiquement suite à une mesure de densité sèche à l'Argon (voir ci-dessus 5.4), par sorption consécutive d'oxygène, la bonne connaissance de la valeur de la poussée d'Archimède étant primordiale.

La microbalance de sorption en mode statique est connectée sur le gaz dioxygène. Une séquence de purge de la ligne et de séchage de l'échantillon est programmée. Elle consiste en une mise sous vide puis une pression de 1000mbar d'O<sub>2</sub> sur toute la ligne. Cette action est répétée 20 fois. Ensuite l'échantillon est désorbé en dynamique (vide secondaire) (« OUTGAS ») pendant 1500 mn pour un séchage complet. A la fin de cette séquence, la masse sèche est enregistrée par la balance (set dry mass).

Une isotherme de sorption à l'oxygène est programmée avec les paramètres suivants : T<sub>min</sub> = 5 mn ; T<sub>max</sub> = 30mn ; Mode = F1 ; phase=0.95 ; convergence = 0.98 ; Regulation = ON

Les incréments de sorption choisis sont les suivants : 500 ; 1000 ; 2000 ; 3000 ; 4000 ; 5000 ; 6000 ; 7000 ; 8000 ; 9000 ; 10000 mbar. Cette isotherme est répétée 8 fois.

Le logiciel trace ensuite l'isotherme de sorption selon la relation suivante : % mass = f (pression O<sub>2</sub> en mbar).

Des tentatives de mesures de solubilités à l'état hydraté ont été entreprises sans succès.

## Références :

- Beaugrand, J., Crônier, D. et al. (2004). "Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility." Journal of Cereal Science, **40**(3), 223-230.
- Dervilly, G.; Leclercq, C., et al. (2001). "Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt." Carbohydrate Polymère, (2), 143–149.
- Goring, D. A. I., and Timell, T. E. (1960). "Molecular properties of six 4-O-methylglucuronoxylans1." The Journal of Physical Chemistry, **64**(10), 1426-1430.
- Monties, B. (1984). "Dosage de la lignine insoluble en milieu acide : influence du prétraitement par hydrolyse acide sur la lignine Klason de bois et de paille." Agronomie, **4**(4), 387-392.
- Nieduszynski, I. A., & Marchessault, R. H. (1972). "Structure of  $\beta$ ,D(1 $\rightarrow$ 4')-xylan hydrate." Biopolymers, **11**(7), 1335-1344.
- Pastell, H., Tuomainen, P. et al. (2008). "Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted arabinoxylo-oligosaccharides with non-reducing end terminal branches." Carbohydrate Research, **343**(18), 3049-3057.
- Pénicaud, C. (2009). Thesis.
- Rharbi, Y., Yekta, A., et al. (1999). "A Method for Measuring Oxygen Diffusion and Oxygen Permeation in Polymer Films Based on Fluorescence Quenching." Analytical Chemistry, **71**(22), 5045-5053.
- Roohani, M., Habibi, Y., et al. (2008). "Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites." European Polymer Journal, **44**(8), 2489-2498.

## **Chapitre 1:**

Arabinoxylanes isolés à partir de son de blé désamidonné:  
fractionnement, caractérisation et propriétés après mise en œuvre sous  
forme de films.

## Résumé:

L'objectif de ce chapitre est d'isoler les arabinoxylanes (AX) à partir de son de blé désamidonné, de les fractionner puis de caractériser les fractions obtenues. Il s'agit d'étudier l'impact de leur composition et de leur structure sur certaines propriétés physico-chimiques des AX après mise en œuvre sous forme de films par casting pour cibler des applications en emballage alimentaire. L'objectif n'est pas de réaliser des films ayant les performances des films d'emballages mais de caractériser les propriétés physico-chimiques que cette ressource peut représenter en fonction des éléments de structure connue. Les analyses telles que la sorption d'eau, la morphologie cristalline, la perméabilité gazeuse (sonde O<sub>2</sub>), et la mobilité des chaînes sont retenues dans notre étude.

Après une extraction alcaline d'un lot constant de son de blé, les hémicelluloses ont été séparées en trois fractions en fonction de leur solubilité dans l'eau et dans l'éthanol 50% (v/v). Le rendement global d'extraction, évalué sur 11 extractions, est de 42% massique environ. Deux des fractions obtenues ont été purifiées afin d'éliminer les  $\beta$ -glucanes co-extraits.

L'analyse structurale des trois fractions d'AX indiquent que ces derniers présentent une gamme de rapports Ara/Xyl très large variant de 0,2 à 1,3, et qu'ils comportent divers types de substitutions (mono et disubstitution) en proportion variable. En fait, leur solubilité différenciée dans les deux milieux retenus (eau et eau/éthanol 50/50) permet un fractionnement selon le taux de décorations (arabinosyl), lui-même complexifié par le nombre d'arabinosyl porté par un même xylose : le taux de substitution global et la teneur en di-substitutions croissants avec la plus forte solubilité de la fraction.

Les rapports Ara/Xyl des 3 fractions retenues présentent une dispersion relativement large de 33 à 40 % près selon les fractions pour les 11 extractions effectuées en suivant le même protocole décrit dans le corps de ce chapitre. En revanche, au sein d'un même lot de 3

fractions (fractions issues d'une même extraction), la dispersion devient très étroite (1 à 1,6%). Comme l'extraction est effectuée à l'échelle du laboratoire (environ 10 grammes obtenus à chaque fois), ce travail de thèse a nécessité l'emploi de plusieurs lots de 3 fractions bien caractérisées (soit environ 1 lot par chapitre).

Les poids moléculaires moyens en masse ( $M_w$ ) varient de 152 000 à 218 000 Da selon les fractions testées : la fraction la plus soluble étant de plus forte masse. L'analyse révèle également la présence d'agrégats élués correspondant certainement à des AX liés à des polyphénols restants (le taux de lignine est évalué entre 0,8-2,0%). Le taux d'AX exclu de la colonne peut également être élevé, jusqu'à 36% selon les fractions). Les masses obtenues sont alors à la fois sous-évaluées (matériel non analysé car exclu de la colonne après la filtration) mais également surévaluées (agrégats) ce qui complexifie l'analyse globale.

En outre, la fraction de plus forte masse étant également la plus substituée, il est difficile de corrélérer directement la masse moléculaire mesurée avec la longueur de la chaîne principale (ou degré de polymérisation) ou avec d'autres propriétés (solubilité, propriétés physico-chimiques etc...). Cependant, un calcul théorique simple du degré de polymérisation prenant en compte le rapport Ara/Xyl pourrait être effectué à partir des masses moléculaires moyennes en nombre afin de quantifier les augmentations de masses induites théoriquement par les décorations. Cependant, ce calcul est délicat car il présente des limites relatives à celles de l'analyse SEC déjà énoncées (hémicelluloses exclues de la colonne et présence d'agrégats).

Les trois fractions ont ensuite été mises en œuvre sous forme de films lors d'un casting par voie aqueuse et haute température (95°C). Les films obtenus sont alors testés systématiquement et leurs propriétés discutées en fonction du rapport Ara/Xyl qui est retenu comme paramètre principal de caractérisation. Les aspects qualitatifs des films réalisés, la

morphologie cristalline des chaînes, leur mobilité par analyse diélectrique en fonction de leur teneur en eau sont étudiés.

En conclusion, la morphologie cristalline, la mobilité locale des chaînes et la sorption d'eau des films à base d'AX sont corrélées avec les taux de substitution des AX. Lorsque le taux d'Ara/Xyl diminue :

- le film devient semi-cristallin quand le taux de décorations diminue (0, 10% et 20% de taux de cristallinité respectivement pour les fractions WS-ES-AX, WS-EI-AX et WI-AX).
- la densité des films à l'état sec diminue de manière inattendue : la fraction la plus substituée (c'est-à-dire amorphe) étant la plus dense. Ceci s'expliquerait pour les autres fractions du fait du rejet en phase amorphe pendant la cristallisation des zones substituées de manière aléatoire, dont la conformation générerait une plus faible densité - un moins bon « packing » des macromolécules.
- la mobilité locale augmente: la température de relaxation beta relative aux phases amorphes varie de -19 à -61°C de WS-ES-AX la fraction la plus substituée à WI-AX, fraction la moins substituée) ce qui peut être attribué au réseau de liaison hydrogène modifié dans les phases amorphes.
- La teneur en eau diminue à haute humidité relative, en accord avec le degré de cristallinité qui limite le développement de l'hydratation.
- Le coefficient de perméabilité et de diffusivité d'oxygène diminuent avec l'augmentation du degré de cristallinité qui semble de ce fait contrôler le transport gazeux
- La solubilité de l'oxygène des fractions n'a pas pu être déterminée à l'état hydraté. Ceci est dû à la très faible solubilité de l'oxygène dans les films d'AX (teneur en eau >> teneur en oxygène). A l'état sec les valeurs restent également faibles,

égales à la moitié de celles publiées pour l'amidon. La présence de  $\beta$ -glucanes co-extraits modifie les propriétés des films d'AX.

**Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet de la publication :** Y. Zhang, L. Pitkänen, J. Douglade, M. Tenkanen, C. Rémond, C. Joly. 2011. Wheat bran arabinoxylans: chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydrate Polymers*. 86: 852-859.

## 1 Introduction

Wheat bran is an abundant industrial by-product generated during the milling operation, and represents an interesting biomass for further applications. Major constituents in wheat bran are non-starch polysaccharides (46%), starch (10-20%), proteins (15-22%) and lignin (4-8%) (Bergmans, Beldman, Gruppen & Voragen, 1996). AX which are classified as hemicelluloses, are the major non-starch polysaccharides in wheat bran (Bataillon, Mathaly, Nunes Cardinali & Duchiron, 1998). AX consist of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-linked D-xylopyranosyl residues decorated with  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)- and/or  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-linked L-arabinofuranosyl units. To a lesser extent, some xylopyranosyl residues are also substituted with a 4-*O*-methyl ether glucuronic acid (Brillouet, Joseleau, Utille & Lelievre, 1982). Furthermore, acetyl groups as well as hydroxycinnamoyl groups have been reported to be present in AX from graminaceous plants (Ring & Selvendran, 1980); (Nishimura, Ishihara, Ishii & Kato, 1998).  $\beta$ -Glucans, unbranched polysaccharides composed of D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4) and (1 $\rightarrow$ 3)-linked residues, are also part of non-starch polysaccharides (Henry, Martin & Blakeney, 1987).

The aim of this study is to investigate the AX properties and their potential for using as packaging films or coatings. As already discussed, AX are interesting macromolecule resources because their physico-chemical properties can be modified due to their intrinsic natural variability.

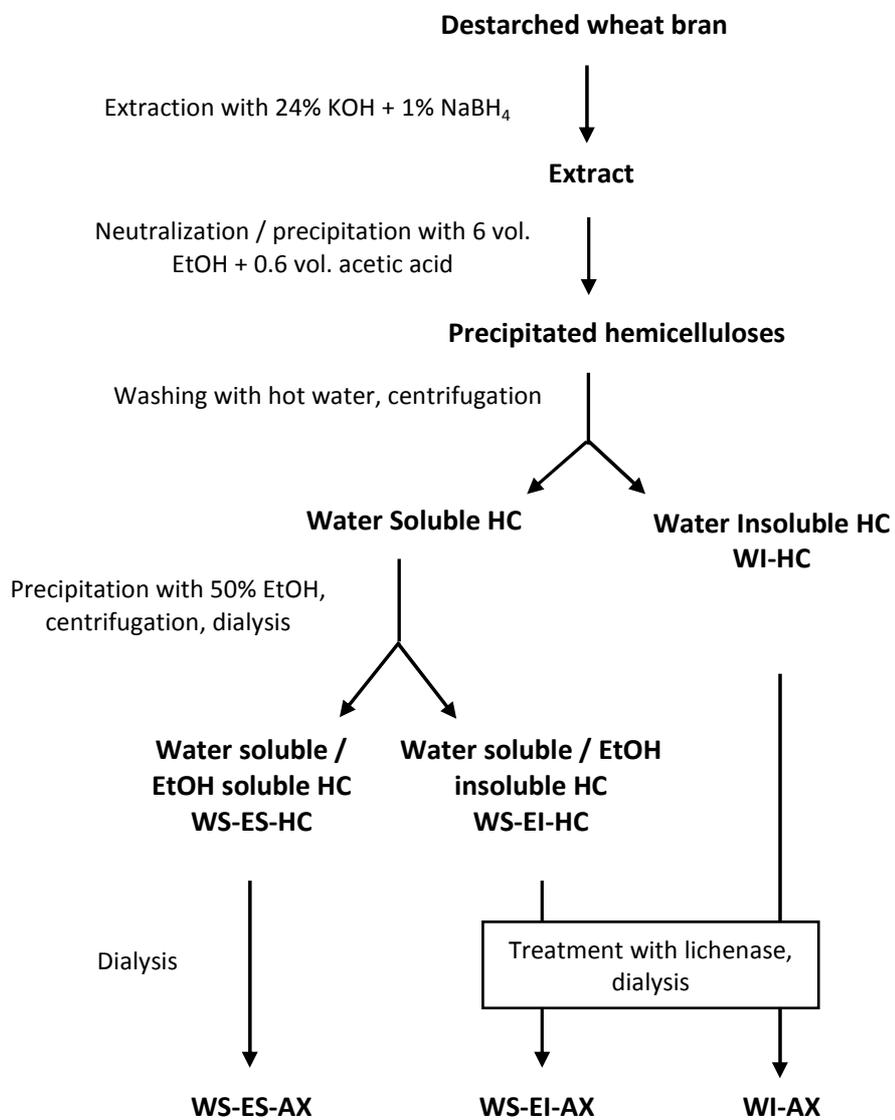
To investigate such promising potential, our study covers the extraction process of AX (laboratory scale), film formation by water casting and film characterization. In this context, the strategy developed is:

- i) to isolate various populations (fractions) of AX from destarched wheat bran by performing an alkali extraction followed by controlled precipitation steps in water or ethanol
- ii) to investigate their chemical composition and structural characteristics (substitution patterns, molecular weights)
- iii) to make films for each AX population by casting, and finally
- iv) to investigate film physico-chemical properties (X-ray measurements, water sorption, oxygen permeation properties, macromolecular mobility depending on the fraction characteristics and mainly as a function of their Ara/Xyl ratio.

## 2 Results and discussion

### 2.1 Isolation, fractionation and composition of HemiCelluloses (HC) and ArabinoXylans (AX)

The yields of HC and AX fractions are presented in Table 1 according to the extraction process illustrated in Figure 1. Three fractions were obtained by alkali-extraction of 60 g of destarched wheat bran and subsequent fractionation according to their solubility in water and in 50% ethanol (v/v). They are coded **WI-HC** (**W**ater **I**nsoluble), **WS-EI-HC** (**W**ater **S**oluble-**E**thanol **I**nsoluble) and **WS-ES-AX** (**W**ater **S**oluble-**E**thanol **S**oluble) thus giving a total of 10.2 g of hemicelluloses isolated from the total wheat bran. Two of these hemicellulosic fractions (**WI-HC**, **WS-EI-HC**) have been purified and then renamed **WI-AX** and **WS-EI-AX** (Figure 1).



**Figure 1:** Multi-step preparation of hemicellulose fractions from destarched wheat bran. HC, before lichenase treatment and arabinoxylan AX, after lichenase treatment.

Knowing that AX accounts for 40% of dry matter in the destarched wheat bran lot used in this study (Beaugrand, Crônier et al. 2004),  $41.6 \pm 4.9\%$  of the AX originally present were extracted by this process according to 11 performed extractions (Table 1). This yield appears to be low but it is known than xylan extraction yields are greatly affected by the plant species as well as the type of plant material, but also by the strength and nature of the alkali, as well as the extraction time and temperature. For example, Brillouet et al (Brillouet, Joseleau et al. 1982) obtained a xylan recovery of 13% with a sodium hydroxide-based extraction procedure from wheat bran.

|   | WI-HC | WS-EI-HC | WI-AX | WS-EI-AX | WS-ES-AX                          | Inter-fractions<br>yield<br>(WI+WS-EI+WS-<br>ES) |
|---|-------|----------|-------|----------|-----------------------------------|--|
| <b>Quantity<br/>(g) before<br/>purification</b> | 6.8   | 2.2      | -     | -        | 1.2                               | $12.0 \pm 1.0$                                   |
| <b>Quantity<br/>(g) after<br/>purification</b>  |       |          | 7.2   | 2.0      | -<br>(no<br>purification<br>step) | $10.1 \pm 1.2$                                   |
| <b>Yield<sup>b</sup> (%)</b>                    | 28.3  | 9.2      | 30.0  | 8.3      | 5.0                               | $41.6 \pm 4.9 \%$                                |

**Table 1.** Quantity, yield of HC and AX fractions.

<sup>a</sup>The values for inter-fractions of AX were calculated based on 11 extractions.

<sup>b</sup>related to the total Arabinoxylanes in wheat bran

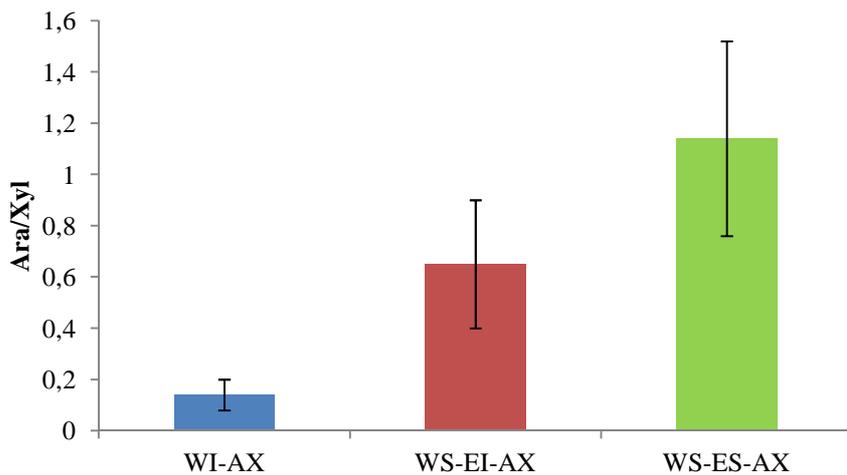
In order to get information about the reproductibility of our extraction-fractionation process, numerous extractions-fractionations have been performed from destarched wheat bran. For all the performed extractions, the xylose and arabinose contents are investigated by HPAEC analysis after acid hydrolysis. Results of Ara/Xyl ratio variations are presented in Table 2 and also shown in Figure 2. The “inter-fractions” results concern the Ara/Xyl ratios obtained from 11 extractions-fractionations whereas the “intra-fraction” results represent the composition analysis from triplicates for only one extraction. Among a same fraction (“intra-fraction” results), very minor Ara/Xyl ratios variations (from 0.9 to 1.6%) are observed indicating that the lyophilized fractions used for acid hydrolysis in order to study sugar

analysis were rather homogeneous and that the methodology (acid hydrolysis and HPAEC analysis) employed for analysis was robust. In the case of inter-fractions data (11 extractions/fractionations according to Figure 1), a larger dispersion of Ara/Xyl (33 to 40%) is obtained for each lot of the 3 collected fractions and especially for the water soluble fractions which could partially overlap (Figure 2). This high variability during extraction-fractionation of AX from wheat bran results from the important heterogeneity of xylans in this raw material. This result is important: all the next analysis has to be investigated on the very same lot of three collected fractions provided from one specific extraction. As this process is made at the laboratory scale (around 10 grams of hemicelluloses - the cumulated weight of the 3 fractions obtained for each extraction), this imply several lots of fractions for all the following work (around one lot for each chapter of this PhD work).

|                 | <b>Inter-fractions<sup>a</sup></b> |  | <b>Intra-fraction</b> |  |
|-----------------|------------------------------------|--|-----------------------|--|
|                 | Ara/Xyl                            | Standard variation<br>(relative error) | Ara/Xyl               | Standard variation<br>(relative error) |
| <b>WI-AX</b>    | 0.15                               | 0.06 (40%)                             | 0.20                  | 0.003 (1.5%)                           |
| <b>WS-EI-AX</b> | 0.65                               | 0.25 (38%)                             | 0.80                  | 0.007 (0,9%)                           |
| <b>WS-ES-AX</b> | 1.14                               | 0.38 (33%)                             | 1.30                  | 0.021 (1.6%)                           |

**Table 2:** The substitution degree variations of inter-fractions and intra-fractions of AX from wheat bran (the values were also presented in excel figure).

<sup>a</sup> The values were calculated from 11 extractions.



**Figure 2:** The variation of Ara/Xyl ratios of the 3 AX fractions calculated from 11 extractions. The WS-EI-AX and WS-ES-AX fractions present a partial overlapping.

The purity of HC and AX fractions is relatively high for all performed extractions-fractionations of AX from wheat bran. Results obtained for one typical extraction-fractionation are presented in this chapter. Carbohydrate content is between 72 and 87% of dry matter for the three fractions (Table 3). The alkali-isolation of xylans from seed endosperm and seed coats (bran) is generally described to be complicated as some others components (e.g. proteins, starch, glucans, phenolics) are co-extracted during the isolation procedure (Höije, Gröndahl et al. 2005).

|   | <b>WI-HC<br/>before<br/>purification</b> | <b>WI-AX<br/>after<br/>purification</b> | <b>WS-EI-HC<br/>before<br/>purification</b> | <b>WS-EI-AX<br/>after<br/>purification</b> | <b>WS-ES-AX</b> |
|---|--|---|---|--|-----------------|
| <b>% neutral<br/>sugars<sup>b,c</sup></b> | 78                                       | 83                                      | 84  | 87   | 72              |
| <b>% Ara<sup>b</sup></b>                  | 12                                       | 14                                      | 29  | 35   | 39              |
| <b>% Xyl<sup>b</sup></b>                  | 52                                       | 66                                      | 34  | 44   | 29              |
| <b>% Glc<sup>b</sup></b>                  | 13                                       | 2                                       | 18  | 6  | 2               |
| <b>% Gal<sup>b</sup></b>                  | 1  | 1                                       | 3   | 2  | 2               |
| <b>Ara/Xyl<sup>d</sup></b>                | 0.2                                      | 0.2                                     | 0.9   | 0.8  | 1.3             |
| <b>Glc/Xyl<sup>d</sup></b>                | 0.2                                      | 0.03                                    | 0.4   | 0.08                                       | 0.08            |
| <b>% GlucA<sup>b</sup></b>                | -  | 1.9                                     | -   | 2.1  | 1.9             |
| <b>% MeGluA<sup>b</sup></b>               |  | -                                       |   | 2.1  | 2.6             |
| <b>% GalA<sup>b</sup></b>                 |  | 1.1                                     |   | 1.6  | 1.0             |
| <b>% Protein<sup>b</sup></b>              | 1.4                                      | 10.8                                    | 1.3   | 11.8                                       | 5.6             |
| <b>% Lignin<sup>b</sup></b>               | 0.8                                      | -                                       | 1.2   | -  | 2.0             |

**Table 3.** Typical composition of HC and AX fractions. The purification step is related to the lichenase and  $\beta$ -glucosidase treatment to remove the glucose.

<sup>a</sup> % from wheat bran

<sup>b</sup> % related to dry matter

<sup>c</sup> % corresponding to the sum of Ara+Xyl+Glc+Gal

<sup>d</sup> % expressed in mole ratios

Hemicellulose isolated from wheat bran mainly consists of arabinoxylans as demonstrated by the high content of xylose and arabinose in the WI-HC, WS-EI-HC and WS-ES-AX fractions which contain respectively 64%, 63% and 68% of (Xyl + Ara). As the wheat bran used for this study was destarched, glucose, mainly present in WI-HC and WS-EI-HC, could be present as  $\beta$ -glucans. A lichenase and  $\beta$ -glucosidase treatment has been thus performed in order to purify the HC fractions. The glucose content is reduced in both these fractions from 13% to 2% for the WI fraction and from 18% to 6% in the WS-EI one. WS-ES-AX has a very low amount of glucose (1.3%), as a result this fraction is not treated by

lichenase. Sugar analysis indicates that the amount of uronic acids is very low in all AX fractions less than 2.6% (Table 3). Substitution along the main chains is one factor reported to improve the solubility of xylans in water (Andrewartha, Phillip et al. 1979). The different steps of our extraction procedure, based on solubility properties in water and in ethanol-water (50/50), lead to the isolation of three HC fractions and further AX populations with increasing Ara/Xyl ratio from WI-AX (A/X=0.2), to WS-EI-AX (0.8) to WS-ES-AX (1.3).

The protein content of AX fractions from wheat bran is presented in Table 3. The protein content is rather low before the lichenase and  $\beta$ -glucosidase treatment (from about 1.4 to 5.6 %). Destarched wheat bran has been reported to contain between 10 and 18% protein depending on the wheat species (Beaugrand, Crônier et al. 2004). In our study, the protein contents increase almost ten-fold (around 10-12%) after treating the WI-AX and WS-EI-AX fractions by lichenase and  $\beta$ -glucosidase. This indicates that the enzyme treatments lead to concomitant sample contamination with proteins, and consequently to a slightly higher yield for the WI-fraction (Table 3).

The Klason lignin content has been determined for the three HC fractions before lichenase treatment (Table 3). Lignin content is shown to be less than 2% for all three HC fractions. It is important to note that the destarched wheat bran used in our study was poorly lignified as the lignin content had been estimated to be less than 5% of dry matter in a previous study (data not shown).

## **2.2 Analysis of the substitution patterns of AX**

### **2.2.1 Hydrolysis of AX with an endo- $\beta$ -1,4-xylanase**

The AX fractions have been hydrolyzed with an endoxylanase (Shearzyme, glycoside hydrolase family 10 enzyme) and the obtained oligosaccharide profiles have been analyzed for further information on the structural differences between the isolated AX fractions. The

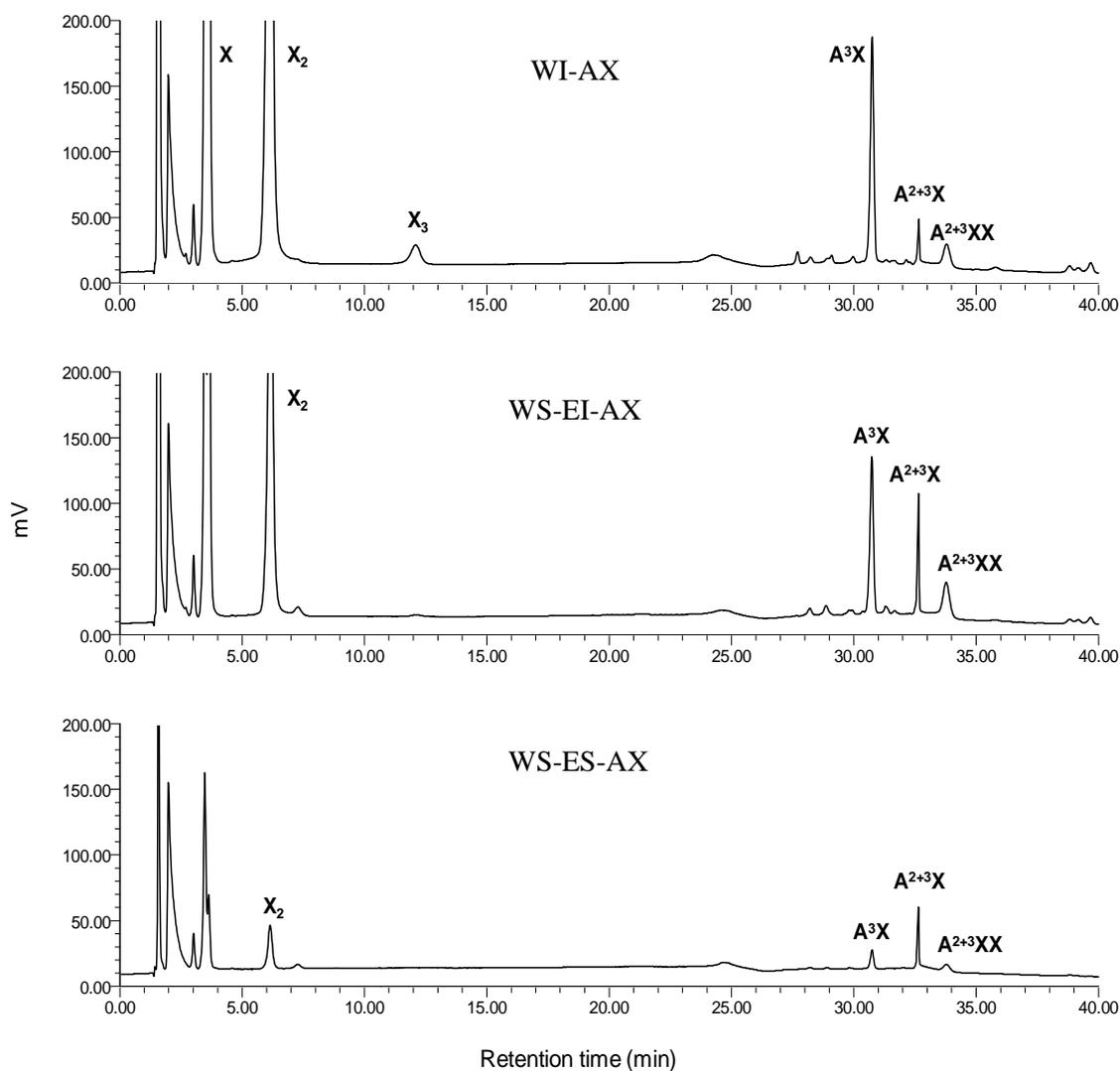
identification of arabinoxylo-oligosaccharides (AXOS) after Shearzyme hydrolysis of wheat arabinoxylans was recently reported by Pastell et al. (Pastell, Virkki et al. 2009) and standard AXOS used are listed in the Table 4. All three AX fractions result in similar AXOS profiles but with varying proportions (Figure 3). The main oligosaccharide peak in all hydrolyzates is xylobiose ( $X^2$ ). The next peak in the HPAEC-PAD chromatograms at 30.7 min is identified as  $A^3X$ . This confirms that the main substituent in WI-AX is a (1→3) linked  $\alpha$ -L-Araf. The amount (peak height) of  $A^3X$  is clearly lower in the WS-EI-AX and WS-ES-AX hydrolyzates, respectively. The amounts of disubstituted  $\beta$ -D-Xylp  $A^{2+3}X$  (retention time 32.6 min) and  $A^{2+3}XX$  (retention time 33.8 min) increase respectively from the water insoluble WI-AX to the water-soluble WS-EI-AX and WS-ES-AX, indicating an increased amount of disubstituted  $\beta$ -D-Xylp in the water-soluble AX fractions. The different AXOS peaks are not quantified in this study. According to Pastell (Pastell, 2010), the response factors of  $A^{2+3}X$  and  $A^{2+3}XX$  are 70% and 50% of that of  $A^3X$  respectively. It could thus be estimated that the amount of mono- and di-substituted AXOS in the WS-EI-AX hydrolysate is about equal.

Moreover, the degree of hydrolysis of the AX fractions clearly decreases with increasing Ara/Xyl ratio as seen by the decrease of the xylobiose ( $X^2$ ) peak in the chromatograms. Even though Shearzyme is not able to hydrolyze the most densely substituted AX, the AXOS profile is previously found to closely reflect the structural differences in AX as analyzed by NMR spectroscopy (Pastell, Virkki et al. 2009).

| Abbreviation of AXOS | Structures   |
|----------------------|--|
| $X^2$                | $X-X$  |
| $A^3X$               | $\begin{array}{c} A \\   \\ X-X \end{array}$                   |
| $A^{2+3}X$           | $\begin{array}{c} A \quad A \\   \quad / \\ X-X \end{array}$   |
| $A^{2+3}XX$          | $\begin{array}{c} A \quad A \\   \quad / \\ X-X-X \end{array}$ |

**Table 4:** The Arabino-xylo-oligosaccharides structures.

A: Arabinose X: Xylose



**Figure 3:** HPAED-PAD chromatograms of the three AX endoxylanase hydrolysates.

In order to estimate the performance of xylanase action on the three AX fractions and to evaluate the representativeness of the AXOS liberated by the xylanase from AX, a determination of the hydrolytic efficiency of Shearzyme xylanase has been carried out. Generally, the GH10 xylanase is more efficient on short xylo-oligosaccharides rather than on polymeric xylans (Beaugrand, Chambat et al. 2004). The hydrolytic action of Shearzyme xylanase is analyzed by quantifying the reducing sugar contents for all the three enzymatically hydrolysed fractions. The released reducing sugars are quantified by DNS assay, and xylose, xylobiose and xylotriose amounts are determined by using HPAEC-PAD. The percentages of “long-chain” oligosaccharides (degree of polymerization > 3) are calculated by subtracting the contributions of xylose, xylobiose and xylotriose.

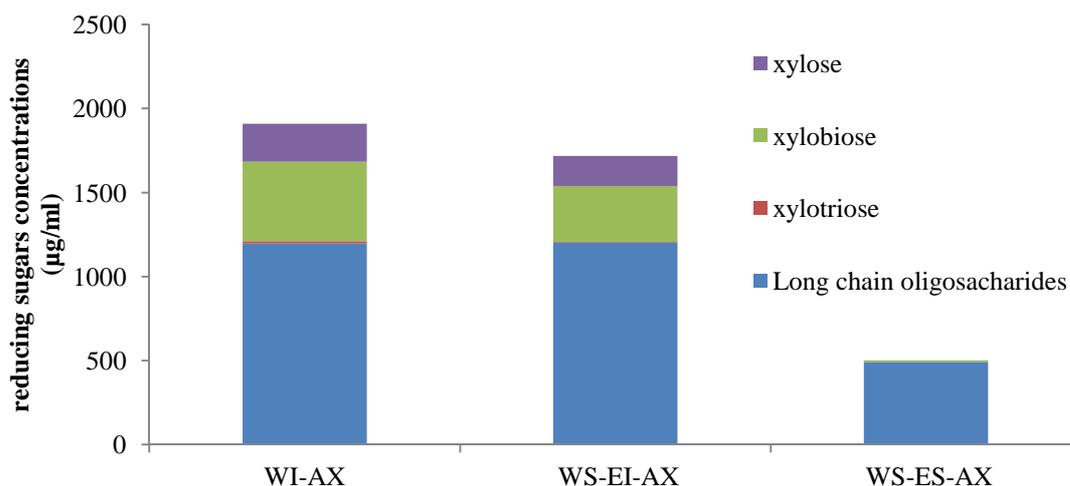
The Figure 4 shows the concentrations of reducing sugars released by Shearzyme from the three AX fractions and the contributions of the different oligosaccharides compared to the total amounts of reducing sugars. The highest reducing sugar concentration is 1929 mg/mL for the WI-AX fraction. The concentration decreases to nearly 11% for the WS-EI-AX fraction, whereas the lowest reducing sugar amount is found for the WS-ES-AX fraction (75% lower than WI-AX). The long chain oligosaccharides in the hydrolysates account for 60%, 70% and 98% in total reducing sugars for WI-AX, WS-EI-AX and WS-ES-AX fractions respectively. A small amount of xylotriose is obtained in WI-AX fraction whereas it is not detected in the two other fractions. Xylobiose represent 24% and 19% of reducing sugars in the hydrolysates of WI-AX and WS-EI-AX. Xylose contents represent 12% and 10% of reducing sugars for WI-AX and WS-EI-AX. The theoretical reducing sugars contents could be calculated based on monomeric xylose concentration in hydrolysates. The values are presented in Table 5 and shown a range from 3103  $\mu\text{g/mL}$  for WI-AX fraction to 1557  $\mu\text{g/mL}$  for WS-ES-AX fraction. By comparing to the reducing sugar contents determined, the hydrolytic yield could be obtained and also included in Table 5. The highest yield of 79% is

found for the intermediate fraction WS-EI-AX. A slight lower yield of 62% is observed for WI-AX fraction even though the xylanase acts better on less substituted AX. The WS-ES-AX fraction has the least yield around 32%.

| <b>Samples</b>  | <b>Theoretical reducing sugar content (µg/mL)</b> | <b>Reducing sugars content determine (µg/mL)</b> | <b>Hydrolytic yield</b> |
|-----------------|---|--|-------------------------|
| <b>WI-AX</b>    | 3103  | 1929   | 62%                     |
| <b>WS-EI-AX</b> | 2167  | 1719   | 79%                     |
| <b>WS-ES-AX</b> | 1557  | 501  | 32%                     |

**Table 5:** Reducing sugar contents and hydrolytic yield.

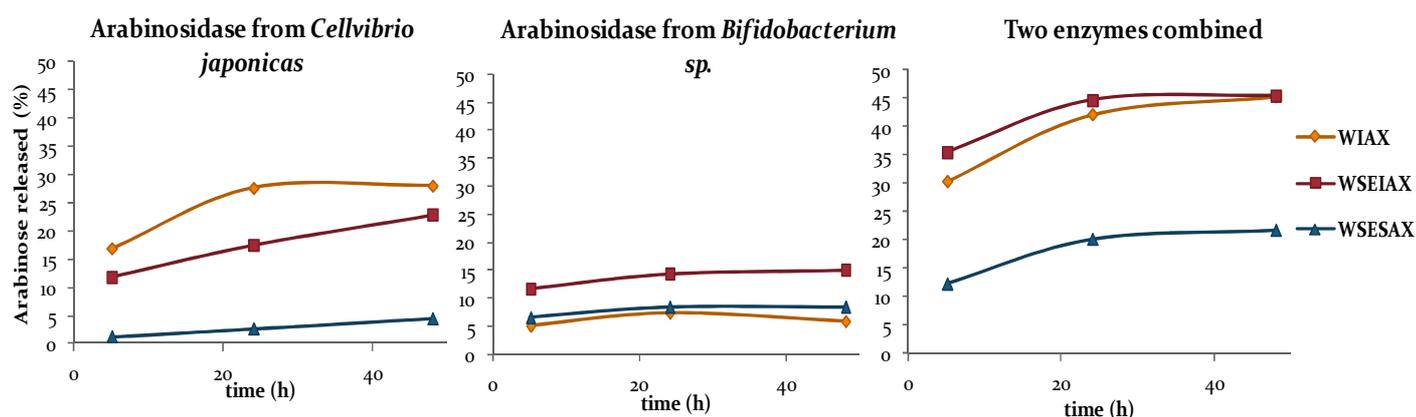
The results indicate that the reducing sugars concentrations decrease with increasing substitution level by arabinose, while reducing sugars content is important when long chain xylo-oligosaccharides are present in the hydrolysates. These results suggest that the xylanase is more efficient on AX with a ratio Ara/Xyl less than 1.3 (ratio Ara/Xyl of WS-ES-AX). The slight lower hydrolytic yield appears for WI-AX than WS-EI-AX indicating lower solubility of water insoluble fraction in aqueous solution, whereas the least yield for WS-ES-AX was related to its highly substituted structure. As analysis of hydrolysates by HPAEC-PAD chromatography indicates that the fraction WS-ES-AX contains a large proportion of di-substituted  $\beta$ -D xylp residues by arabinosyl groups. Presence of these di-substitutions in the hydrolysates seems to indicate that the xylanase could act near the di-substituted xylosyl residues into the xylan chains.



**Figure 4:** Concentrations of reducing sugars and contributions of the different oligosaccharides in hydrolysates obtained from AX fractions after xylanase treatment

### 2.2.2 Hydrolysis of AX by $\alpha$ -L-arabinofuranosidases

In order to get further information concerning the structure of the three AX fractions, treatments with different arabinosidases have been applied on these AX. The arabinosidase from *Cellvibrio japonica* is active on (1→2) and (1→3) linkages on mono-substituted xylose whereas the arabinosidase from *Bifidobacterium* is active on (1→2) and (1→3) linkages on mono-substituted xylose as well as on di-substituted xylose. The amounts of arabinose released were measured after 5, 24 and 48h. The results are presented in Figure 5.



**Figure 5:** Arabinose released from arabinoxylans fractions by different arabinosidases.

The substitution pattern of AX from wheat bran was analyzed by xylanase hydrolysis and showed that AX from wheat bran contained (1→3) linked  $\alpha$ -L-Araf and (1→2) + (1→3)

linked  $\alpha$ -L-Araf substituents. The amounts of di-substituted  $\beta$ -D-Xylp increase with increasing Ara/Xyl ratios. The main linkages between arabinosyl and xylosyl residues in water insoluble fraction (WI-AX) are (1 $\rightarrow$ 3) linkages. The most substituted fraction (WS-ES-AX) contains more di-substituted  $\beta$ -D-Xylp than mono substituted. The amounts of mono and di-substitutions are about equal in water soluble and ethanol insoluble fractions (WS-EI-AX).

The results indicate that arabinosidase from *Cellvibrio japonicas* has highest hydrolysis capacity on water insoluble fraction (WI-AX) as 28% of arabinose is released after 48 h. The hydrolysis capacity of arabinosidase from *Cellvibrio japonicas* on arabinoxylan fractions from wheat bran is decreased with increasing Ara/Xyl ratio, and the lowest amount of arabinose is released from the WS-ES-AX fraction (4.5%).

The arabinosidase from *Bifidobacterium sp.*, known to be able to release the arabinose from double substituted  $\beta$ -D-Xylp (van den Broek, Lloyd et al. 2005), shows a higher efficiency for the most substituted fraction (WS-ES-AX). The amounts of arabinose release from WS-ES-AX by arabinosidase from *Bifidobacterium sp.* is 2 times higher than by arabinosidase from *Cellvibrio japonicas*. As water insoluble fraction of wheat bran contains very low amount of di-substituted  $\beta$ -D-Xylp, there is only 5.9% arabinose released by arabinosidase from *Bifidobacterium sp.* after 48h of reaction, and the highest amount of arabinose is released from WS-EI-AX fraction (15.1%).

The arabinosidase treatment has been also carried out with the combination of both arabinosidases. Interestingly, much higher amounts of arabinose are released from these three fractions by the combination of both arabinosidases than by the individual arabinosidase alone. This synergism allows releasing 45% of arabinose from WI-AX and WS-EI-AX fractions after 48h of reaction. The synergism occurs to a lesser extent in case of the most substituted fraction (WS-ES-AX) as only 21.8% arabinose is released after 48h.

## 2.3 HPSEC analysis of AX

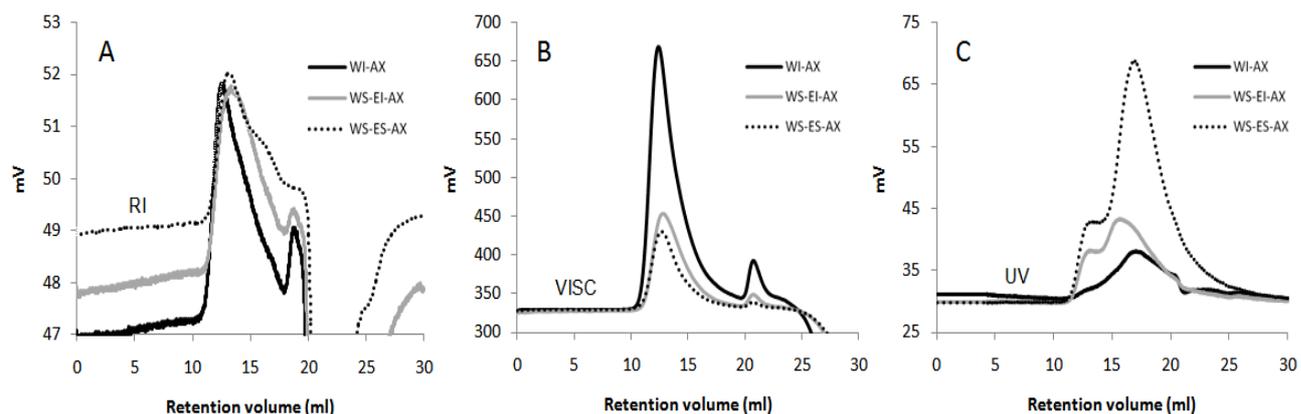
### 2.3.1 HPSEC analysis in DMSO solution

The HPSEC analysis of the purified AX fractions have been performed in DMSO which was recently shown to be a better solvent (and eluent) for cereal AX than an aqueous salt solution (Pitkanen, Virkki et al. 2009). As indicated by the RI and viscosity signals (Figure 6), the three AX fractions are eluted at the same position. The overlay chromatogram of the viscosity signals, however, reveal the differences in intrinsic viscosities seen as varying signal intensities (Figure 6B). The determined average values for intrinsic viscosity supports this conclusion (Table 6). The  $[\eta]$  for WI-AX is the highest whereas the WS-ES-AX fraction presents the lowest  $[\eta]$ . Generally, the intrinsic viscosity of linear polymers increases with increasing molar mass but in this case the molar mass for WS-ES-AX with the lowest  $[\eta]$  is higher in comparison with WI-AX and WS-EI-AX (Table 6). Thus, the molecular density of the WS-ES-AX sample seems to be higher in respect to the other two samples.

| Sample   | $M_w$<br>(g/mol) | $M_n$   | $M_w/M_n$ | $[\eta]$<br>(dl/g) | $R_h$<br>(nm) | $L_p$<br>(nm) | Recovery/Exclusion<br>(%) |
|----------|------------------|---------|-----------|--------------------|---------------|---------------|---------------------------|
| WI-AX    | 166 000          | 129 000 | 1.30      | 2,40               | 18            | 2.4           | 67/33                     |
| WS-EI-AX | 152 000          | 86 000  | 1.77      | 1,22               | 14            | 2.1           | 64/36                     |
| WS-ES-AX | 218 000          | 163 000 | 1.34      | 1,16               | 15            | 3.0           | 97/3                      |

**Table 6:** HPSEC analysis of AX in DMSO solution

$M_w$  = weight average molar mass,  $[\eta]$  = intrinsic viscosity,  $R_h$  = hydrodynamic radius,  $L_p$  = persistence length,  $R_h$  has been determined with LS/viscometry method.



**Figure 6:** HPSEC chromatograms of three AX fractions (A: RI signals; B: viscosity signals; C: UV signals).

Slight UV signals are detected in all samples, but the peak apexes exist at higher elution volumes than the viscosity peaks containing the majority of the polymeric material (Figure 6C). Although the signal intensities were low, the amount of UV absorbing material is clearly different in each fraction. The UV signal is the highest for WS-ES-AX, and could originate from lignin which is soluble in DMSO. The Klason lignin content is slightly higher for WS-ES-AX than for WI-AX and WS-EI-AX (Table 3).

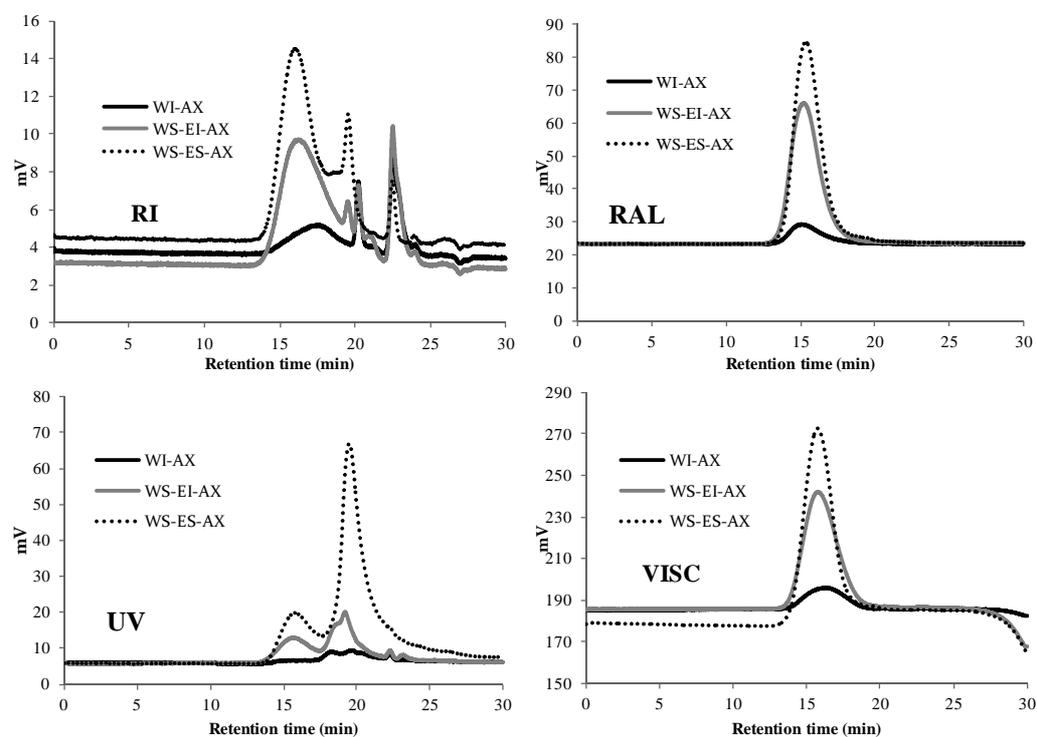
The average molecular weights of eluted samples vary from 152 000 to 218 000 g/mol for the studied fractions or from 86000 to 163 000 for the number-average molecular weight  $M_n$ . Meanwhile, a molecular weights increase do not reflect necessary an increase in the degree of polymerisation as the arabinosyl substituent contribute to a molecular weight increase which could be potentially quantified by the Ara/Xyl ratio. For example, the degree of polymerization ( $D_p$ ) could be estimated taking into account the average percentages of arabinose and the molecular weight ( $M_n$ ). Meanwhile, these calculations are certainly speculative as the number-average molecular weights are very dependent on the previously cited parameters as the recovery percentages and the aggregates presence. Moreover, the calculations are not very well correlated to the expected increase of the molecular mass induced by the Ara/xyl ratios.

According to viscosity detection, the WS-ES-AX sample is more compact than the WI-AX and WS-EI-AX ones, and the possibility of aggregation cannot be excluded. The phenolic compounds might cross-link the shorter AX chains to form assemblies (WS-ES-AX showed the strongest UV signal, Figure 6C). As indicated by the monosaccharide composition analysis, the Ara/Xyl ratio of WS-ES-AX is as high as 1.3 but this high arabinose content cannot, in itself, explain the low intrinsic viscosity value or the possible aggregation. In fact, a slight increase in intrinsic viscosity values have been discovered with increasing arabinose-to-xylose ratios in the case of water-soluble, deesterified wheat arabinoxylans (Dervilly, Saulnier et al. 2000). The persistence length values ( $L_p$ ), which describe the rigidity of a polymer, are determined for each AX sample in order to compare their chain stiffness. The  $L_p$  value of WS-ES-AX fraction is above the value expected for AX in a good solvent (1.8-2.3 nm) (Pitkanen, Virkki et al. 2009). High  $L_p$  values for  $\beta$ -glucan samples containing aggregates were presented in a recent publication (Li, Cui et al. 2011). Thus, high  $L_p$  values of WS-ES-AX might reflect the presence of aggregates in this fraction.

### 2.3.2 HPSEC analysis in aqueous solution

In order to complete the HPSEC analysis performed in DMSO solvent, the analysis in aqueous solution has been also carried out. The objective of this study is to obtain additional results concerning the conformation of AX in aqueous solution as the films are casted from aqueous solution. The samples have been dissolved in 0.1M NaNO<sub>3</sub> solution. The recovery range from 23% for the water insoluble fraction to almost 100% for the water-ethanol soluble fraction. According to the RI and RALS detector signals, the two water soluble AX fractions are eluted at the same time and the water insoluble fraction is eluted with nearly one-minute delay (Figure 7). The average molecular mass increase from WI-AX fraction to WS-ES-AX fraction ranging from 112 000 g/mol to 228 000 g/mol (Table 7) (against 166 000 to 218 000 in DMSO g/mol). Since the recovery of water insoluble fraction is very low, the molar mass

obtained in water system is just representative of a small proportion of the polymeric material (23%), so the value could be underestimated and thus significantly lower than in DMSO system ( $M_w = 166\ 000$  g/mol). The molar mass for the two water soluble fractions are higher in aqueous system especially for WS-EI-AX compared to the values obtained in DMSO system. The intrinsic viscosity increases with molar mass ranging between 0.68 dl/g for the WI-AX fraction and 1.09 dl/g for the WS-ES-AX fraction respectively. The intrinsic viscosity for the WI-AX fraction is less reliable because of very low yield obtained in aqueous solution.



**Figure 7:** HPSEC chromatograms of three AX fractions in aqueous solution.

| Sample   | $M_w$ (g/mol) | $M_n$  | $M_w/M_n$ | $[\eta]$ (dl/g) | $R_h$ (nm) | Recovery (%) |
|----------|---------------|--------|-----------|-----------------|------------|--------------|
| WI-AX    | 112 000       | 12 000 | 8.6       | 0.68            | 8.6        | 23           |
| WS-EI-AX | 223 000       | 37 000 | 6.0       | 0.88            | 12.6       | 88           |
| WS-ES-AX | 228 000       | 54 000 | 4.2       | 1.09            | 14.4       | 100          |

**Table 7:** HPSEC analysis of AX in aqueous solution.

$M_w$ : weight average molar mass;  $M_n$ : number average molar mass;  $[\eta]$ : intrinsic viscosity;  $R_h$ : hydrodynamic radius

Ultraviolet detector is used for all samples to detect the presence of impurities such as protein and lignin. The peak intensity is higher for the WS-ES-AX fraction indicating a larger amount of detected impurities. The composition analysis shows that the klason lignin content is slightly higher in WS-ES-AX (2%) than in WI-AX (0.8%) and WS-EI-AX (1.2%). The short polymer chain might be cross-linked with the phenolic compounds to form assemblies. The main peaks obtained by UV detector (around 15 min) are shifted with the main peaks detected by RI and RALs. This phenomenon reveals that the aggregates might be eluted after the main material AX which was also observed in DMSO system.

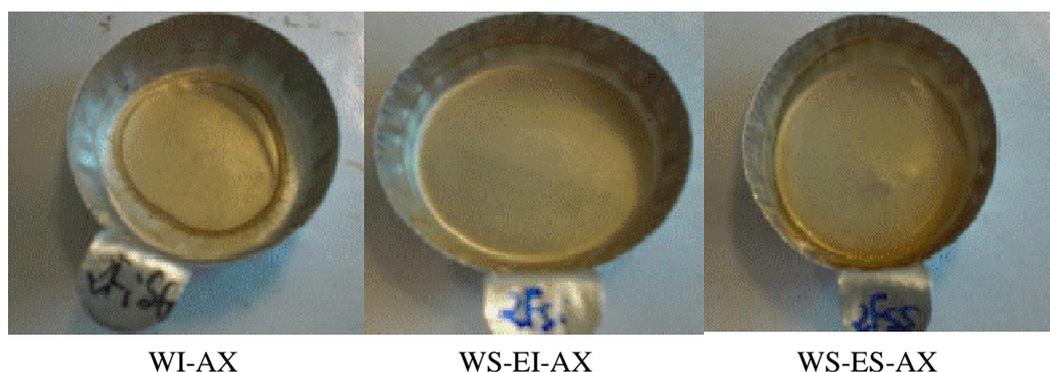
The polydispersity for AX is high in aqueous solution than in DMSO eluent. The highest value (8.6) is found for the water insoluble fraction whereas the WS-ES-AX fraction has a polydispersity index equal to 4.2. In DMSO system, the values are below 1.77 for all the fractions.

The obtained results are similar to those described by (Pitkanen, Virkki et al. 2009), which showed that DMSO was a better solvent than water to dissolve the AX, especially in the case of some less substituted AX.

HPSEC results reveal that as aggregation phenomenon occurred and can be caused by the phenolic compounds presence. This phenomenon gives rise to an overestimated molar mass with a decreasing trend of intrinsic viscosity. Moreover, the recovery values reflect that up to 30% materials are excluded due to their solubility in the DMSO used as eluent. However, as indicated in the above paragraph, the DMSO based eluent seems to be a better solvent to dissolve the poorly substituted AX. The recovery for WI-AX increase from 23% in aqueous solution to 67% in DMSO solution. In the case of water soluble fractions, the recovery values in DMSO based eluent are not as high as in aqueous eluent, but the better dissolution of AX in DMSO could be also confirmed by decreasing of the aggregation tendency.

## 2.4 Film properties of HC and AX

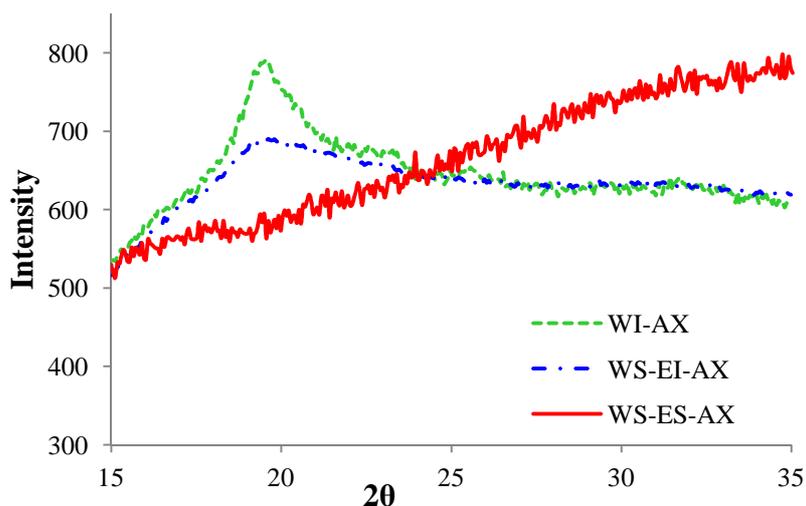
Films are made both from the HC and AX fractions using the water casting method. As WI-HC and WI-AX fractions are not soluble in water at 60°C (see the fractionation process), 1h at 95 °C under mixing is necessary to cast all films with the same methodology. Films from both HC and AX fractions form homogeneous suspensions which, upon drying, lead to qualitatively similar homogeneous and transparent films. The films from WI-AX and WI-HC shrunk greatly during formation, and typical thicknesses are around 50 µm for the WI film and 35 µm for the WS-EI and WS-ES-AX films. The WS-ES-AX film is light yellow, whereas the others almost colorless (Figure 8). This coloration is probably due to the higher lignin content of WS-ES-AX (Table 3).



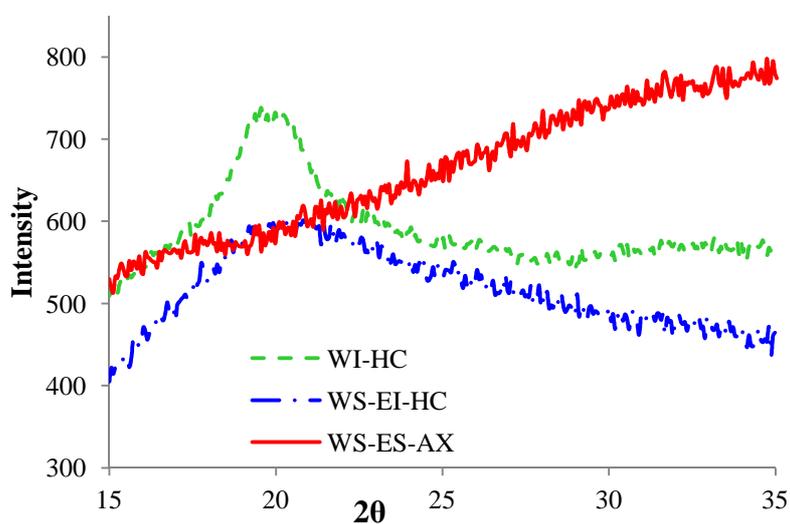
**Figure 8:** AX based films photos

### 2.4.1 X-ray analysis

Figure 9 shows the X-ray diffractograms of the films from various fractions in order to qualitatively study their respective crystalline morphology before and after  $\beta$ -glucan removal. The WS-ES-AX films are obviously amorphous without any crystallinity peak (Figure 9). The WI-HC and WS-EI-HC films (Figure 9B) and the corresponding WI-AX and WS-EI-AX (Figure 9A) have clear diffraction peaks between 17 and 23 degrees (in 2 theta). The WI-AX fraction has higher peak intensity, indicating a higher level of organization compared to the WS-EI-AX fraction (Figure 9A).



A



B

**Figure 9:** X-ray diffractograms of films. (A) WI-AX; WS-EI-AX and WS-ES-AX. (B) WI-HC; WS-EI-HC and WS-ES-AX.

The substitution pattern of AX influences the film morphology as substitutions can act as structural defects preventing macromolecule crystallization (Sternemalm, Höije et al. 2008). Consequently, unsubstituted regions along the xylan chains promote crystallization (Dervilly-Pinel, Tran et al. 2004). In our study, the crystallinity peak (presence and intensity) is well correlated to the Ara/Xyl ratio as well as the qualitative observation of film shrinkage

during drying (WI-AX films: Ara/Xyl = 0.23) because of reorganization of this weakly substituted xylan fraction.

Figure 9 also compares the X-ray results for the films before and after lichenase treatment. After treatment, the peaks are sharper, especially for the WI-AX fractions. It seems that the degree of order is higher for the purified xylans. In case of the HC fractions, the interactions in such polymer blends ( $\beta$ -glucan/AX) are strong enough not to be fractionated during the extraction process and to disturb the level of AX macromolecules organization.

#### **2.4.2 Film density measurement in dry environment**

The density of the AX films made from the three fractions isolated from wheat bran have been measured in dry environment. The results are shown in Table 8. The density of AX films range from 1.43 to 1.50 increasing systematically from the poorly substituted fraction to the highly substituted fraction. The density of film accounts for the crystalline region and the amorphous region. The results in the previous paragraph showed that the crystallinity degrees decrease from the poorly substituted fraction to the highly substituted one. Generally, the more crystalline region has a higher density. In our study, the most crystalline fraction has surprisingly the lowest density, and the complete amorphous one has the highest density. This result indicates that the amorphous regions of poorly substituted AX chain are much less dense by comparing to that of the most substituted fraction. This phenomenon could be attributed to more numerous intermolecular hydrogen bonds provided by large amounts of pendant groups which result in higher segmental density in amorphous part of AX chain. Kusuma et al. (Kusuma, Freeman et al. 2009) found also that the presence of side chain could be able to reduce fractional free volume by forming hydrogen bonds.

| Samples  | Density (g/cm <sup>3</sup> ) |
|----------|------------------------------|
| WI-AX    | 1.43 ± 0.01                  |
| WS-EI-AX | 1.46 ± 0.02                  |
| WS-ES-AX | 1.50 ± 0.02                  |

**Table 8:** The AX films density in dry environment (the values were calculated from 8 measurements)

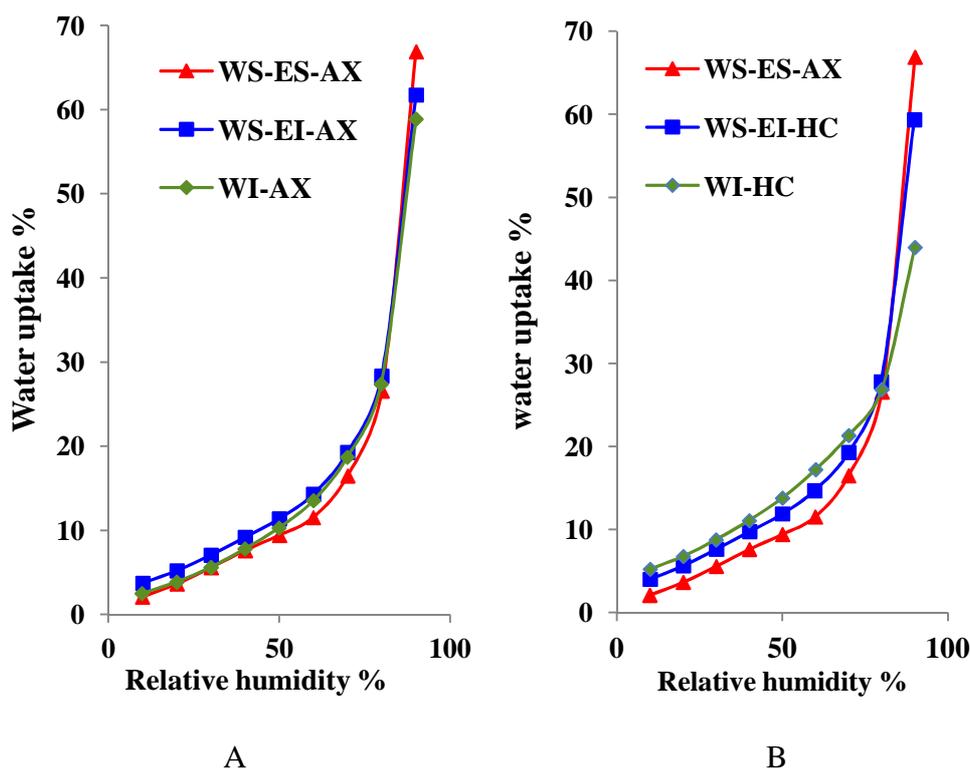
### 2.4.3 Water sorption properties

The water sorption isotherms of the films from the AX fractions are presented in Figure 10A. The relative humidity (RH) scale can be divided in two areas: below 80% where the water molecules are bound by the water AX sorption sites and over 80% where a noticeable increase of water sorption occurs. Below 80% RH, the water content differences are not very large between the samples. Moreover, the curves are not homothetic. This property indicates that the sorption sites on AX chains are not equivalently distributed or available along the macromolecules for the water molecules. This behavior has already been reported by Sternemalm et al. (Sternemalm, Höjje et al. 2008). The difference is not very large and the authors explained that this behavior might be due to interactions between water and hydroxyl groups of unsubstituted units which are not involved in crystalline regions. Over 80% RH, the water uptake increase for all the samples due to film swelling by water, and the differences between the samples are well correlated with their degree of substitution, the WS-ES-AX films having the highest water content whereas the WI-AX shows the lowest one. Water attempts to enter the macromolecular network as in the water sorption process at high RH, but the network achieved by crystallization for the low branched samples prevents the films from swelling by water molecules.

Previous studies (Höjje, Sternemalm et al. 2008; Sternemalm, Höjje et al. 2008) have reported the same trend with AX hydration: at high relative humidity, the highly substituted samples showed a higher water uptake than the samples that were enzymatically debranched

with an  $\alpha$ -arabinosidase treatment. In comparison with our results, Höije et al. (Höije, Sternemalm et al. 2008) found that the water content of their film was around 41% at 98% RH for AX with an Ara/Xyl ratio of 0.20 against 58% at 90% RH for our WI-AX with an Ara/Xyl ratio of 0.23. This variation could be due to measurement methodology or to a difference in the AX structure (i.e. different substitution patterns between enzymatically treated samples (Höije, Sternemalm et al. 2008) and native samples (this study)).

The elimination of  $\beta$ -glucans significantly modified the water sorption of WI-HC, as compared to the WS-ES-AX sample which had not been purified by lichenase (Figure 10B). In fact, for WI-AX, the water content decrease at low RH and increase significantly at high RH. The higher water sorption in the case of purified AX could be due to the absence of  $\beta$ -glucans which, when present, could modify the conformation and the morphology of AX. However, it cannot be excluded that the protein addition during the lichenase/ $\beta$ -glucosidase treatment could also be responsible for the differences in water sorption observed after the enzymatic removal of  $\beta$ -glucans. Meanwhile, at 90 % RH, water sorption increases with a higher A/X ratio in the presence or absence of  $\beta$ -glucans.

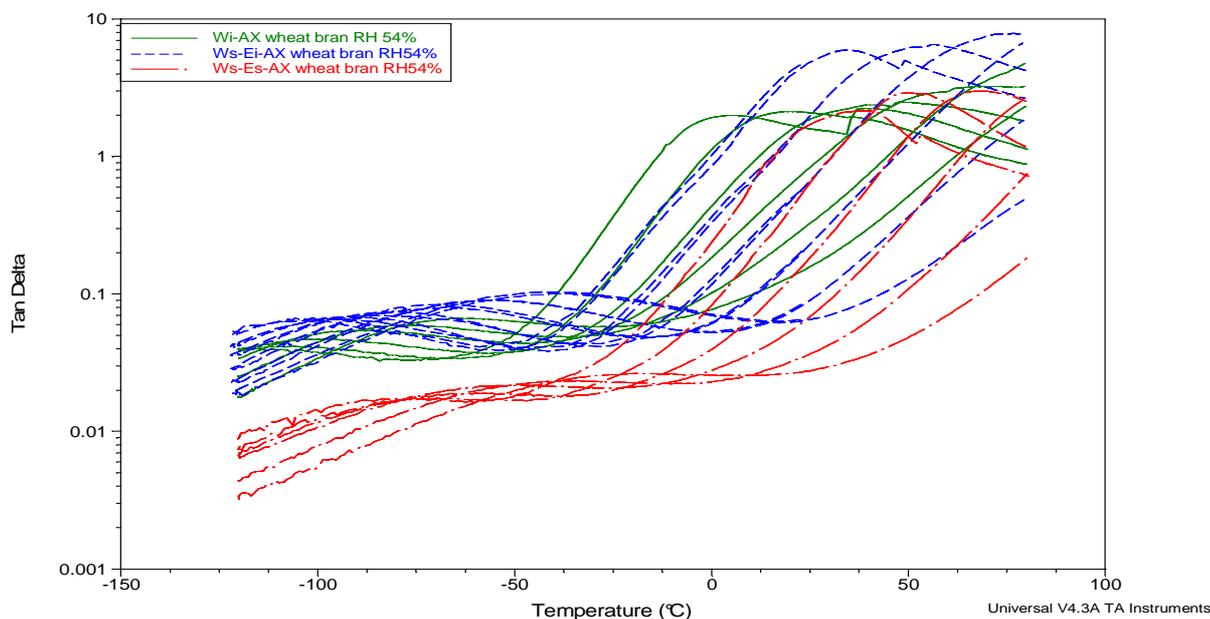


**Figure 10:** Water sorption isotherms of Arabinoxylans AX fractions (A) and hemicelluloses HC (B) fractions.

#### 2.4.4 Viscoelastic properties

The viscoelastic properties of the polymer films from the HC and AX fractions have been analyzed in order to get information about local macromolecular mobility (beta transitions).

The films have been analyzed by dielectric analyzer (DEA) after pre-hydration (at 54 and 85% RH) and performing a devoted hermetic sensor set-up. Typical thermograms (frequency variation from 1 to 100000 Hz) present two relaxations. These could be attributed to a beta transition (sub-T<sub>g</sub>) at low temperature, and to the alpha transition links to the glass transition temperature at higher temperature (Figure 11).

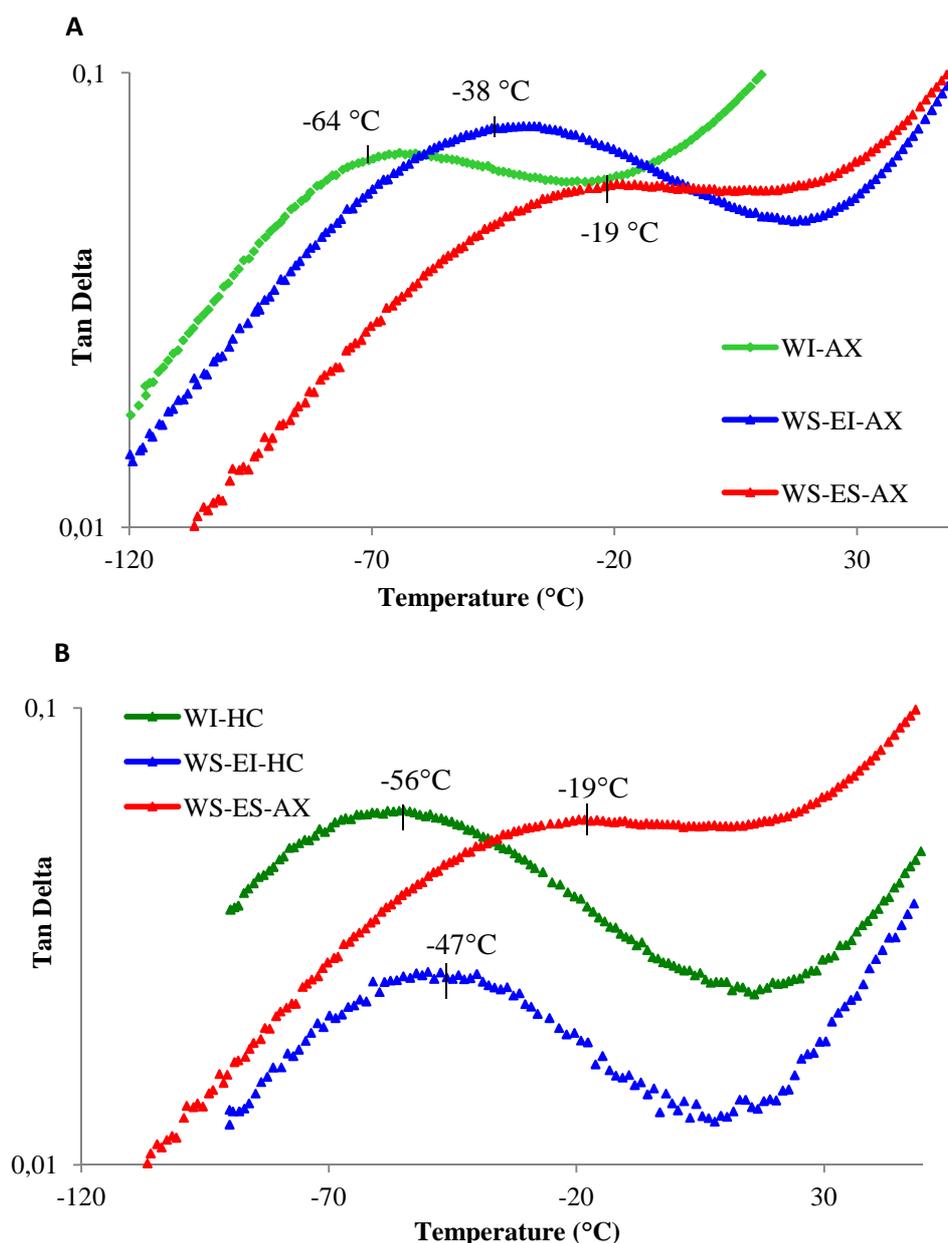


**Figure 11:** Typical thermogramme of Dielectrical analyser for AX based films

In a typical manner, all observed relaxations are shifted to a higher temperature as frequency increases and to lower temperature when relative humidity increases as expected for water plasticized hydrophilic polymers. The sub-T<sub>g</sub> (at the maximum of the tan delta peak) systematically decreases from WS-ES-AX, WS-EI-AX to WI-AX (Figure 12A) and for the corresponding unpurified fractions (Figure 12B). Table 9 shows the sub-T<sub>g</sub> values obtained for 100000 Hz at 54 and 85 % RH.

|                        |        | WI-HC | WI-AX | WS-EI-HC | WS-EI-AX | WS-ES-AX |
|------------------------|--------|-------|-------|----------|----------|----------|
| <b>Beta transition</b> | 54% RH | -56   | -64   | -47      | -38      | -19      |
|                        | 85% RH | -61   | -67   | -49      | -53      | -38      |

**Table 9:** The beta relaxation temperature (Sub-T<sub>g</sub>) of AX films



**Figure 12:** Dielectric loss tangent of the damping peak *versus* temperature. (A) WI-AX, WS-EI-AX and WS-ES-AX fractions previously hydrated at 54% RH. (B) WI-HC, WS-EI-HC and WS-ES-AX fractions previously hydrated at 54% RH (frequency = 100 000 Hz).

This result demonstrates that the sub-T<sub>g</sub> is well correlated with the substitution degree as the higher the Ara/Xyl ratio is, the higher the sub-T<sub>g</sub> is observed. This higher sub-T<sub>g</sub> transition indicates a lower segmental mobility or local AX chain mobility when xylose units are highly substituted by arabinose. This result is systematically obtained *whatever the studied relative humidity (54%, 85% RH) or the frequency*, even if the signals are obviously easier to monitor at higher water content and frequency, being located between suitable temperature limits. This correlation indicates that the classification as a function of Ara/Xyl ratio is not

simply related to the water content by plasticization because the water sorption isotherms show no difference or a reverse water uptake between the fractions around and after 80% RH.

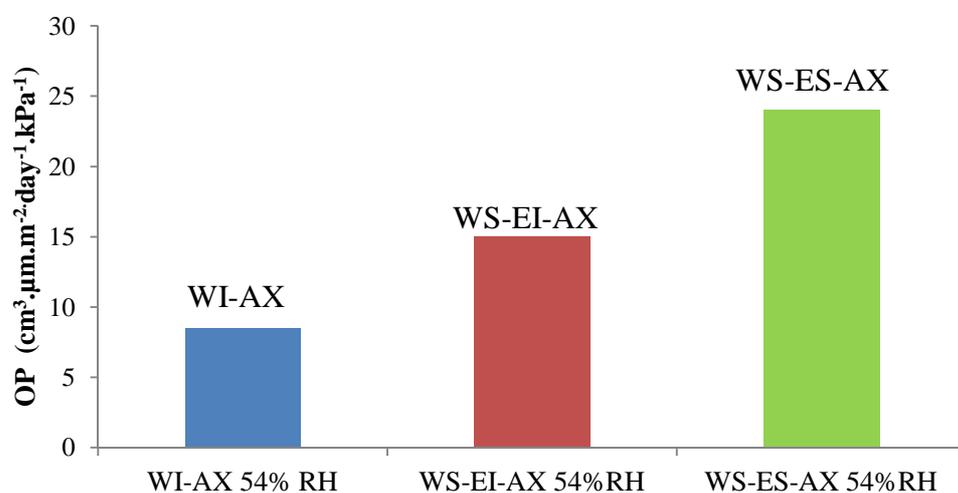
The same correlation is observed between the sub-T<sub>g</sub> and the substitution degree for the three HC fractions before lichenase treatment (Figure 12B). In these cases the sub-T<sub>g</sub> is not systematically shifted in the same way. For example, the sub-T<sub>g</sub> of WI-HC is higher than after lichenase purification whereas WS-EI-HC has a lower sub-T<sub>g</sub> than WS-EI-AX at 54% RH.

As indicated by the sub-T<sub>g</sub> decrease with a lower Ara/Xyl ratio, the local chain motion decrease in the amorphous parts for highly substituted xylans. This loss of mobility could then be related to intermolecular hydrogen bonds which seem to occur because of the presence of arabinose inside the amorphous part, locally stiffening the AX chain. This result could be related to the density of the samples already discussed, but at the dry state as Kusuma et al. (Kusuma, Freeman et al. 2009) found also that the presence of side chain could be able to reduce fractional free volume by forming hydrogen bonds.

#### **2.4.5 Oxygen permeability coefficient**

The oxygen permeability coefficients have been determined at 54% RH for the AX films obtained from the three fractions of wheat bran in a laboratory made oxygen permeameter especially designed for that study. The results are shown in Figure 13. According to this figure, the permeability coefficient of the highly substituted fraction (WS-ES-AX) is  $25 \text{ cm}^3 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{KPa}^{-1}$  ( $12.75 \cdot 10^{-15} \text{ mol/m s Pa}$  in SI unit), whereas a value of  $15 \text{ cm}^3 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{KPa}^{-1}$  ( $7.68 \cdot 10^{-15} \text{ mol/m s Pa}$  in SI unit) is found for the fraction WS-EI-AX and  $8 \text{ cm}^3 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{KPa}^{-1}$  ( $4.10 \cdot 10^{-15} \text{ mol/m s Pa}$  in SI unit) for the poorly substituted fraction WI-AX. These results reveal that the oxygen permeability of films based on arabinoxylans is well correlated with their substitution degrees. Several studies have also suggested such a trend but from rye xylan samples which have been debranched by

enzymatical treatment (Höije, Sternemalm et al. 2008). However, the oxygen permeation values obtained by these authors are lower than ours (average value around  $1.5 \text{ cm}^3 \cdot \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{KPa}^{-1}$ ). It is possible that our oxygen permeation measurement instrument could overestimate the migration value due to a cell that could be not air-tight enough. This work will be also discussed and enriched in Chapter 2 as the films (from another lot) will be tested for this purpose with commercial equipment periodically calibrated through blind interlaboratory tests. Meanwhile, the relative tendency is obviously reliable (permeability decrease with Ara/Xyl decrease).



**Figure 13:** The oxygen permeability coefficient of AX films at 54% RH.

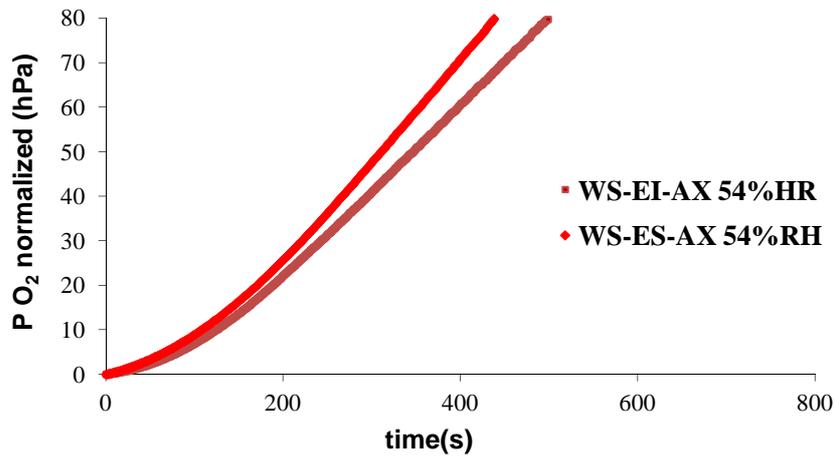
The previous results concerning the films morphology showed that the degree of crystallinity is also well correlated with the substitution degree of AXs. The crystallinity increases when the substitution degree decreases, but the film density also decreases. The poorly substituted fraction (WI-AX) has a lower amount of amorphous phase with lower density. This type of film shows less permeability to oxygen indicating that the fractional free volume provided by the amorphous regions seems not to influence the oxygen permeability. The oxygen permeability is then governed by the crystallinity rate that is to say by the proportion of the amorphous phase where diffusion occurs.

#### 2.4.6 Oxygen diffusion coefficient

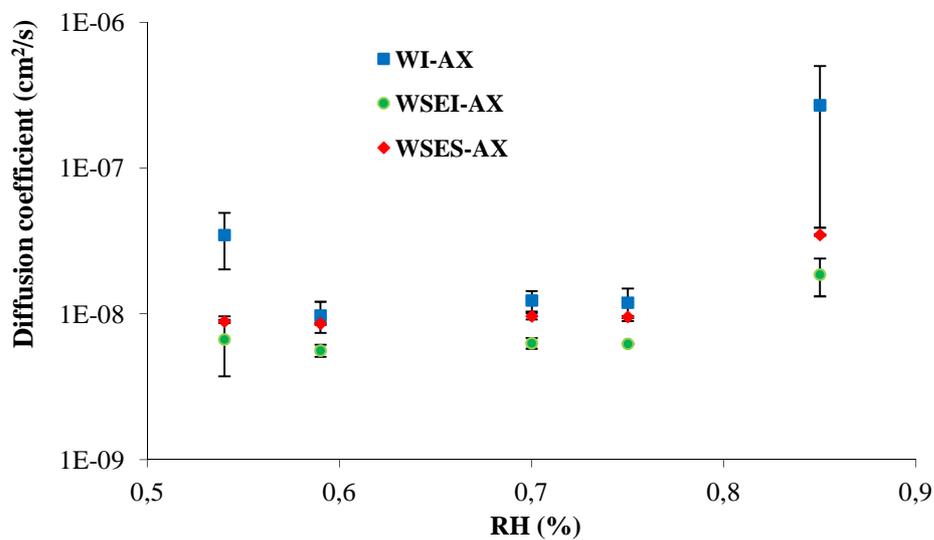
The apparent oxygen diffusion coefficient have been determined at 5 different humidities (54%, 59%, 70%, 75% and 85%) on the same film. The time lag method is performed from a micro-permeation test made of an oxygen sensor coated by the tested film (casting performed over the sensor). A typical graph is presented in Figure 14. The results of diffusion coefficient are shown in Figure 15. The values of diffusion coefficient vary slightly from 54% RH to 75% RH from  $5.6 \times 10^{-9}$  to  $1.2 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s except for the point for WI-AX film at 54% RH. But at 85% RH, there is a significant increase for all the samples. The fraction WS-EI-AX has an intermediate substitution degree (Ara/Xyl = 0.65 from a “new samples lot”), and this film has the lowest diffusion coefficient. The highly substituted fraction WS-ES-AX (Ara/Xyl = 1.14 from “new samples lot”) possesses a middle value between the two other samples. The water insoluble fraction WI-AX presents the highest values despite of a very large data dispersion. Unfortunately, the shrinkage occurring during the formation of WI-AX based films could be responsible of i) a bad good contact between the oxygen sensor and the film ii) or defects in the membrane wall. Thus, the diffusion values are possible to be overestimated for WI-AX film. The films made from the two other fractions are homogeneous and possess a good casting properties. The diffusion values obtained from these two fractions are maybe more reliable and present a good correlation with the substitution degree. D is lower for WS-ES-AX than for WS-EI-AX. This slight D decrease is in a good agreement with the observed permeability decrease.

The oxygen micro-permeation curves could be also exploited at the steady state concerning their slope ratios which represent the permeability ratio of the films. As shown in Figure 14, the slopes ratios of two samples were different according to their oxygen permeability. The slopes ratio values are shown in Table 10 at two relative humidities. The values from WI-AX based films are not taken into account due to the possible overestimation.

These results presented in the Table 10 correspond well to our previous study concerning the oxygen permeability coefficients. The slope ratios decrease from the WS-ES-AX based film to WS-EI-AX based films indicating that higher permeability appeared for the highly substituted AX films.



**Figure 14:** A typical graph of apparent oxygen diffusion: the increase of oxygen partial pressure as a function of time.



**Figure 15:** The apparent oxygen diffusion coefficients of AX films

|          | 54% RH | 85% RH |
|----------|--------|--------|
| WS-EI-AX | 0.91   | 1.16   |
| WS-ES-AX | 1      | 1,53   |

**Table 10:** The slope ratios from the WS-ES-AX permeation slope at the steady state normalized for WE-ES-AX (54%).

#### 2.4.7 Oxygen solubility in dry environment

The oxygen solubility of AX based films has been determined in dry environment (0% relative humidity). The results are shown in Table 11. The values obtained range from  $0.98 \times 10^{-5}$  to  $1.54 \times 10^{-4}$  mol/m<sup>3</sup>Pa, corresponding to a percentage of oxygen mass uptake between 0.020 and 0.028%. In this study, no clear correlation is observed between the oxygen solubility and the substitution degree. The intermediate fraction WS-EI-AX possesses the lowest solubility value, whereas the highest value is found for WI-AX based film. Generally, the oxygen solubility is very low in polar polymer matrix (Dole, Joly et al. 2004) due to less interaction appeared. The results obtained in our study for AX films are twice lower than for unplasticized starch based films. Dole et al. (Dole, Joly et al. 2004) found that the oxygen solubility of starch based film was around 0.04 wt%.

| Samples  | Oxygen solubility (mol/m <sup>3</sup> /Pa) | % wt O <sub>2</sub> uptake |
|----------|--|----------------------------|
| WI-AX    | $1.54 \times 10^{-4}$                      | 0.028                      |
| WS-EI-AX | $0.98 \times 10^{-4}$                      | 0.020                      |
| WS-ES-AX | $1.12 \times 10^{-4}$                      | 0.024                      |

**Table 11:** The oxygen solubility in AX based films.

### 3 Conclusion

Different populations of AX were isolated from wheat bran according to a laboratory scale alkali extraction process. After alkali isolation and fractionation according to solubility in water and ethanol, a purification step is performed in order to remove  $\beta$ -glucans. Three lots of AX fractions displaying a large range of Ara/Xyl ratios (from 0.2 to 1.3) are obtained. Patterns of  $\alpha$ -L-Araf substitutions are proposed according to a fine structural analysis. Molar mass were comprised between 152 000 and 218 000 g/mol.

Films were then made from these characterized fractions in order to study the impact of AX composition and structure on their physico-chemical properties. The main results indicate that the crystalline morphology, the density, the beta transitions as well as the water sorption properties of AX films are well correlated to the substitution degree by arabinose groups. As a result, when the substitution degree is low:

- AX is less soluble in water and ethanol
- less hydrophilic at high relative humidity
- crystalline morphology appears but surprisingly the density decreases
- the local macromolecular mobility increases
- the oxygen permeability coefficient decreases, as well as the oxygen diffusivity coefficient (except for the WI-AX fraction for which the diffusion coefficient remained undetermined).

In conclusion, hemicellulose based materials showed physico-chemical properties strongly linked to the native Ara/Xyl ratios which can be controlled by suitable fractionation process conditions.

## References:

- Andrewartha, K. A., Phillips, D. R., et al. (1979). "Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans." Carbohydrate Research, **77**(1), 191-204.
- Bataillon, M., Mathaly, P., et al. (1998). "Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale." Industrial Crops and Products, **8**(1), 37-43.
- Beaugrand, J., Crônier, D., et al. (2004). "Arabinoxylan and hydroxycinnamate content of wheat bran in relation to endoxylanase susceptibility." Journal of Cereal Science, **40**(3), 223-230.
- Bergmans, M. E. F., Beldman, G., et al. (1996). "Optimisation of the Selective Extraction of (Glucurono)arabinoxylans from Wheat Bran: Use of Barium and Calcium Hydroxide Solution at Elevated Temperatures." Journal of Cereal Science, **23**(3), 235-245.
- Brillouet, J. M., Joseleau, J. P., et al. (1982). "Isolation, purification and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran." Journal of Agricultural and Food Chemistry, **30**(3), 488-495.
- Dervilly-Pinel, G., Tran, V., et al. (2004). "Investigation of the distribution of arabinose residues on the xylan backbone of water-soluble arabinoxylans from wheat flour." Carbohydrate Polymers, **55**(2), 171-177.
- Dervilly, G., Saulnier, L., et al. (2000). "Isolation of homogeneous fractions from wheat water-soluble arabinoxylans. Influence of the structure on their macromolecular characteristics." Journal of Agricultural and Food Chemistry, **48**(2), 270-278.
- Dole, P., Joly, C., et al. (2004). "Gas transport properties of starch based films." Carbohydrate Polymers, **58**(3), 335-343.
- Henry, R. J., Martin, D. J., et al. (1987). "Reduction of the [alpha]-amylase content of sprouted wheat by pearling and milling." Journal of Cereal Science, **5**(2), 155-166.
- Höjje, A., Gröndahl, M., et al. (2005). "Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks." Carbohydrate Polymers, **61**(3), 266-275.
- Höjje, A., Sternemalm, E., et al. (2008). "Material Properties of Films from Enzymatically Tailored Arabinoxylans." Biomacromolecules, **9**(7), 2042-2047.
- Kusuma, V. A., Freeman, B. D., et al. (2009). "Influence of chemical structure of short chain pendant groups on gas transport properties of cross-linked poly(ethylene oxide) copolymers." Journal of Membrane Science, **327**(1-2), 195-207.
- Li, W., Cui, S. W., et al. (2011). "Studies of aggregation behaviours of cereal [beta]-glucans in dilute aqueous solutions by light scattering: Part I. Structure effects." Food Hydrocolloids, **25**(2), 189-195.
- Nishimura, T., Ishihara, M., et al. (1998). "Structure of neutral branched xylooligosaccharides produced by xylanase from in situ reduced hardwood xylan." Carbohydrate Research, **308**(1-2), 117-122.
- Pastell, H. (2010). Thesis
- Pastell, H., Virkki, L., et al. (2009). "Presence of 1-->3-linked 2-O-[beta]-d-xylopyranosyl-[alpha]-l-arabinofuranosyl side chains in cereal arabinoxylans." Carbohydrate Research, **344**(18), 2480-2488.
- Pitkanen, L., Virkki, L., et al. (2009). "Comprehensive Multidetector HPSEC Study on Solution Properties of Cereal Arabinoxylans in Aqueous and DMSO Solutions." Biomacromolecules, **10**(7), 1962-1969.
- Ring, S. G., & Selvendran, R. R. (1980). "Isolation and analysis of cell wall material from beeswing wheat bran (*Triticum aestivum*)." Phytochemistry, **19**(8), 1723-1730.

- Sternemalm, E., Höije, A., et al. (2008). "Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films." Carbohydrate Research, **343**(4), 753-757.
- van den Broek, L. A. M., Lloyd, R. M., et al. (2005). "Cloning and characterization of arabinoxylan arabinofuranohydrolase-D3 (AXHd3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083." Applied Microbiology and Biotechnology, **67**(5), 641-647.

## **Chapitre2:**

Arabinoxylanes renforcés par des nanocristaux de cellulose : influence du rapport arabinose sur xylose sur les interactions fibre/matrice

## Résumé:

L'objectif de ce chapitre est l'étude des propriétés physico-chimiques des films nanocomposites réalisés à base des trois fractions d'arabinoxylanes (AX) renforcées par des nanocristaux de cellulose. Les AX ont été extraits du son de blé désamidonné et ensuite fractionnés selon leur solubilité dans l'eau et dans l'éthanol. Trois fractions caractéristiques ont été obtenues. Elles possèdent un large panel de degré de substitution (Ara/Xyl : 0,15, 0,65 et 1,14) et divers degrés de cristallinité (0, 10, 24%). Les nanocristaux de cellulose ont été préparés par hydrolyse d'acide (acide sulfurique) à partir de linters de coton. En comparant les films d'AX purs (matrices) et les films nanocomposites renforcés par les nanocristaux de cellulose (5 ou 10% en poids), on remarque que :

- (1) le degré de cristallinité des différentes matrices n'est pas modifié, alors que la densité des films augmente à l'état sec
- (2) la teneur en eau diminue seulement à haute humidité relative (HR), mais les films présentent des comportements spécifiques en fonction de la nature de la matrice à faible HR
- (3) la température de transition beta augmente systématiquement (pour chaque humidité relative) traduisant la présence d'interactions entre nanocharges et matrice, dont la mobilité locale est alors réduite. Cette augmentation est plus marquée pour la matrice amorphe.
- (4) la température de transition alpha est pratiquement inchangée sauf pour la matrice amorphe pour laquelle T alpha augmentent légèrement. Le renforcement est alors remarqué uniquement pour la fraction amorphe, et pourrait partiellement entrer en concurrence avec la morphologie cristalline observée pour les autres fractions au niveau de la mobilité globale.
- (5) la perméabilité et solubilité d'oxygène diminue

À notre connaissance, c'est la première étude sur le renforcement de films d'AX non plastifiés par des nanocristaux de cellulose.

**Les résultats de ce chapitre seront soumis pour publication à Carbohydrate Polymers.**

# 1 Introduction

In chapter 1, wheat bran arabinoxylans (AX) were alkali-extracted and separated into three fractions according to their solubility in water and in ethanol-water (50%-50%). These three AX fractions presenting various arabinose to xylose ratios (Ara/Xyl) were well characterized in terms of composition, structure (types of linkages between xylan main chain and substituents) and molecular weights (Zhang, Pitkänen et al. 2011). Furthermore, some properties of films made from with these AX were studied and revealed that the arabinose content impacts the water uptake as well as the local chain motion of the xylan polymers (Zhang, Pitkänen et al. 2011).

The objective of the present chapter is to investigate the morphology and the physico-chemical properties of different nanocomposite films based on the three AX fractions reinforced with two levels (5 or 10 wt.%) of cellulose nanocrystals (CNC). CNC are prepared from cotton linters using sulfuric acid hydrolysis. The physico-chemical properties of nanocomposites are investigated in order to reveal filler/matrix interactions as a function of the nature of the xylan matrix varying in substitution degree with arabinofuranosyl residues.

## 2 Results and discussion

### 2.1 Chemical composition of polymer matrices

Table 1 presents the chemical composition of a new lot of three AX fractions extracted at the laboratory scale from destarched wheat bran and used as nanocomposite matrices.

All three fractions contain more than 65% of (xylose + arabinose) indicating a relatively high level of purity of the extracted AX. Their substitution degrees with arabinose increased with their solubility and are equal to 0.15, 0.65 and 1.14. According to the chapter one, there are respectively coded: WI-AX, WS-EI-AX and WS-ES-AX.

| <b>Samples</b>  | <b>% Total carbohydrate<sup>a</sup></b> | <b>% Ara+Xyl<sup>a</sup></b> | <b>% Glc<sup>a,b</sup></b> | <b>% Protein<sup>a</sup></b> | <b>% Klason lignin<sup>a</sup></b> | <b>Ara/Xyl<sup>b,c</sup></b> |
|-----------------|---|------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| <b>WI-AX</b>    | 79                                      | 74                           | 4.8                        | 11                           | 0.8                                | 0.15                         |
| <b>WS-EI-AX</b> | 76                                      | 67                           | 7.9                        | 12                           | 1.2                                | 0.65                         |
| <b>WS-ES-AX</b> | 70                                      | 65                           | 2.5                        | 6                            | 2.0                                | 1.14                         |

**Table 1 :** Chemical composition of the three arabinoxylans fractions extracted from destarched wheat bran

<sup>a</sup>: % of dry matter

<sup>b</sup>: average values were calculated from three extractions

<sup>c</sup>: molar ratio of arabinose to xylose

The three AX fractions contain impurities which are mainly proteins whereas a low level of lignin is present. The lowest protein content (6%) has been obtained with WS-ES-AX which was almost twice higher for WI-AX and WS-EI-AX. The higher protein content in WI-AX and WS-EI-AX could be attributed to the enzyme treatment performed to degrade the co-extracted  $\beta$ -glucans, but concomitantly leading to an addition of proteins. The lignin content is relatively low as it does not exceed 2%.

## 2.2 Nanocomposite films

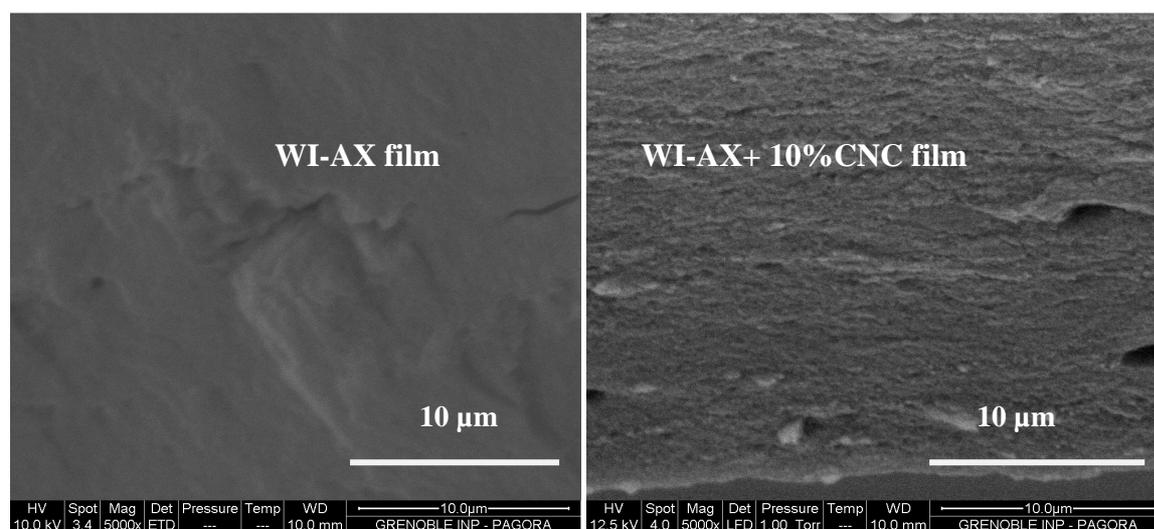
The nanocomposite films are obtained using water casting/evaporation from the three AX fractions used as matrix and mixed with cellulose nanocrystals (CNC). The CNC content is 5 and 10 wt.% for arabinoxylans matrices. A list of films prepared with their codification and descriptions is presented in Table 2.

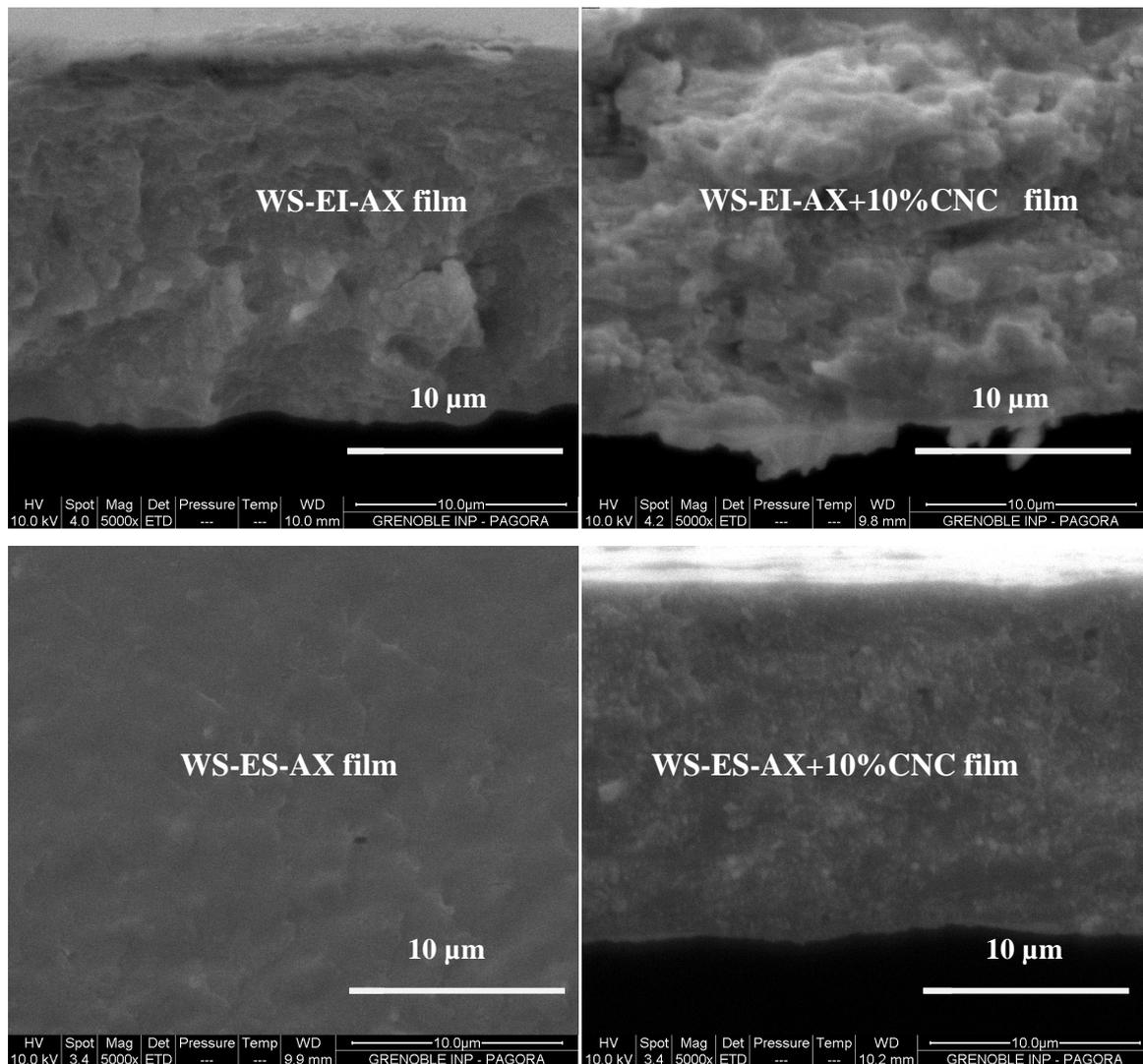
| <b>Sample code</b>      | <b>Ara/Xyl ratio</b> | <b>CNC content (wt. %)</b> |
|-------------------------|----------------------|----------------------------|
| <b>WI-AX</b>            |                      | 0                          |
| <b>WI-AX+5% CNC</b>     | 0.15                 | 5                          |
| <b>WI-AX+10% CNC</b>    |                      | 10                         |
| <b>WS-EI-AX</b>         |                      | 0                          |
| <b>WS-EI-AX+5% CNC</b>  | 0.65                 | 5                          |
| <b>WS-EI-AX+10% CNC</b> |                      | 10                         |
| <b>WS-ES-AX</b>         |                      | 0                          |
| <b>WS-ES-AX+5% CNC</b>  | 1.14                 | 5                          |
| <b>WS-ES-AX+10% CNC</b> |                      | 10                         |

**Table 2:** Nanocomposite films description

All the nanocomposite films are transparent and light brown color is observed for water soluble fractions due to higher lignin content. The films seem to present an apparently good macroscopic homogeneity with no visible phase separation or aggregates. The WS-EI-AX and WS-ES-AX based films has a typical thickness of 35  $\mu\text{m}$ , whereas a higher thickness around 50  $\mu\text{m}$  is observed for WI-AX based films as a result of a noticeable shrinkage during film formation.

Figure 1 shows SEM pictures of film cross-sections for AX matrices and their corresponding nanocomposites reinforced with 10% CNC. All the pure AX films show homogenous appearances and smooth surfaces. No clear evidence of the presence of cellulose nanocrystals can be observed from these pictures due to the low CNC dimensions. However, films containing CNC seem to be more heterogeneous presenting rough surfaces often discussed as the result of improved interaction between filler and matrix (Mikkonen, Mathew et al. 2010; Stevanic, Joly et al. 2011). Aggregates could also be responsible of such a modified surface. A particular stratified surface was only observed for WI-AX-10% CNC film.





**Figure 1** : SEM observations of cross-sections of arabinoxylans films: WI-AX, WS-EI-AX, WS-ES-AX films and their corresponding nanocomposite films with 10% CNC: WI-AX-10% CNC, WS-EI-AX-10% CNC, and WS-ES-AX-10% CNC films.

### 2.3 X-ray analysis

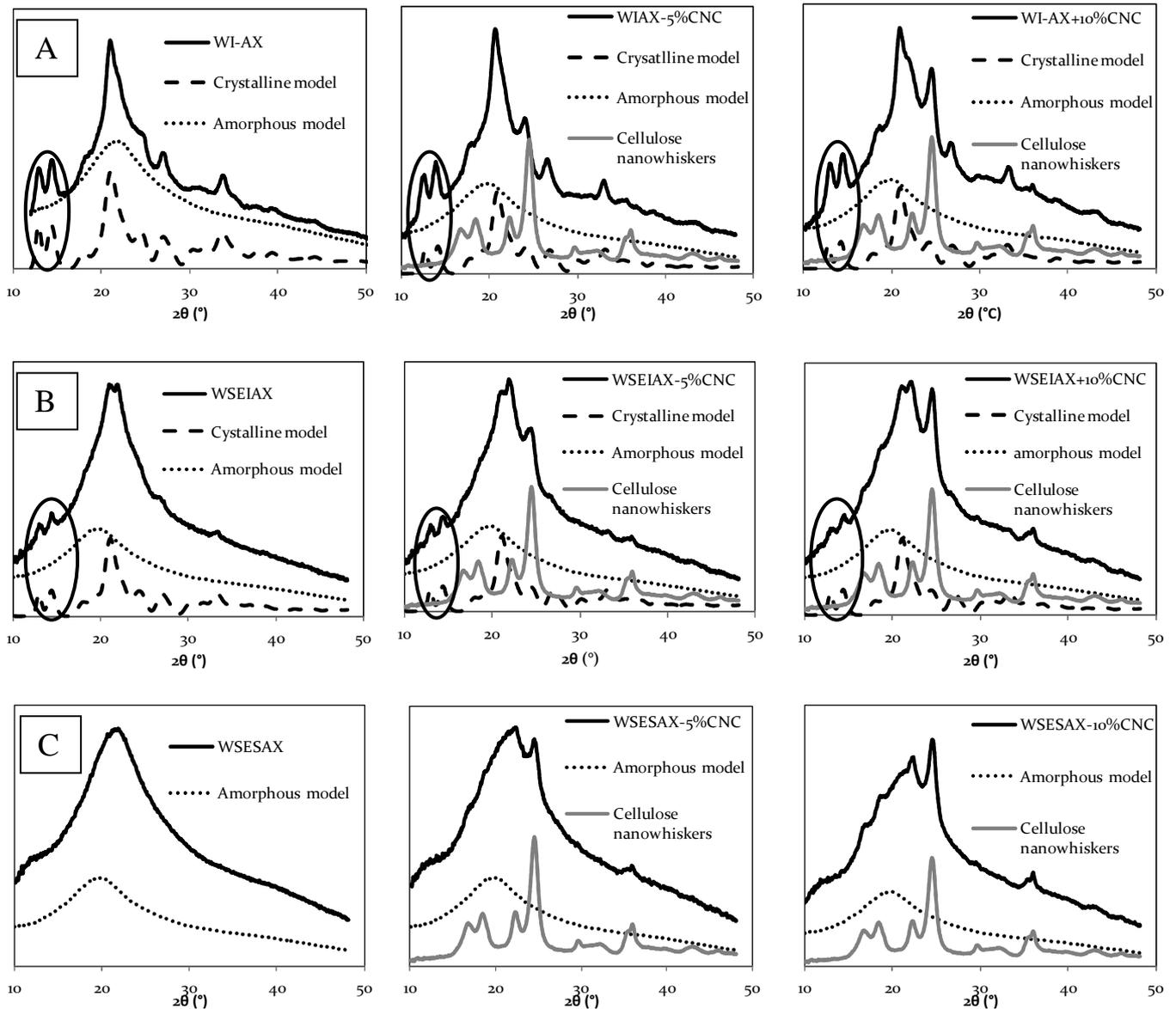
The X-ray analysis is performed in order to study the crystallinity of AX films and their nanocomposite films (Figure 2). The intensity profile of highly substituted fraction WS-ES-AX showed no diffraction peaks and its degree of crystallinity is considered as zero (Mikkonen, Stevanic et al. 2011; Stevanic, Joly et al., 2011). Thus, this sample is used as amorphous background in order to calculate the degree of crystallinity. The degree of crystallinity,  $\phi$ , is calculated as

$$\phi = 1 - \left( \frac{\sum I_{\text{amorphous}}}{\sum I_{\text{measured}}} \right),$$

where  $I_{\text{amorphous}}$  is the intensity scattered by amorphous regions, i.e. the amorphous background fitted into the diffraction profile, and  $I_{\text{measured}}$  is the total measured intensity.

The WI-AX and WS-EI-AX based films (Figure 2A and 2B) are considered as semi-crystalline as two well-defined xylan diffraction peaks (100 at 11.1° and 011 at 12.5°) are observed. The degree of crystallinity of pure AX films is calculated to be  $24 \pm 4\%$  for WI-AX film and  $10 \pm 2\%$  for WS-EI-AX film. With a rye AX film with an Ara/Xyl ratio of 0.16, Stevanic et al. (Stevanic, Joly et al. 2011) obtained a degree of crystallinity of 20 % close to our WI-AX film which had the same degree of substitution ( $A/X = 0.15$ ). These authors observed also that a native rye AX film ( $Ara/Xyl = 0.50$ ) was completely amorphous, whereas 10 % crystallinity was found in WS-EI-AX films with a similar Ara/Xyl ratio of 0.65.

The nanocomposite films (Figure 2) present similar diffractograms except for some additional scattering peaks due to the presence of crystalline CNC. All nanocomposite films have degree of crystallinity similar to pure AX films, i.e.  $24 \pm 4\%$  for WI-AX-5% CNC films,  $23 \pm 4\%$  for WI-AX-10% CNC and  $10 \pm 2\%$  for WS-EI-AX based films with 5 and 10 wt.% CNC. No change of the crystallinity is observed for nanocomposites regardless the fraction used as matrix. Similar results are obtained by Stevanic et al. (Stevanic, Joly et al. 2011) for rye arabinoxylan films filled with bacterial cellulose and glucomannan films filled with cellulose nanocrystals (Mikkonen, Mathew et al. 2010).



**Figure 2 :** X-ray diffractograms of arabinoxylans and nanocomposite films with 5 and 10 wt.% cellulose nanocrystals: A: WI-AX based films, B: WS-EI-AX based films, C: WS-ES-AX based films. (Matrix peak significant modifications are surrounded)

The Scherrer equation is used to estimate the average size of the crystallites. Only the WI-AX based samples are analyzed as other samples were poorly crystalline. The single xylan crystallite size is estimated to be near 11 nm for both (100) and (011) lattice planes for WI-AX and WI-AX-5% CNC samples. The crystallite size for WI-AX-10% CNC is found to be around 11 nm for (100) planes and 10 nm in (011) planes.

The unit cell dimension ( $a = b$ ) perpendicular to the chain axis of xylan is also determined. WI-AX-10% CNC film seems to be less compacted in the direction perpendicular to the chain axis (lattice parameter  $a = b = 9.35 \text{ \AA}$ ) than WI-AX and WI-AX-5% CNC films ( $a = b = 9.10 \text{ \AA}$ ). The same unit cell dimensions are obtained for WS-EI-AX film and WS-EI-AX nanocomposite films ( $a = b = 9.20 \text{ \AA}$ ).

## 2.4 Film density in dry environment

In chapter 1, the film density has been found to increase from WI-AX film to WS-ES-AX film. A higher fractional free volume appears in amorphous part of less substituted AX. When the AX matrices are mixed with 10% cellulose nanocrystals, the densities increase for all the type of matrices (Table 3) as attempted according to the mixing law. This increase is not the same for all matrices, for which the crystallinity degree were found as being unchanged when fibers are added (previous paragraph). The highest increase rates are 6.4% for WI-AX based film, whereas lower increases are found for the two other matrices around 4%. The results could indicate that the hydrogen bonding established between CNC and matrix could impact (reduce) the “excess” of fractional free volume previously discussed and increase the polymer density.

| Sample   | Density ( $\text{g/cm}^3$ ) | Density ( $\text{g/cm}^3$ ) |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|
|          | AX films                    | AX + 10 wt% CNC             |
| WI-AX    | 1.430                       | 1.522                       |
| WS-EI-AX | 1.469                       | 1.532                       |
| WS-ES-AX | 1.503                       | 1.563                       |

**Table 3 :** The density of AX films and nanocomposite films.

## 2.5 Water sorption properties

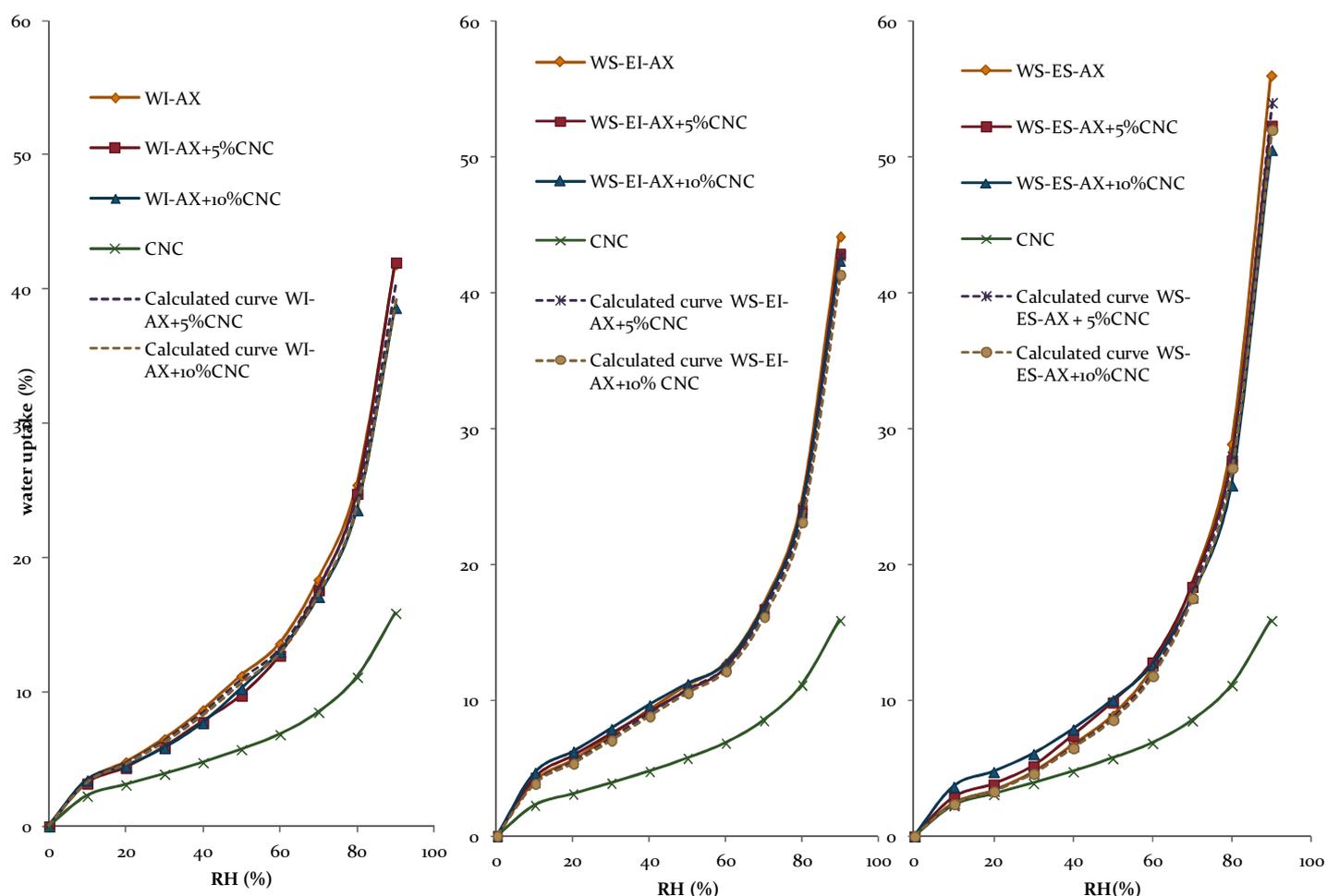
Figure 3 presents the water sorption isotherms for all samples (matrices and composites), for pure CNC and for theoretical composites curves calculated on the basis of a mixing rule, adding the water uptake contribution of each component (matrix and CNC taking into account their relative percentages).

At high relative humidity, for the pure matrices, it is obvious that the highly substituted fraction (WS-ES-AX, amorphous) displays the highest water content whereas the lowest water uptake was found for the poorly substituted fraction which results in the semicrystalline film (WI-AX, 24% crystallinity). Similar results have been obtained previously by Zhang et al. (Zhang, Pitkänen et al. 2011) on another batch of three AX fractions extracted with a similar protocol. AX water sorption is then well correlated with their crystalline degrees (and Ara/Xyl ratio) at high relative humidity. Similar results have also been obtained by other authors for very high RH (Höije, Sternemalm et al. 2008; Sternemalm, Höije et al. 2008; Stevanic, Joly et al. 2011).

At lower RH (from 10 to 50% RH), for the matrices, the situation is surprisingly reversed: the most substituted fraction (WS-ES-AX) shows the lowest moisture uptake. This could be attributed to more numerous or available water sorption sites for the amorphous phase of the WI-AX matrix than for the WS-ES-AX one.

Figure 3 displays the sorption isotherm for pure CNC as a reference. As attempted, CNC has the lowest water uptake regardless the RH level due to its high crystallinity (Belbekhouche, Bras et al. 2011). The theoretical water sorption curves were calculated by taking into account the contribution of each component (using a mixing rule). By comparison, sorption isotherms (experimental matrix curves and corresponding theoretical nanocomposites curves) are all superimposed up to around 80%. Addition of the filler does not modify *theoretically* the water uptake of the matrices up to around 80% RH due to the low CNC content. It is then necessary to reach 80% RH to observe the effect of the filler. In fact, above 80% RH, the nanocomposite sorbed less water than the pure matrices except the WI-AX-5% CNC film, which shows similar water content as the WI-AX film. The water content

decreases with CNC loading and the films filled with 10% CNC show the lowest absorbed water amounts. It has been shown by Mikkonen et al. 2010 (Mikkonen, Mathew et al. 2010) that the water content of films containing CNC was lower than that for films from mannans.



**Figure 3 :** water sorption isotherm curves of arabinoxylans films and their nanocomposite films with 5 and 10 wt.% cellulose nanocrystals at 20°C. A: WI-AX based films; B: WS-EI-AX based films; C: WS-ES-AX based films.

Below 80% RH, it is clear that the addition of CNC *experimentally* modifies the hydration properties of the AX matrices. The water content decreases slightly for WI-AX based nanocomposite (Figure 3A), but increases for nanocomposites made from the soluble fractions (Figure 3B and 3C), especially for the WS-ES-AX based films. The increase in the

water uptake is surprising after the addition of a less hydrophilic component (CNC) to arabinoxylan. Anglès et al. 2000 (Anglès & Dufresne, 2000) observed the same trend at low water activity for starch and tunicin whiskers nanocomposites. Due to the presence of CNC, the hydrogen bonding network of xylans chain might be disturbed. Consequently, water sorption sites previously involved in H-bonding could become available. Contrarily, the decreasing moisture uptake observed for WI-AX-5 and 10% CNC films is usually explained by the interactions established between unsubstituted xylose units and cellulose nanocrystals, leading to slightly limited moisture uptakes.

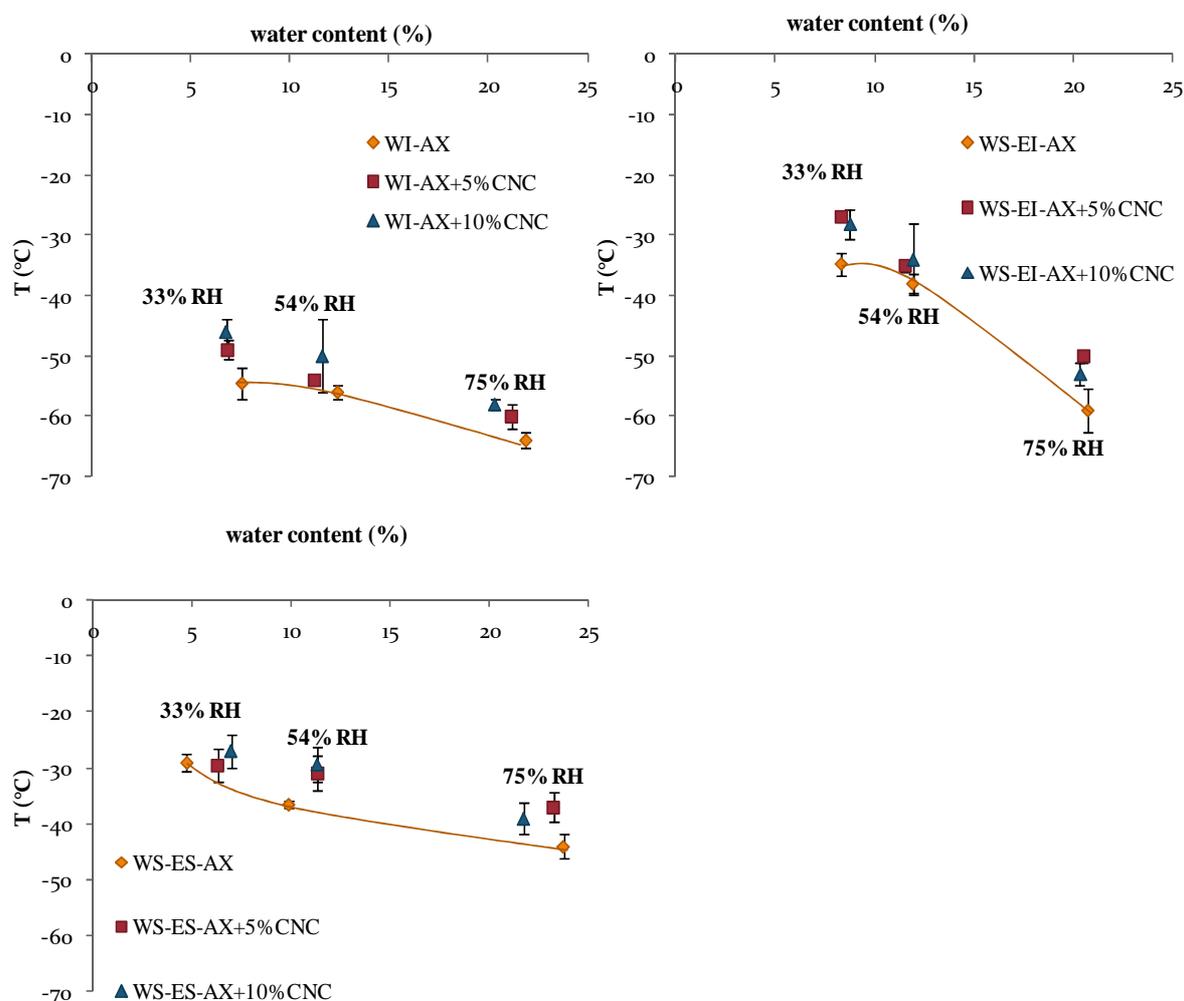
## **2.6 Viscoelastic properties**

Thermal transitions have been evidenced using a dielectrical analyzer (DEA) for AX films and nanocomposites containing 5 and 10 wt.% CNC. Both beta and alpha transitions can be determined (Bag, Beaugrand et al. 2010; Lenth and Kamke, 2001; Mikkonen, Stevanic al. 2011) as a function of the relative humidity. In Figure 4 and 5, the temperature position of these transitions has been plotted as a function of the water content previously obtained from the water sorption isotherms.

### **2.6.1 Beta transition**

The beta transition temperature corresponding to the local mobility of the polymer chain was measured at three different RHs (33%, 54% and 75%). The results present in Figure 4 for pure AX films show that the beta transition temperature increases with increasing the degree of substitution as already reported by (Zhang, Pitkänen et al. 2011). For example, the beta transition temperature increases from -64°C for the poorly substituted fraction (WI-AX) to -19°C for the highly substituted fraction (WS-ES-AX) at 54% RH. In our present study, the correlation is maintained as the beta T range from -56 for WI-AX fraction to -36 for the WS-ES-AX fraction at 54% RH. When xylan chains contain high levels of arabinose substituents, the local mobility of amorphous xylan chains seems to be limited probably due to the

development of an H-bond network. This phenomenon is observed for the three investigated RHs. The WS-EI fraction presented the higher water content dependence (higher slope, higher plasticization effect, central Figure 4).



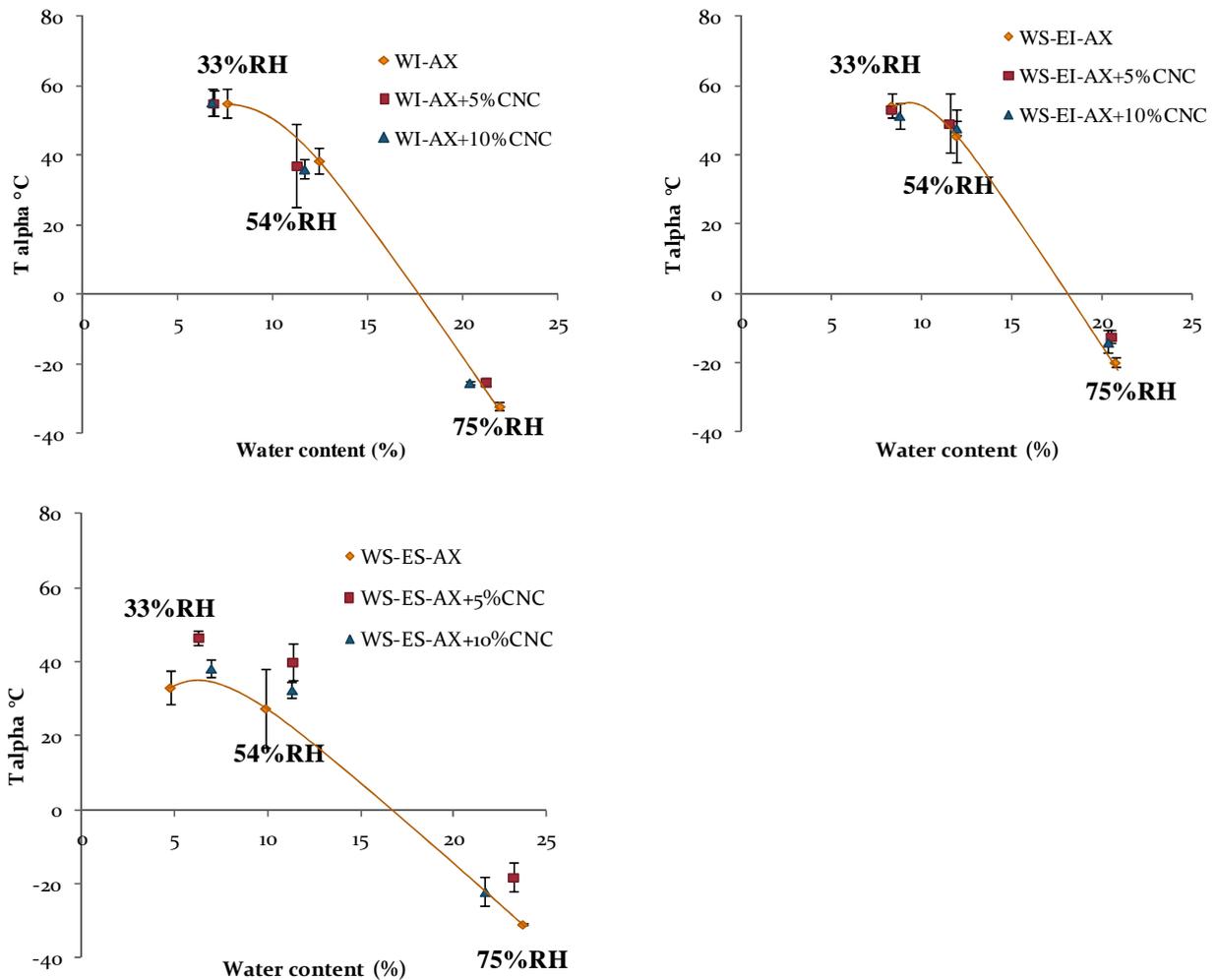
**Figure 4 :** Beta transition temperatures of arabinoxylans films and their nanocomposites with 5 and 10 wt.% cellulose nanocrystals

The beta transition temperature is found to increase for all nanocomposite films (at each RH) as compared to the pure AX films. This indicates that the chain mobility is reduced when the AX films are filled with CNC. This phenomenon is usually attributed to interactions between CNC and lateral groups of the xylan matrix in the amorphous phase. These specific interactions could limit the movement of polymer chains. It is interesting to note that opposite

results were observed by Mikkonen et al. (Mikkonen, Stavanic et al. 2011). These authors found that the beta transition temperature decreased for the galactoglucomannans (GGM) films plasticized with 40% glycerol when filled with microfibrillated cellulose (MFC). This phenomenon was explained by a complex situation induced by the presence of high glycerol content in this ternary system (Glycerol, GGM and MFC).

### **2.6.2 *Alpha transition***

Figure 5 represents the evolution of the alpha transition temperature of pure arabinoxylans films (matrices) and their nanocomposites as a function of moisture content. For the matrices this value ranged between  $-32^{\circ}\text{C}$  and nearly  $60^{\circ}\text{C}$  for the different relative humidities or water contents. For all pure AX films, the alpha transition temperature decreases due to the plasticization effect induced by water molecules when RH increases, as often reported for polar polymers. At 75% RH, it drastically decreases although the water content was nearly twice as high as 54% RH.



**Figure 5 :** The alpha transition temperatures of arabinoxylans films and their nanocomposite films with 5 and 10 wt.% cellulose nanocrystals.

At lower RH (33% and 54% RH), the two less substituted fractions WI-AX and WS-EI-AX have similar alpha transition temperature, but a much lower value is observed for the highly substituted one (WS-ES-AX). It seems, as attempted, that more crystalline structures have higher relaxation temperature (lower macromolecular mobility). At low RH, the alpha transition temperature values does not change for WI-AX and WS-EI-AX fractions when adding cellulose nanocrystals, but increases significantly for WS-ES-AX based films.

The alpha relaxation position increases for the WE-ES-AX based composites over a wide range of RH showing that the filler seems to be more efficient for this very substituted and amorphous fraction. The reinforcement for other fractions could be partially masked or perturbed by their semi-crystalline nature.

The results obtained are in agreement with previous works. Mikkonen et al. (Mikkonen, Stevanic et al. 2011) observed that Tg of galactoglucomannan-based films was increased when reinforced by microfibrillated cellulose. Roohani et al., 2008 (Roohani, Habibi et al. 2008) obtained higher Tg for PVA films reinforced with cellulose nanocrystals at high moisture atmosphere. The reinforcement effect at high RH was also observed with the highly substituted matrix in our study.

### ***2.6.3 Apparent activation energy of alpha and beta relaxation***

In the former paragraph, the alpha and beta relaxation temperatures were determined by using DEA for the AX films from x different frequencies (1 to 100 000 Hz). On the basis of paired values of frequency and temperature, an Arrhenius plot could be traced. The apparent activation energies of alpha and beta relaxation (Ea) were calculated from the diagram  $\log(\text{freq}) = f(1000/T)$  using eq 1 (Lenth and Kamke, 2001).

$$f_T = A^{-Ea/RT} \quad \text{Eq 1}$$

where  $f_T$  is the frequency, A is a constant, Ea is the activation energy, R is the universal gas constant = 8.3145 J/mol.K, and T is the temperature in K. The activation energy is calculated for the alpha and beta relaxation at three relative humidities for AX based films and presented in Table 4.

|                           | Ea alpha relaxation (kJ/mole) |        |        | Ea beta relaxation (kJ/mole) |        |        |
|---------------------------|-------------------------------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|
|                           | 33% RH                        | 54% RH | 75% RH | 33% RH                       | 54% RH | 75% RH |
| <b>WI-AX</b>              | 132                           | 103    | 90     | 58                           | 88     | 60     |
| <b>WI-AX + 5% CNC</b>     | 123                           | 95     | 86     | 79                           | 69     | 50     |
| <b>WI-AX + 10% CNC</b>    | 113                           | 91     | 93     | 98                           | 70     | 50     |
| <b>WS-EI-AX</b>           | 128                           | 121    | 87     | 78                           | 71     | 58     |
| <b>WS-EI-AX + 5% CNC</b>  | 132                           | 111    | 83     | 66                           | 63     | 56     |
| <b>WS-EI-AX + 10% CNC</b> | 138                           | 129    | 85     | 66                           | 65     | 53     |
| <b>WS-ES-AX</b>           | 106                           | 112    | 88     | 76                           | 67     | 52     |
| <b>WS-ES-AX + 5% CNC</b>  | 124                           | 126    | 84     | 65                           | 60     | 56     |
| <b>WS-ES-AX + 10% CNC</b> | 129                           | 97     | 79     | 71                           | 73     | 54     |

**Table 4:** The activation energy of alpha and beta relaxation of pure AX films and their nanocomposite films (The values were calculated from duplicates).

The Ea of alpha relaxation is ranged between 138 and 79 kJ/mol. These results are similar with those obtained by (Mikkonen, Stevanic et al. 2011) for galactoglucomannan based film (11.3% RH) or by Lenth et al. (Lenth and Kamke, 2001) by DEA for hemicelluloses in wood, but seem to be lower than those obtained by other authors for birch xylan (Olsson and Salmén, 2003). In fact, the activation energy is apparent because hemicelluloses are constituted of a blend of macromolecules which can be characterized by different activation energies. The calculated apparent activation energy could reflect the combination of lower activation energies and higher activation energies for more or less mobile species as the relaxation peaks are wide.

For the matrices, the activation energy determined for alpha relaxation decreases with increasing moisture content that is to say the polymer mobility. A decrease of activation energy with increasing mobility was observed for xylan (Olsson and Salmén, 2003). At low RH (33%), the samples present the highest values (more than 106 kJ/mole). At high RH (75%), all the fractions possess similar Ea between 87 and 90 kJ/mole. The WI-AX fraction

seems to show a higher dependency on moisture content than the two other fractions. These results indicate that when the moisture content increased, the polymers need less energy for softening due to plasticization.

The activation energies for the beta relaxation of the matrices are, as expected, lower than the alpha relaxation ranging from 97 to 50 kJ/mole which represent a larger extent values compared to galactoglucomannans films at lower RH (Mikkonen, Stevanic et al. 2011). As for the beta relaxation, the  $E_a$  for beta transition also tend to decrease with increasing the water content except WI-AX fraction. At low RH, the  $E_a$  obtained from WI-AX was not quite reliable since the peak of tangent delta was too board to be well identified. Upper 54% RH, the  $E_a$  decreased slightly from the poorly substituted fraction to the highly substituted fraction displaying a slower relaxation process for the poorly substituted AX.

Regarding the  $E_a$  of alpha relaxation obtained from the nanocomposite films, the data are more scattered. This could be due to a not perfect distribution of the fibers in the polymer matrices.

The  $E_a$  of beta relaxation seems to decrease slightly when the films were reinforced by nanocrystals that is to say when local mobility is decreased (the beta relaxation temperatures increase with the nanocrystals contents). The decreasing activation energy would reveal a faster relaxation process for the nanocomposite films. This phenomenon might be due to the new interactions established between the matrix/nanofillers replacing part of those in matrix chains.

#### ***2.6.4 Oxygen permeability and solubility***

The oxygen solubility of nanocomposite films measurement has been carried out for the two extreme fractions: WI-AX and WS-ES-AX matrices. The solubility is reduced by 47% for WI-AX based film, whereas only 22% is found for WS-ES-AX based film (Table 5). The decrease oxygen solubility is not in a direct relationship with the only 10% added CNC which are impermeable and could be probably due to interactions between: CNC and AX matrix, resulting in lower fractional free volume (higher density observed) and leading less opportunity for oxygen to interact with the WI matrix.

| Sample   | Oxygen solubility                 | Oxygen solubility                       |
|----------|-----------------------------------|---|
|          | (mol/m <sup>3</sup> /Pa) AX films | (mol/m <sup>3</sup> /Pa) AX + 10wt% CNC |
| WI-AX    | 1.23 × 10 <sup>-4</sup>           | 0.64 × 10 <sup>-4</sup>                 |
| WS-ES-AX | 1.12 × 10 <sup>-4</sup>           | 0,88 × 10 <sup>-4</sup>                 |

**Table 5 :** The oxygen solubility of AX films and nanocomposite films

The oxygen permeability coefficient measurement has only been performed with WS-EI-AX fraction and its nanocomposite film by using a commercial apparatus which need more samples quantity. The results are presented in Table 6. The oxygen permeability of WS-ES-AX films decrease from 0.84 to 0.60 cm<sup>3</sup>.µm/ m<sup>2</sup>.d. KPa (28% decrease rate) after being reinforced with 10 wt% CNC. As already discussed about the oxygen solubility, the decrease in permeability coefficient also exceeds the 10% CNC contribution indicating that the interactions established between CNC and matrix.

| Sample        | Oxygen permeability                         |                 |
|---------------|---|-----------------|
|               | (cm <sup>3</sup> .µm/m <sup>2</sup> .d.KPa) |                 |
|               | AX film                                     | AX + 10 wt% CNC |
| WS-EI-AX film | 0.84  | 0.60            |

**Table 6 :** The oxygen permeability of AX and nanocomposite films

The oxygen diffusion coefficient has also tried to be measured with “micro test permeation” method as described in chapter 1 for pure AX films. In order to purge oxygen in the film, it has been necessary to take very long time which was not observed for pure AX films. The results of permeability cannot explain this surprising phenomenon. The

experimentations were then given up, as no reasons could be identified leading to strange behavior of the oxygen sensor material in the presence of fibers.

### 3 Conclusion

The objective of the present study was to investigate the morphology and physico-chemical properties of different nanocomposite films based on three different fractions of AX used as matrices in order to focus on filler/matrix interactions as a function of the nature of the matrix. The AX were extracted from destarched wheat bran by alkali solution followed by further fractionation based on the solubility on water and ethanol and represented a wide range of naturally occurring arabinose to xylose ratios (A/X: 0.15, 0.65, 1.14) and degrees of crystallinity equal to 0, 10 and 24 % for their films. The cellulose nanocrystals used for the reinforcement of AX matrices were prepared from cotton linters by applying sulfuric acid hydrolysis.

Beta transition temperature decreases from amorphous to crystalline matrices (higher local macromolecular mobility) whereas the alpha transition temperature increases (lower global macromolecular mobility) as attempted for the more organized AX.

When filled with cellulose nanocrystals (5 or 10 wt %), the degree of crystallinity of AX films is not modified; the water content decreases only at high RH but presents different behaviors depending on the matrix at lower RH; and the beta transition temperature increases significantly for all matrices but a higher increase is noticed for the more substituted fraction. This main result indicates a reduction of the local macromolecular mobility induced by the interactions between nanocrystals and the matrix. These interactions are interestingly more numerous or intense for the amorphous matrix. The alpha transition temperature increases

slightly for the amorphous fraction based films at low and medium investigated RHs. Fibers reinforcement is more efficient for the amorphous fraction regarding the local mobility and could partially be in competition with the crystallinity rate of the others fractions concerning the global mobility.

Both oxygen permeability and solubility decrease when nanocrystals are added but unfortunately all the systems were not able to be studied because of their brittleness and material availability.

## References:

- Anglès, M. N., & Dufresne, A. (2000). "Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Analysis." *Macromolecules*, **33**(22), 8344-8353.
- Bag, R., Beaugrand, J. et al. (2010). "Viscoelastic properties of woody hemp core." *Holzforschung*, **65**(2), 239-247.
- Belbekhouche, S., Bras, J. et al. (2011). "Water sorption behavior and gas barrier properties of cellulose whiskers and microfibrils films." *Carbohydrate Polymers*, **83**(4), 1740-1748.
- Höije, A., Sternemalm, E. et al. (2008). "Material Properties of Films from Enzymatically Tailored Arabinoxylans." *Biomacromolecules*, **9**(7), 2042-2047.
- Lenth, C., and Kamke, F. (2001). "Moisture Dependent Softening Behavior of Wood." *Wood and Fiber Science*, **33**(3), 492-507.
- Mikkonen, K., Mathew, A. et al. (2010). "Glucomannan composite films with cellulose nanowhiskers." *Cellulose*, **17**(1), 69-81.
- Mikkonen, K., Stevanic, J. et al. (2011). "Composite films from spruce galactoglucomannans with microfibrillated spruce wood cellulose." *Cellulose*, **18**(3), 713-726.
- Olsson, A.M., and Salmén, L. (2003). "The Softening Behavior of Hemicelluloses Related to Moisture." *Hemicelluloses: Science and Technology* (pp. 184-197). Washington, DC: American Chemical Society.
- Roohani, M., Habibi, Y. et al. (2008). "Cellulose whiskers reinforced polyvinyl alcohol copolymers nanocomposites." *European Polymer Journal*, **44**(8), 2489-2498.
- Sternemalm, E., Höije, A. et al. (2008). "Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films." *Carbohydrate Research*, **343**(4), 753-757.
- Stevanic, J. S., Joly, C. et al. (2011). "Bacterial nanocellulose-reinforced arabinoxylan films." *Journal of Applied polymer science*, **122**(2), 1030-1039.
- Zhang, Y., Pitkänen, L. et al. (2011). "Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions." *Carbohydrate Polymers*, **86**(2), 852-859.

### **Chapitre 3:**

Arabinoxylanes insolubles isolés à partir de différents co-produits  
céréaliers: Propriétés des films en résultant.

## Résumé :

Les fractions d'arabinoxylanes (AX) insolubles dans l'eau ont été isolées par extraction alcaline (potasse) à partir de trois co-produits différents de céréales tels que la paille de blé, le son de blé et les rafles de maïs. Les AX insolubles ont été retenus car ils représentent la fraction la plus abondante pondéralement obtenue à l'issue du procédé d'extraction décrit dans les chapitres 1 et 2. Toutes les fractions d'AX ont été purifiées par un traitement par la lichenase afin d'éliminer les  $\beta$ -glucanes co-extraits. Les trois fractions insolubles sont nommées WSAX (pour la paille de blé – *wheat straw*) WBAX (pour le son de blé- *wheat bran*) et CCAX (pour les rafles de maïs – *corn cob*). Ces fractions possèdent des degrés de substitution faibles avec des rapports Ara/Xyl respectivement de 0,10, 0,15 et 0,07. Les masses moléculaires moyennes en poids sont à peu près identiques pour WSAX et CCAX (45 000g/mol environ) contre 166 000 g/mol pour WBAX. Les types de substitution sont également variables en fonction des origines botaniques.

Les propriétés des films réalisés à partir de ces trois fractions ont été étudiées. Les polymères sont tous semi-cristallins avec un degré de cristallinité de 26 % pour CCAX, de 24% pour WBAX et de 19 % pour WSAX. Les isothermes de sorption d'eau nous permettent de souligner le comportement plus hydrophile de la fraction WSAX. Les relaxations alpha and beta des chaînes de polymère sont caractéristiques de la structure de ces dernières: outre la plastification classique par l'eau, CCAX présente un comportement particulier traduisant une mobilité macromoléculaire spécifique (plus élevée) attribuée aux groupes pendant plus volumineux jouant le rôle de plastifiant interne. Les propriétés de transport de l'oxygène n'ont pas pu être mesurées du fait de la fragilité des films probablement liée aux faibles masses moléculaires des AX les constituant.

## 1 Introduction

Arabinoxylans (AX) are the major hemicelluloses mostly found in cereal grain co-products such as wheat bran, wheat straw, corn cob etc (Pauly and Keegstra, 2008). The arabinoxylans isolated from high lignified tissues are less substituted by arabinose (Pastell, Virkki et al. 2009). On the counter part, cereal bran such as rye, wheat, oat and rice bran contain highly substituted arabinoxylans (Izydorczyk and Biliaderis, 1995). The AX from wheat bran are reported to possess high average amount of arabinose (Ara/Xyl = 0.60), and to contain large proportions of  $\alpha$ -Araf doubly substituted xylose residues (Zhang, Pitkänen et al. 2011), whereas 4-O-Methyl-GlcpA is present in very small quantity (Bergmans, Beldman et al. 1996). The xylans isolated from corn cob and wheat straw contain low amounts of arabinose with additional 4-O-Methyl-glucuronic acid (Ebringerová, Hromádková et al. 1998). The arabinose to xylose ratios are reported to be 0.33 for corn cob and 0.12 for wheat straw (Pastell, Virkki et al. 2009). The disaccharide side groups in which the  $\alpha$ -L-Araf unit is further substituted with  $\beta$ -D-Xylp were found in AX of corn cob (Ebringerová, Hromádková et al. 1992), but not in wheat straw and wheat bran. The molar mass of AX could be different depending on cereal species. Generally, AX in cereal straws like rye and wheat straw have lower molar mass ranging from 21 760 to 22701 g/mol for rye straw (Xiao, Sun et al. 2001) and 24 000 to 30 000 g/mol for wheat straw (Sun, Tomkinson et al. 2000). Corn cob AX are reported to have higher molar mass between 54 000 and 94 000 g/mol (Hromádková, Kováčiková et al. 1999). Molar mass ( $M_w$ ) of AX isolated from wheat bran are found to be much higher than that of corn cob and wheat straw ranging from 110 000 to 309 000 Da (Hollmann and Lindhauer, 2005; Rémond, Boukari et al. 2008).

AX structure has a strong influence on their film properties. The substitution degree (Ara/Xyl) has been found to correlate with the morphology, thermal stability, water sorption

property and barrier property. The aim of the present study is to focus on water insoluble AX isolated from different cereal by-products and to establish relationships between the structure of these AX and their film properties. These fractions have been selected for their higher yield from previous study (Zhang, Pikänen et al. 2011) and potential lower hydration rate. Indeed, the intrinsic variability of AX in such different cereal species such as substitution degree, type of side chain, and molecular weight is supposed to lead to different physico-chemical properties of the polymers, and likely their film properties. The AX used in this study have been isolated by alkaline extraction and then fractionated to lead to the isolation of a predominant “water insoluble AX fraction” (Zhang, Pitkänen et al. 2011).

## **2 Results and discussion**

### **2.1 Chemical composition of water insoluble fractions**

Three water insoluble AX fractions were obtained from three types cereal by products. The arabinoxylans isolated from wheat Straw are named: WSAX; from wheat Bran were named WBAX; and CCAX for Corn Cob.

The wheat bran was reported to contain about 40% of AX related to dry matter. The wheat straw and corn cob using in our study were found to contain 25% and 32% of AX (related to dry matter, data not shown). According to isolation procedure employed, the extraction yields were calculated base on several extractions.  $41.7 \pm 4.9$  % of AX originally present was extracted from destarched wheat bran,  $39.2 \pm 2.3$  % from wheat straw and  $38.4 \pm 4.0$  % from corn cob (Table 1). As discussed in Chapter 1, the substitution degree (Ara/Xyl) can vary depending on the different extraction lots. The variation of Ara/Xyl ratios were analyzed for the water insoluble fractions of wheat straw and corn cob. The results included the previous analysis for wheat bran is shown in Table 1.

| Samples | Ara/Xyl <sup>a</sup> ( water insoluble fraction) | Extraction yield <sup>b</sup> % |
|---------|--|---------------------------------|
| WSAX    | 0.10 ± 0.02                                      | 39.2 ± 2.3                      |
| WBAX    | 0.15 ± 0.03                                      | 41.6 ± 4.9                      |
| CCAX    | 0.07 ± 0.01                                      | 38.4 ± 4.0                      |

**Table 1 :** The substitution degree and extraction yields of interfractions of AX from wheat straw, wheat bran and corn cob.

<sup>a</sup>: Arabinose to xylose molar ratios (the values were calculated based on 11 extractions for wheat bran samples, 3 extractions for wheat straw samples and corn cob samples).

<sup>b</sup>: the extracted amounts of AX (before fractionation) related to the total AX originally present in dry matter (the values were calculated based on 11 extractions for wheat bran samples, 3 extractions for wheat straw samples and corn cob samples)

The chemical compositions of the three isolated AX fractions are presented in Table 2. All the three fractions possess high purity with sugar contents higher than 74%. The arabinoxylan contents vary between 61% and 69%. After  $\beta$ -glucans removal by lichenase treatment, all the samples contain very minor amounts of glucose. All the three AX fractions from three different cereals co-products present low Ara/Xyl ratios ranging from 0.07 to 0.15. AX from wheat bran seems to be the most highly substituted, whereas AX from corn cob is the least substituted by arabinose. These low substitution degrees are normal for the “water insoluble” fractions as it is known that for the soluble ones, the side groups (the  $\alpha$ -arabinofuranose) might sterically hinder hydrogen bonding formed between the main chains and thus increase the solubility (Andrewartha, Phillips et al. 1979). Ebringerova et al. (Ebringerová, Hromádková et al. 1997) obtained AX from corn cob containing 7.4 - 9.1% uronic acid. AX from wheat straw were reported to possess uronic acid content ranging from 4.8 to 5.5% of dry matter (Sun, Tomkinson et al. 2000), whereas wheat bran was found to contain lower amount uronic acid (around 2.5 wt%). These three cereal by-products contain very low amounts of proteins (around 2 wt.% of dry matter) (Misra, Mehra et al. 2006; Zhang, Pitkänen et al. 2011). In our AX samples, the high contents of proteins are attributed to contaminating enzymes used in order to remove  $\beta$ -glucan.

| Samples | Sugars % <sup>a</sup> | Ara + Xyl % <sup>a</sup> | Glc % <sup>a</sup> | Ara /Xyl <sup>b</sup> | Proteins content (%) |
|---------|-----------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
| WSAX    | 81                    | 61                       | 3                  | 0.10                  | 4.8                  |
| WBAX    | 74                    | 64                       | 3                  | 0.15                  | 10.8                 |
| CCAX    | 83                    | 69                       | 7                  | 0.07                  | 5.5                  |

**Table 2:** Chemical composition of AX isolated fractions

<sup>a</sup>: % of dry matter

<sup>b</sup>: molar ratio

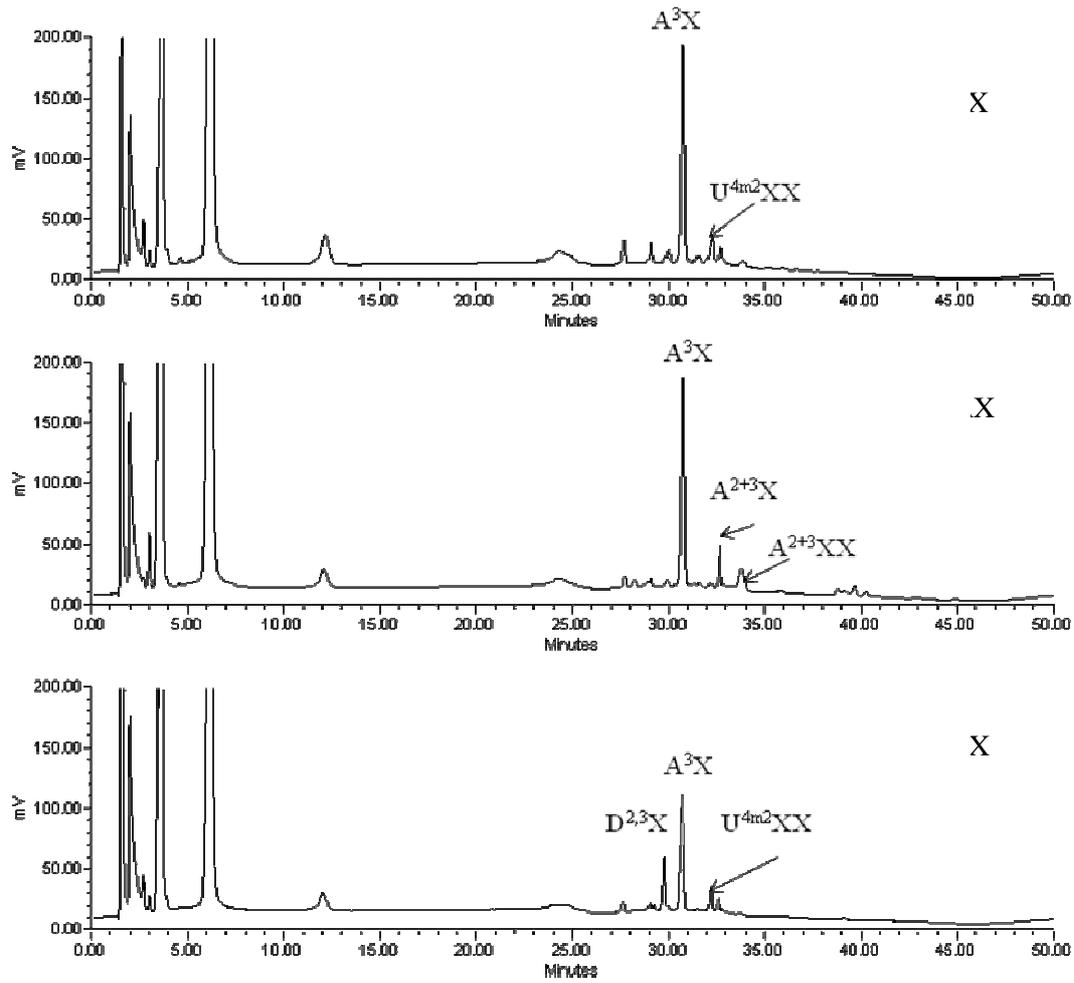
## 2.2 Analysis of the substitution patterns

The AX have been hydrolyzed by endoxylanase (Shearzyme, glycoside hydrolase family 10 enzyme) to produce short arabinoxylo-oligosaccharides (AXOS) further analyzed by high-performance anions exchange chromatography. The produced AXOS are identified by comparing with purified AXOS which are used as standards as previously described by Pastell et al., (Pastell, Tuomainen et al. 2008). The AXOS abbreviation and their corresponding structures are listed in Table 3. As observed in Figure 1, all the AXOS are eluted after 25 min. The predominant peak in all three AX samples is eluted at 30.7 min and is identified as A<sup>3</sup>X. It could indicate that the main substituent in all AX samples is (1→3) linked  $\alpha$ -L-Araf. Similar proportions of A<sup>3</sup>X are found in wheat bran and wheat straw, whereas this motif is less abundant in corn cob. The  $\beta$ -D-Xylp residues disubstituted by arabinose A<sup>2+3</sup>X and A<sup>2+3</sup>XX, eluting at 33.2 and 34.8 min respectively, appear clearly in AX from wheat bran (WBAX). AX from wheat straw (WSAX) and corn cobs contain only traces of disubstituted  $\beta$ -D-Xylp residues with very minor peaks. The disaccharide substitution, D-Xylp-L-Araf side group (D<sup>2,3</sup>X) with elution time at 29.7 min, is only found in AX from corn cob with a significant proportion. An uronic acid oligosaccharide motif is also identified (U<sup>4m2</sup>XX). Its peak appears at 32.7 min in AX from wheat straw and corn cob but not in that from wheat bran even if wheat bran was found to contain 2.5 % uronic acid in the total carbohydrate content (Benamrouche, Crônier et al. 2002). Wheat bran AX contains the largest

proportion of  $\alpha$ -Araf doubly substitution among the eight types AX isolated from the different cereal co-products. The disaccharide side group 2-*O*- $\alpha$ -D-Xylp-L-Araf is also found in corn cob AX with significant proportion. Wheat straw and corn cob AX contain similar minor amounts of the uronic acid oligosaccharide U<sup>4m2</sup>XX.

According the previous work realized by Pastell et al. (Pastell, Virkki et al. 2009), the A<sup>3</sup>X has much better response in PAD detection; the response factors are 50% for A<sup>2+3</sup>XX and D<sup>2,3</sup>X, and 70% for A<sup>2+3</sup>X respectively. Thus the AXOS proportion could be estimated on the height of peaks basis. In the corn cobs hydrolyzate, AX contains almost the same amounts of D<sup>2,3</sup>X and A<sup>3</sup>X. The di-substituted oligosaccharides (A<sup>2+3</sup>X + A<sup>2+3</sup>XX) found in wheat bran AX present about a half amount of A<sup>3</sup>X.

These AXOS profiles are supposed to represent most of the xylan structures. Indeed, the Shearzyme endo-xylanase was reported to hydrolyze preferentially the xylans with low amounts of substituents (Beaugrand, Chambat et al. 2004) as it is the case for these studied water insoluble AX. However, the poor solubility of the water insoluble AX in aqueous solution could be a factor affecting the enzyme performance.



**Figure 1:** HPAEC chromatograms of the oligosaccharides obtained from WSAX, WBAX and CCAX after hydrolysis with Shearzyme xylanase.

| <b>AXOS</b>              | <b>Name</b>   | <b>Structure</b>          |
|--------------------------|---|---------------------------|
| <b>A<sup>3</sup>X</b>    | $\alpha$ -L-Araf-(1→3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xyl   | A<br> <br>X - X           |
| <b>A<sup>2+3</sup>X</b>  | $\alpha$ -L-Araf-(1→2)-[ $\alpha$ -L-Araf-(1→3)]- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xylp                        | A A<br> /<br>X - X        |
| <b>A<sup>2+3</sup>XX</b> | $\alpha$ -L-Araf-(1→2)-[ $\alpha$ -L-Araf-(1→3)]- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xylp | A A<br> /<br>X - X - X    |
| <b>D<sup>2,3</sup>X</b>  | $\beta$ -D-Xylp-(1→2)- $\alpha$ -L-Araf-(1→3)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xyl                            | X<br> <br>A<br> <br>X - X |
| <b>U<sup>4m2</sup>XX</b> | 4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA-(1→2)- $\beta$ -D-Xylp-(1→4)-D-Xyl  | MeGlcA<br> <br>X - X - X  |

**Table 3:** The different arabinoxylo-oligosaccharides identified by HPAEC

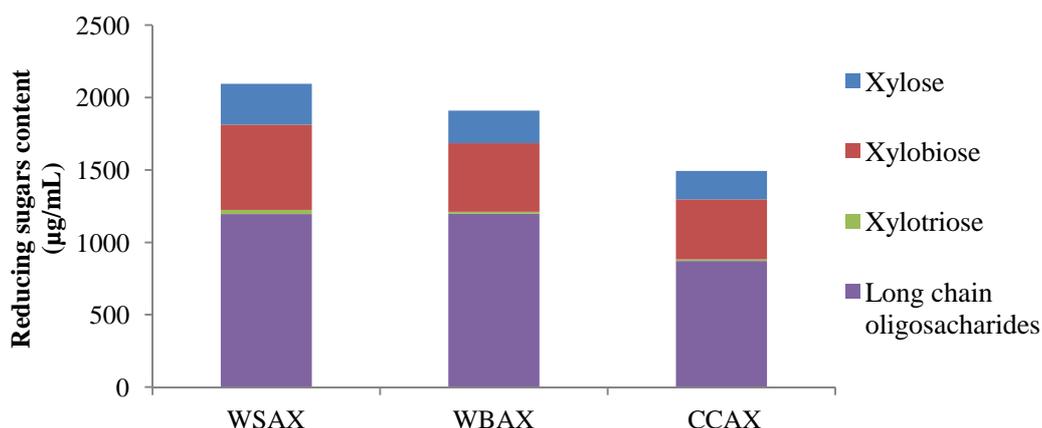
### 2.3 Analysis of hydrolytic efficiency of Shearzyme

In order to compare the hydrolytic efficiency of the xylanase on the three AX fractions, the amount of reducing sugars produced by the xylanase during hydrolysis of AX have been quantified. The reducing sugars contents in the hydrolyzates have been determined by dinitrosalicylic acid (DNS) assay. The xylose, xylobiose and xylotriose contents have been also quantified to analyze the hydrolytic capacity using high performance anion exchange chromatography (HPAEC-PAD). The hydrolytic yield is calculated based on the theoretical reducing sugar contents compared to the experimental values (Table 4). Figure 2 presents the reducing sugar contents and the contributions of the different oligosaccharides in the total reducing sugars amounts. The percentage values of “long chain” oligosaccharides (polymerization degrees > 3) are calculated by subtracting the amounts of xylose, xylobiose and xylotriose. The hydrolytic yields decrease from WS-AX (75%) to CCAX (49%). The experimental reducing sugars concentrations decrease also respectively from wheat straw AX

(WSAX) to wheat bran AX (WBAX) and to corn cob AX (CCAX). CCAX presents the lowest branched degree leading to a probable lowest solubility in aqueous solution. This could thus cause lower hydrolytic efficiency of the enzyme on this sample. The highest long chain oligosaccharides contribution is found to be 62% in wheat bran AX, and the lowest was 57% in wheat straw AX. The WBAX presents a high branched degree ( $A/X=0.15$ ) and a large proportion of di-substituted  $\beta$ -D-xylopyranosyl residues with  $\alpha$ -Araf. As the endo-xylanase was not able to hydrolyze the highly substituted parts, the enzyme is slightly less efficient on WBAX. Xylanase seems to be most efficiently active on WSAX due to the highest reducing sugars content produced and the lowest long chain oligosaccharides contribution, whereas WSAX possess a moderate substitution degree among the samples. This high efficiency of xylanase could be attributed to the more simple structure of AX from wheat straw. As described from Figure 1, the AXOS chromatograms revealed that WSAX structure is related mainly to (1 $\rightarrow$ 3) linked  $\alpha$ -Araf substituents and to small amounts of 4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA, whereas disubstituted xylose residues and disaccharide side groups are found in WBAX and CCAX in relatively large amounts.

| <b>Samples</b> | <b>Theoretical reducing sugar contents (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>Experimental reducing sugar contents (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>Hydrolytic yield %</b> |
|----------------|--|---|---------------------------|
| <b>WSAX</b>    | 2804   | 2095  | 75%                       |
| <b>WBAX</b>    | 3103   | 1929  | 62%                       |
| <b>CCAX</b>    | 3086   | 1493  | 49%                       |

**Table 4 :** The theoretical and experimental reducing sugar contents and hydrolytic yield.



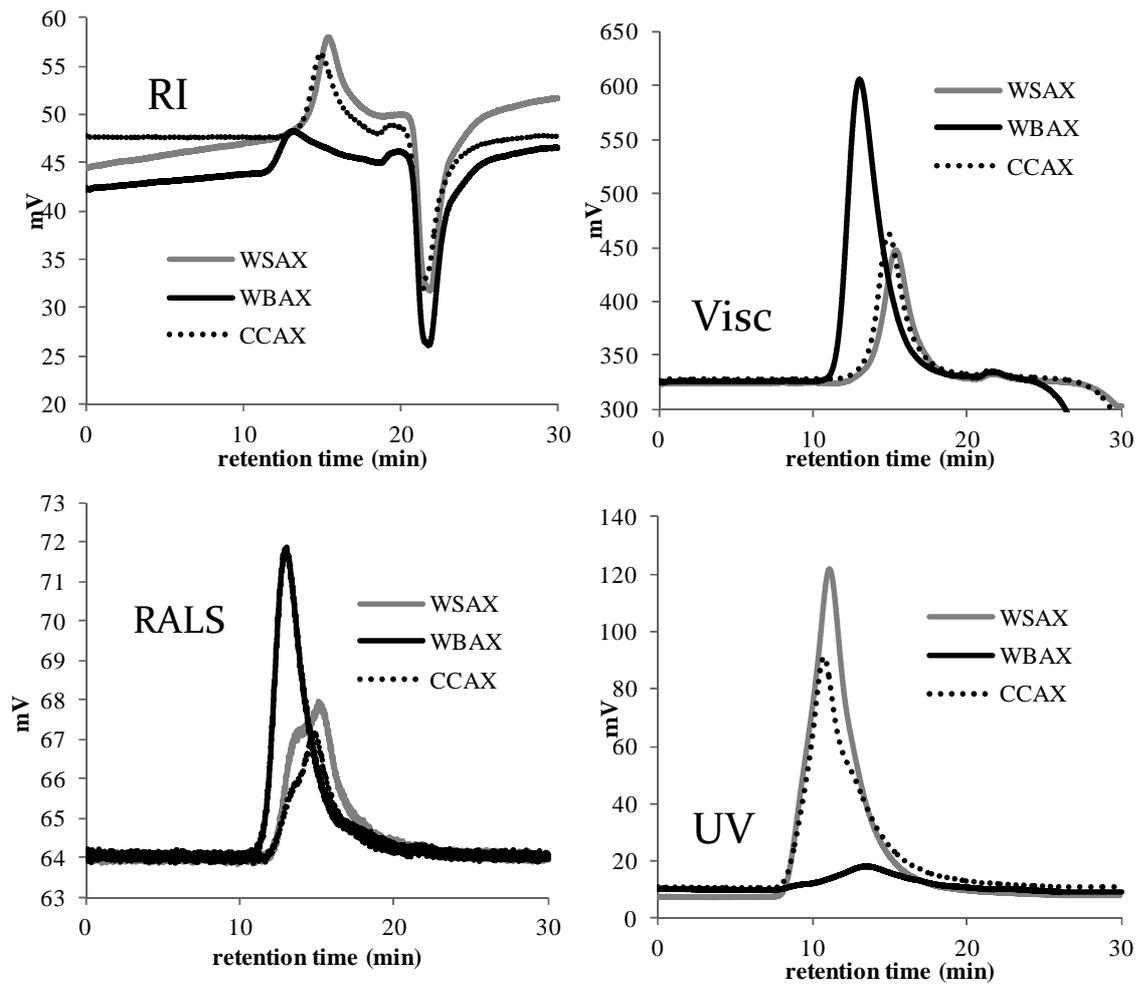
**Figure 2:** The reducing sugars contents and the contribution of AXOS in the hydrolyzate

## 2.4 HPSEC analysis

All molar masses were determined in DMSO solution containing 0.01 M LiBr using gel permeation chromatography. The results are shown in Table 5. DMSO seems to be a good solvent to solubilize the AX fractions (Pitkanen, Virkki et al. 2009). In fact good recoveries are found ranging from 67% to 93% for all samples. AX from wheat straw and corn cob are eluted nearly at the same time whereas AX from wheat bran is eluted earlier (Figure 3). This indicates that AX from wheat straw and corn cob have similar molar mass, which are almost 3-fold lower than that of wheat bran. This difference is also demonstrated by RALS peak intensities: wheat bran AX is eluted with the highest light scattering peak intensity. The intrinsic viscosity increases usually with increasing molar mass. The lower intrinsic viscosity found in WSAX and CCAX could be related to corresponding lower molar mass. Moreover, AX from wheat straw and corn cob present probably less homogeneity due to higher polydispersity index. The RALS signal in WSAX and CCAX shows distinct shoulders, indicating partial aggregation of the samples. The UV peaks are situated before the RALS main peaks and nearly at the same position with the shoulder peaks. The UV peak intensity of AX wheat straw and corn cob are quite higher than wheat bran sample one. These features could be attributed to higher amounts of uronic acid side groups, which might be more selective to be attached with impurities such as phenol acid (Fry, 1986).

| Samples | A/X  | M <sub>w</sub> (Da) | IV- (dl/g) | Polydispersity | Recovery (%) |
|---------|------|---------------------|------------|----------------|--------------|
| WSAX    | 0.10 | 46 000              | 0.56       | 1.92           | 71           |
| WBAX    | 0.15 | 166 000             | 2.42       | 1.30           | 67           |
| CCAX    | 0.07 | 43 000              | 0.67       | 1.54           | 93           |

**Table 5:** Molar mass average (M<sub>w</sub>), intrinsic viscosity (IV), polydispersity and recovery obtained from HPSEC.



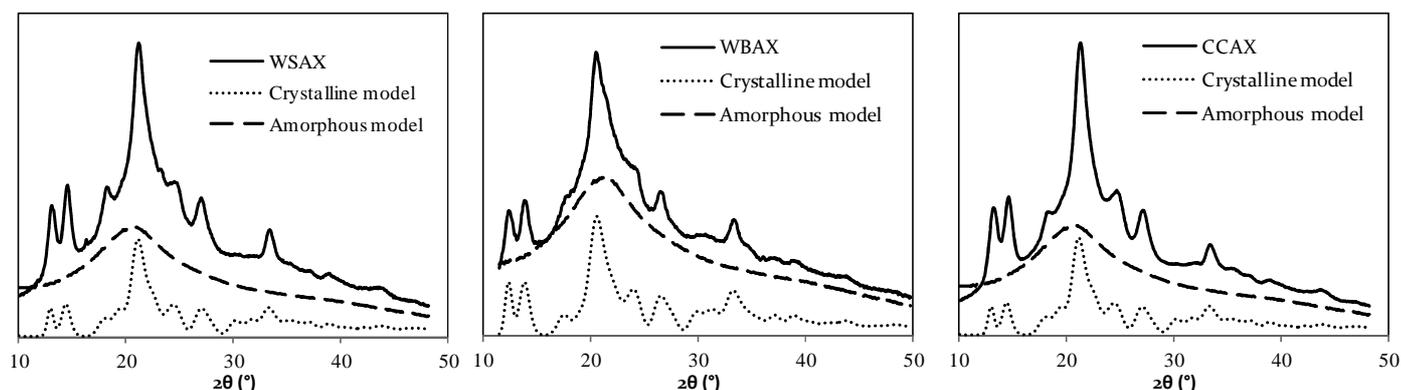
**Figure 3:** Chromatograms of HPSEC obtained by detectors of refractive index, viscometer and UV.

## 2.5 X-ray analysis

The X-ray analysis was carried out to evaluate the crystallinity of AX films (Figure 4). A highly substituted AX samples from wheat bran showing complete amorphous structure is used as amorphous background in order to calculate the degree of crystallinity,  $\phi$ , as follows:

$$\phi = 1 - \left( \frac{\sum I_{\text{amorphous}}}{\sum I_{\text{measured}}} \right),$$

where  $I_{\text{amorphous}}$  is the intensity scattered from amorphous regions, i.e. the amorphous background fitted into the diffraction profile, and  $I_{\text{measured}}$  is the total measured intensity. All AX samples present a semi-crystalline morphology according to their low degree of substitution (ranging from 0.07 to 0.15). From diffraction pattern profiles, diffraction peaks could be defined for all AX films. Table 6 shows the calculated degrees of crystallinity of AX films. The higher peak intensities could be observed for AX from wheat straw and corn cob. The degrees of crystallinity are the same for corn cob ( $26 \pm 4\%$ ) and wheat bran ( $24 \pm 4\%$ ) but present a slightly lower value for wheat straw ( $19 \pm 4\%$ ). Other studies have been determined AX crystallinity degree from other plants. For example, a debranched AX isolated from rye was reported to present a degree of crystallinity at  $19 \pm 3\%$  with Ara/ Xyl ratio of 0.16 (Stevanic, Joly et al. 2011). The AX from oat spelt plasticized with 10% glycerol had a crystallinity degree of 23% (Mikkonen, Heikkinen et al. 2009).



**Figure 4 :** X-ray diffraction profiles

| Samples | Ara/Xyl | Crystallinity (%) |
|---------|---------|-------------------|
| WSAX    | 0.10    | $19 \pm 4$        |
| WBAX    | 0.15    | $24 \pm 4$        |
| CCAX    | 0.07    | $26 \pm 4$        |

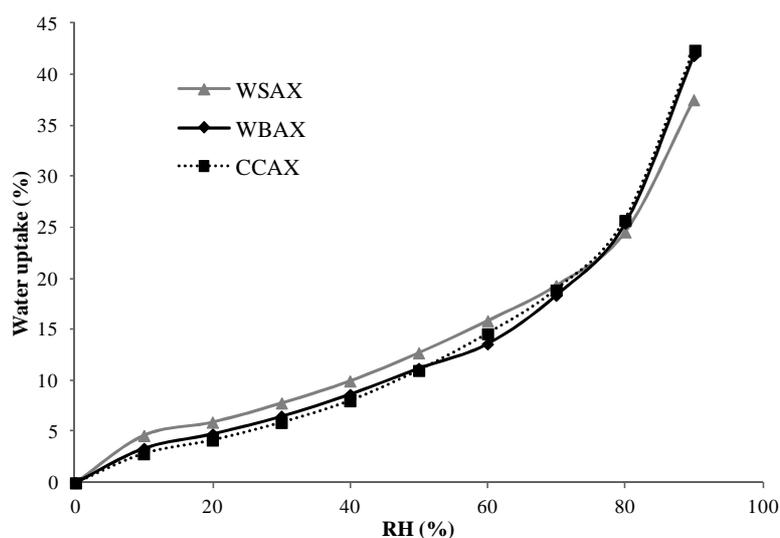
**Table 6:** Degree of crystallinity of extracted AX

The crystallite size in different direction is calculated using the Scherrer equation. Only the two defined diffraction peaks (100 at 11.1° and 011 at 12.5°) are served to calculate. The single xylan crystallite size is found approximately the same values for all samples, near 11 nm for both (100) and (011) lattice planes.

The xylan chains were known to be arranged in the form of double helices. A hexagonal crystal structure was also identified for crystalline xylan (Nieduszynski & Marchessault, 1972). The unit cell dimension ( $a = b$ ) perpendicular to the chain axis of xylan is determined in this study. The crystal parameter are found to be the same for corn cob and wheat bran samples ( $a = b = 9.10 \text{ \AA}$ ). A less compact structure is discovered for wheat straw samples as  $a = b = 9.17 \text{ \AA}$ . For all samples, the parameter  $c$  in the horizontal direction of the chain axis remains constant. By comparing the crystal parameters with the xylan dihydrate model ( $a = b = 9.64$ ), all the samples seem to have more compact structures in perpendicular direction of the chain axis.

The results obtained are in good agreement with the previous study. Mikkonen et al. (Mikkonen, Heikkinen et al. 2009) analyzed the films of AX from oat spelt with Ara/Xyl of 0.14. The crystallinity was found between 20 and 26% containing various levels of plasticizer. The film prepared with debranched rye AX (Ara/Xyl: 0.16) possessed a crystallinity of 19% (Stevanic, Joly et al. 2011).

## 2.6 Water sorption properties



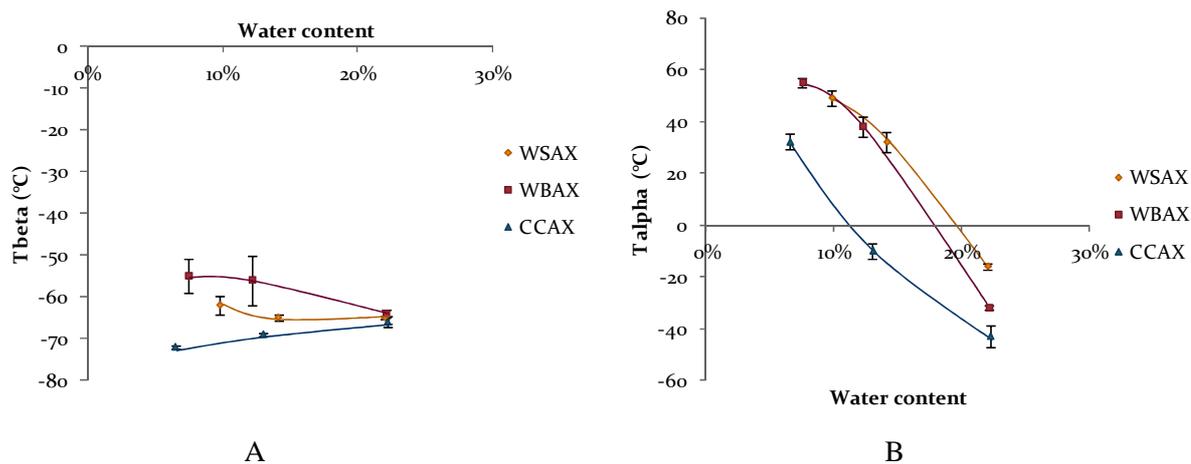
**Figure 5 :** Water sorption isotherms curves

Water sorption behavior of AX samples are shown in Figure 5. From the isotherms, it is obvious that the samples water contents increase with increasing relative humidity. AX from wheat bran and corn cob present very similar water sorption behavior throughout all the investigated humidities although corn cob AX has a lower Ara/Xyl ratio than wheat bran AX and contain much more uronic acid as side groups. Generally, the presence of charged groups on the molecule could encourage water uptake, but in this study, no significant difference was observed between the two samples. AX from wheat straw presents a special behavior: by comparing with wheat bran and corn cob samples, wheat straw AX absorbs more water under 80% RH and less water upper 80% RH.

The water sorption behavior is not very well correlated to the Ara/Xyl ratios, although such correlation was obtained previously (Zhang, Pitkänen et al. 2011, chapter 1). At low and moderate RH, the highest hydration rate is found in wheat straw AX with moderated substitution degree. This phenomenon could be due to the simple decorating units of wheat straw AX: only singly substituted  $\alpha$ -Araf residues were appeared allowing probably more sites for hydrogen bonding with water. At higher relative humidity, wheat straw AX sorbs less water (35%) than the other species (close to 43%).

## 2.7 Viscoelastic properties

A dielectric analyzer (DEA) was used in order to analyze the AX chain mobility through the viscoelastic properties of polymers. The results are presented in Figure 6. The samples water contents were obtained previously from isotherm water sorption measurement.



**Figure 6:** Average values of beta transition temperatures and alpha transition temperatures of prehydrated AX films as a function of the water content. A: Beta relaxation temperature curves B: Alpha relaxation temperature curves

### - T beta

The beta relaxation temperatures were measured on films pieces prehydrated at three different relative humidities (33%, 54% and 75%). The results are presented in the Figure 6A. The local mobility of polymer chain is studied by the beta transition temperature. The higher the beta transition temperature is, the lower the local chain mobility is. A relationship between the beta transition and the structure of AX films from wheat bran were demonstrated by Zhang et al. (Zhang, Pitkänen et al. 2011). Indeed, the beta transition temperature increased (local chain mobility decrease) when the substitution degree increased: This loss of local mobility has been attributed to the intermolecular hydrogen bond network established thanks to the presence of arabinose side group, which could stiffen the polymer chain. In this present study, the substitution degree decreases as following WBAX > WSAX > CCAX. The highest beta transition is obtained for WBAX whereas the lowest are found for CCAX throughout all

relative humidities. This result corresponds well with our previous study, the beta transition temperature being still well correlated to the arabinose substituent amounts.

In Figure 6A, the evolution of T beta as a function of the water content is displayed. For WBAX and WSAX, T beta decrease with the hydration rate as often reported for plasticizing effect. Unexpectedly, a T beta increase is noticeable for the CCAX samples when the RH increases (from -72°C at 33% RH to -66°C at 75% RH). The increase of the  $T_{\beta}$  with water content increase suggests that complex interaction occurs between water and the lateral groups of CCAX. The rotation movements are shifted into correlated motion of water and lateral groups.

- T alpha

The alpha transitions which mean the global polymer chain mobility were also measured using the dielectric analyzer. The results are presented in Figure 6B. The alpha transition temperatures are influenced by several parameters such as the substitution degree, the crystallinity degree and the molar mass of polymer etc. At low relative humidity (< 54 % RH), similar alpha transitions are observed for AX of wheat bran and wheat straw, but corn cob AX are much lower. As expected, T alpha decrease when the hydration rate increases due to plasticization by water. Meanwhile, AX sample of corn cob presents much lower alpha transition temperatures. This is noticeable as even this sample has similar substitution degree, molar mass and crystallinity degree as AX of wheat straw especially below 20% of water content. The lower T alpha observed for CCAX could be related to the presence of specific longer side branch ( $D^{2,3}X$ ) leading to a less compacted conformation in amorphous part (acting as an internal plasticizer). AX of corn cob have then the highest polymer chain mobility. Wheat straw AX sample has a higher T alpha than wheat bran AX which has a more significant drop at 75% RH.

### 3 Conclusion

The three water insoluble arabinoxylans fractions are isolated from different cereal co-products such as wheat straw, wheat bran and corn cob. The three fractions are obtained by alkali extraction and a fractionation step is further carried out by water. The AX fractions display a different ratio Ara/Xyl ranging from 0.07 for corn cob AX to 0.15 for wheat bran AX, various molar mass ranging from 43 000 g/mol for corn cob AX to 166 000 g/mol for wheat bran sample and also different substitution patterns.

According to the variation of their compositions and structures, their films demonstrate different physico-chemical properties. The results indicate that corn cob AX has a slightly higher crystallinity degree with the lowest Ara/Xyl. The wheat straw sample has a different water sorption behavior which could be due to simple decorating units allowing more sorption sites. The local chain mobility decreases with increasing Ara/Xyl ratios. The corn cob AX presents a significant highest global chain mobility (lowest T<sub>α</sub>) probably due to its longer side group (D<sup>2,3</sup>X) acting as internal plasticizer (or “spacer chain”).

## References:

- Andrewartha, K. A., Phillips, D. R., et al. (1979). "Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans." Carbohydrate Research, **77**(1), 191-204.
- Beaugrand, J., Chambat, G., et al. (2004). "Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans." Carbohydrate Research, **339**(15), 2529-2540.
- Benamrouche, S., Crônier, D., et al. (2002). "A Chemical and Histological Study on the Effect of (1 $\rightarrow$ 4)-[ $\beta$ ]-endo-xylanase Treatment on Wheat Bran." Journal of Cereal Science, **36**(2), 253-260.
- Bergmans, M. E. F., Beldman, G., et al. (1996). "Optimisation of the Selective Extraction of (Glucurono)arabinoxylans from Wheat Bran: Use of Barium and Calcium Hydroxide Solution at Elevated Temperatures." Journal of Cereal Science, **23**(3), 235-245.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., et al. (1998). "The immunologically active xylan from ultrasound-treated corn cobs: extractability, structure and properties." Carbohydrate Polymers, **37**(3), 231-239.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., et al. (1992). "Structural and solution properties of corn cob heteroxylans." Carbohydrate Polymers, **19**(2), 99-105.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., et al. (1997). "Effect of ultrasound on the immunogenic corn cob xylan." Ultrasonics Sonochemistry, **4**(4), 311-315.
- Fry, S. C. (1986). "Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms." Annual Review of Plant Physiology, **37**(1), 165-186.
- Höjje, A., Sternemalm, E., et al. (2008). "Material Properties of Films from Enzymatically Tailored Arabinoxylans." Biomacromolecules, **9**(7), 2042-2047.
- Hollmann, J., and Lindhauer, M. G. (2005). "Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran." Carbohydrate Polymers, **59**(2), 225-230.
- Hromádková, Z., Kováčiková, J., et al. (1999). "Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan." Industrial Crops and Products, **9**(2), 101-109.
- Izydorczyk, M. S., and Biliaderis, C. G. (1995). "arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties." Carbohydrate Polymers, **28**(1), 33-48.
- Mikkonen, K. S., Heikkinen, S., et al. (2009). "Films from oat spelt arabinoxylan plasticized with glycerol and sorbitol." Journal of Applied polymer science, **114**(1), 457-466.
- Misra, A. K., Mehra, U. R., et al. (2006). "Assessment of feeding urea ammoniated wheat straw on growth performance, feed intake and nutrient utilization in crossbred calves reared under stall-fed or grazing condition." Livestock Research for Rural Development, **18**, 11.
- Nieduszynski, I. A., and Marchessault, R. H. (1972). "Structure of  $\beta$ ,D(1 $\rightarrow$ 4)-xylan hydrate." Biopolymers, **11**(7), 1335-1344.
- Pastell, H., Tuomainen, P., et al. (2008). "Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted arabinoxylo-oligosaccharides with non-reducing end terminal branches." Carbohydrate Research, **343**(18), 3049-3057.
- Pastell, H., Virkki, L., et al. (2009). "Presence of 1 $\rightarrow$ 3-linked 2-O-[ $\beta$ ]-d-xylopyranosyl-[ $\alpha$ ]-l-arabinofuranosyl side chains in cereal arabinoxylans." Carbohydrate Research, **344**(18), 2480-2488.
- Pauly, M., and Keegstra, K. (2008). "Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels." The Plant Journal, **54**(4), 559-568.
- Pitkanen, L., Virkki, L., et al. (2009). "Comprehensive Multidetector HPSEC Study on Solution Properties of Cereal Arabinoxylans in Aqueous and DMSO Solutions." Biomacromolecules, **10**(7), 1962-1969.

- Rémond, C., Boukari, I., et al. (2008). "Action of a GH 51 [alpha]-l-arabinofuranosidase on wheat-derived arabinoxylans and arabino-xylooligosaccharides." Carbohydrate Polymers, **72**(3), 424-430.
- Stevanic, J. S., Joly, C., et al. (2011). "Bacterial nanocellulose-reinforced arabinoxylan films." Journal of Applied polymer science, **122**(2), 1030-1039.
- Sun, R. C., Tomkinson, J., et al. (2000). "Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction." Polymer, **41**(7), 2647-2656.
- Xiao, B., Sun, X. F., et al. (2001). "Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw." Polymer Degradation and Stability, **74**(2), 307-319.
- Zhang, Y., Pitkänen, L., et al. (2011). "Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions." Carbohydrate Polymers, **86**(2), 852-859.

## **Discussion générale et perspectives**

## Discussion générale

Le travail de thèse s'est focalisé sur plusieurs fractions d'arabinoxylanes (AX) isolés à partir de divers organes (paille, son, rafles) et de deux espèces végétales différentes (blé, maïs). L'objectif de ce travail était (1) d'étudier les relations entre les compositions et les structures de ces arabinoxylanes et certaines de leurs propriétés physico-chimiques lorsqu'ils sont mis en œuvre sous forme de films; (2) d'étudier l'impact d'un ajout de nanocristaux de cellulose sur les propriétés des films nanocomposites à base d'AX.

Les enjeux de la thèse sont : (1) de tirer partie de la variabilité structurale intrinsèque des hémicelluloses (origines végétales et fractionnement), (2) d'étudier les propriétés des films renforcés par des nanocharges de cellulose.

Dans un premier temps, les travaux ont visé à produire un large panel d'AX à partir de trois ressources végétales différentes de plantes annuelles (paille de blé, son de blé, rafles de maïs) afin de disposer de polymères présentant des compositions variées, des structures ainsi que des masses moléculaires variées. Les différentes populations d'AX ont été extraites par un même procédé alcalin (potasse) et séparées en trois fractions en fonction de leur solubilité dans l'eau et dans l'éthanol (50%, v/v). Les fractions d'AX obtenues sont :

- 1) insolubles dans l'eau : WI-AX
- 2) solubles dans l'eau et insolubles dans l'éthanol 50% : WS-EI-AX
- 3) solubles dans l'eau et solubles dans l'éthanol 50% : WS-ES-AX

Le procédé d'extraction mis en œuvre durant notre étude a permis d'obtenir des rendements d'extraction satisfaisants s'élevant à 42% (AX de son de blé), 39% (AX de paille de blé) et 38% (AX de rafles de maïs). Dans la littérature, Bataillon et al. (Bataillon, Mathaly et al. 1998) ont isolé les AX de son de blé par de la soude à différentes concentrations. Les rendements d'extraction variaient de 19 à 35% en augmentant la concentration de la base. Un rendement plus élevé (environ 50%) a été obtenu par Hollmann et al. (Hollmann and Lindhauer 2005) lors de l'extraction des AX de son de blé par du peroxyde d'hydrogène à 2%. Dans le cas de la paille de blé, Sun et al. (Sun, Lawther et al. 1996) ont réalisé des extractions successives des AX avec des concentrations de soude croissantes conduisant à un rendement d'extraction de 33,5%. A partir de rafles de maïs, Hromadkova et al. (Hromádková, Kováčiková et al. 1999) ont obtenu des rendements d'extraction des AX variant de 31,5 à 38,1% en fonction de la concentration de la base, de la température d'extraction et de la mise en œuvre éventuelle d'un traitement aux ultrasons. Les rendements obtenus dans notre cas sont sans doute non optimaux mais satisfaisants en regard du but de ce travail, centré sur la

caractérisation des AX. Durant ce travail de thèse, il a été nécessaire de réaliser plusieurs extractions-fractionnements d'AX pour chacune des ressources végétales devant les faibles quantités produites à chaque extraction à l'échelle du laboratoire (environ 10 grammes) et les besoins nécessaires à la caractérisation. Ceci nous a conduits à gérer de multiples lots d'AX extraits et à caractériser systématiquement de multiples « blancs ». Une extraction semi-pilote du substrat de base (son de blé désamidonné) aurait sans doute été judicieuse.

Les résultats de composition en sucres des divers lots d'AX produits indiquent une variabilité relativement élevée en terme de rapport Ara/Xyl ce qui reflète une hétérogénéité importante du matériel de départ (hétérogénéité des xylanes dans les parois végétales). Cependant quelle que soit la biomasse végétale utilisée, le fractionnement des AX en fonction de leur solubilité dans l'eau et l'éthanol a permis d'obtenir trois fractions distinctes de par leur rapport Ara/Xyl et ceci pour toutes les extractions réalisées. La pureté des AX s'est avérée relativement importante puisque les teneurs en lignines et en protéines étaient inférieures à 2% et 5,6% respectivement pour toutes les fractions d'AX. En revanche, la teneur en glucose de certaines fractions est importante notamment dans le cas des AX insolubles dans l'eau (13% pour WI-HC de son de blé, 24% pour WI-HC de paille de blé, 7,2% pour WI-HC de rafles de maïs ; le terme HC-hémicelluloses correspondant aux AX avant action de la lichenase). Des interactions intermoléculaires entre xylanes et  $\beta$ -glucanes décrites par Izydorczyk et al (Izydorczyk and Biliaderis 2000) pourraient être à l'origine d'une co-extraction des  $\beta$ -glucanes lors de l'extraction alcaline des AX. Un traitement des fractions avec une lichenase a permis de réduire la teneur en glucose mais en parallèle une augmentation de la teneur en protéines a été observée au sein des fractions traitées.

Pour la suite de nos études, nous avons choisi de travailler avec les trois types de fractions obtenues à partir du son de blé (WI-AX, WS-EI-AX, WS-ES-AX) ainsi qu'avec les fractions insolubles dans l'eau (WI-AX) obtenues à partir de la paille de blé et des rafles de maïs. Ce choix a été guidé par les quantités d'AX obtenues au sein de chaque fraction. Le rapport Ara/Xyl est retenu comme paramètre d'étude permettant la caractérisation des AX.

#### - **Caractérisation de la composition, de la structure et des masses moléculaires des arabinoxylanes**

Dans notre étude concernant les AX de son de blé, les trois fractions d'AX présentent des rapports Ara/Xyl variant de 0,15 (WI-AX) à 1,14 (WS-ES-AX) (valeurs moyennes établies après répétition du procédé de fractionnement). Plus le degré de substitution par les

résidus arabinosyl est important, plus les AX sont solubles dans l'eau et dans l'éthanol. Le type de substitution a été étudié après hydrolyse des AX en arabinoxylo-oligosaccharides (AXOS) par une xylanase. Les AXOS obtenus ont été comparés par HPLC à des AXOS connus (comparaison des temps de rétention) permettant ainsi d'obtenir des informations quant aux motifs structuraux présents au sein des chaînes d'AX. Le motif xylose monosubstitué par l'arabinose en  $\alpha$ -1,3 ( $A^3X$ ) est présent en quantité importante dans la fraction WI-AX alors qu'il est peu présent dans la fraction WS-ES-AX. Les résidus xylosyl di-substitués en  $\alpha$ -1,2 et  $\alpha$ -1,3 par l'arabinose ( $A^{2+3}X$  et  $A^{2+3}XX$ ) sont principalement présents dans la fraction WS-ES-AX. Les quantités de mono-substitutions et di-substitutions sont très proches dans la fraction WS-EI-AX.

Afin d'évaluer l'efficacité de la xylanase et ainsi obtenir des informations quant à la représentativité des motifs structuraux détectés par rapport à l'ensemble des polymères d'AX étudiés, des dosages de sucres réducteurs ont été effectués dans les hydrolysats enzymatiques des trois fractions. Les concentrations de sucres réducteurs diminuent de la fraction la moins substituée (WI-AX) à la fraction la plus substituée (WS-ES-AX) indiquant que la xylanase est peu efficace sur les chaînes de xylanes très substitués par l'arabinose. Par conséquent, les motifs structuraux détectés pour la fraction WS-ES-AX sont probablement peu représentatifs de la globalité de la structure de cette population d'AX.

Un traitement des trois fractions d'AX de son de blé par deux arabinofuranosidases de mode d'action défini (hydrolyse de liaison osidique en *O*-2 et/ou en *O*-3) a permis de conforter les résultats d'analyse des AXOs et donc d'évaluer le type de liaisons osidiques engageant les résidus arabinosyl sur les chaînes d'AX. La plus haute efficacité hydrolytique a été trouvée dans le cas de l'arabinosidase active sur les monosubstitutions en présence de la fraction WI-AX (28% des résidus arabinosyl présents dans la fraction sont libérés). L'arabinosidase active sur les di-substitutions a libéré un taux de substituants arabinose inégalé (15%) à partir de la fraction WS-EI-AX. Un effet synergique a également été observé avec les deux arabinosidases agissant simultanément : 45% des résidus arabinosyl ont été libérés à partir des fractions WI-AX et WS-EI-AX. L'action des deux enzymes simultanément sur la fraction WS-ES-AX est moins efficace puisque 21,8% des arabinosyl seulement sont libérés.

Dans le cas de la paille de blé et des rafles de maïs, les études ont été centrées sur les fractions insolubles dans l'eau du fait de l'importance massique de ces fractions comparativement aux fractions WS-EI et WS-ES. En effet, une quantité élevée d'AX est nécessaire à la caractérisation physico-chimique.

Les ratios Ara/Xyl des fractions WI-AX de paille de blé et de rafles de maïs sont respectivement de 0,11 et 0,07. Les analyses des AXOS libérés après action de la xylanase ont permis de montrer que la fraction WI-AX de paille de blé est riche en résidus xylose monosubstitués par l'arabinose en  $\alpha$ -(1,3) ( $A^3X$ ). En revanche, cette fraction contient une faible quantité de résidus xylosyl substitués par l'acide 4-*O*-méthyl-glucuronique. Le motif 2-*O*- $\beta$ -D-Xylp-L-Araf, substituant certains résidus xylose de la chaîne principale en position *O*-3, a été détecté uniquement dans la fraction WI-AX de rafle de maïs. Cette fraction contient environ la même quantité de mono-substitutions d'arabinose et de substitutions 2-*O*- $\beta$ -D-Xylp-L-Araf sur la chaîne principale xylane. La présence d'acide 4-*O*-méthyl-glucuronique a été aussi détectée minoritairement (HPAEC analyse). L'efficacité de l'endo-xylanase a été comparée entre les fractions insolubles de son de blé, de paille de blé et de rafles de maïs. La xylanase a une efficacité 8% et 28% plus élevée sur les WI-AX paille de blé comparativement aux WI-AX de son de blé et de rafles de maïs respectivement. Ceci peut s'expliquer par le fait que les WI-AX de paille de blé possèdent une structure plus simple (pas de résidus xylosyl di-substitués détectés).

Dans la littérature, les AX extraits de son de blé sont décrits comme étant hautement substitués par rapport aux AX de paille de blé et de rafles de maïs. En effet, plus de la moitié des AX de son de blé présente un degré de substitution supérieur ou égal à 1 (Izydorczyk and Biliaderis 1995). Shiiba et al.(Shiiba, Yamada et al. 1993) ont reporté que pour les AX de son de blé extrait par l'eau possèdent 37% de résidus  $\beta$ -D-xylose non substitués, 22% de monosubstitués et 40% de disubstitués. En général, les résidus xylosyl monosubstitués en  $\alpha$ -1,3 par l'arabinose sont plus fréquents dans les AX de céréales. Excepté dans les AX d'orge et dans l'endosperme de seigle, les monosubstitutions en position *O*-2 sont peu présentes dans les AX des plantes céréalières (Viëtor, Angelino et al. 1992; Shiiba, Yamada et al. 1993; Izydorczyk and Biliaderis 1995). Les AX de paille de blé isolés par la solution alcaline présentent un degré de substitution plus faible proche de 0,12 (Pastell, Virkki et al. 2009) alors que les AX de rafles de maïs ont un degré de substitution intermédiaire proche de 0,33 (Pastell, Virkki et al. 2009). La plupart des études montrent que les AX de son de céréales (son de blé, son de seigle, son d'avoine) contiennent une proportion importante de résidus  $\beta$ -D-xylp di-substitués par rapport à des espèces végétales lignifiées (Pastell, Virkki et al. 2009). Certains arabinoxylanes peuvent contenir des groupes latéraux de disaccharides : 2-*O*- $\beta$ -D-Xylp-L-Araf ( $D^{2,3}X$ ) présents en position *O*-3 des résidus xylose de la chaîne principale (Ebringerová, Hromádková et al. 1992). Ce type de substitution a été détecté au sein des AX

d'orge et de rafles de maïs (Aspinall 1959). Dans le cas des AX de paille de blé, les résidus arabinose sont liés principalement au niveau de la position *O*-3 des résidus xylose (Sun, Lawther et al. 1996). L'étude menée par Sun et al. 1996 (Sun, Lawther et al. 1996) portant sur les AX de paille de blé a montré que le ratio 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-Glcp / Xylose est proche de 1/26. Les AX extrait par la potasse à partir de rafle de maïs ont montré un degré de substitution de 0,09 par l'arabinose. Elles possèdent aussi une importante proportion d'acide 4-*O*-Me- $\alpha$ -D-Glucuronique avec un rapport de 0,05 (GluA :Xyl) (Van Dongen, Van Eylen et al. 2011).

Les masses moléculaires ont été étudiées par la chromatographie d'exclusion stérique en présence de solvant DMSO ainsi qu'en milieu aqueux. Nos résultats indiquent que le solvant DMSO permet une meilleure dissolution des AX que l'eau (polymolécularité plus faible avec le DMSO). Les masses moléculaires moyennes en masse des AX de son de blé varient de 152 000 (WS-EI-AX) à 218 000 g/mol (WS-ES-AX) dans le DMSO alors que des valeurs de masses moléculaires plus élevées ont été trouvées en milieu aqueux pour les fractions solubles dans l'eau en variant 223 000 (WS-EI-AX) à 228 000 g/mol (WS-ES-AX). Les masses moléculaires plus importantes obtenue en milieu aqueux (WS-EI et WS-ES-AX) sont probablement liées à la formation d'agrégats. La fraction insoluble dans l'eau (WI-AX de son de blé) présente une masse moléculaire faible (112 000 g/mol) en milieu aqueux mais il est important de noter que la faible solubilité de cette fraction a conduit à un faible rendement de récupération (23%) en sortie de système HP-SEC. Nos résultats ont montré que les AX de paille de blé et de rafles de maïs ont des masses moléculaires plus faibles comparativement aux AX de son de blé. Parmi les données de la littérature, le  $M_w$  varie de 12 900 à 15 100 g/mol pour les AX de paille de blé dans l'éluent à base de DMSO (Saake, Kruse et al. 2001) et 24 000 à 30 000 g/mol en milieu aqueux (Sun, Tomkinson et al. 2000). Dans le cas des AX de rafles de maïs, Hromadkova et al. (Hromádková, Kováčiková et al. 1999) ont trouvé que le  $M_w$  varie de 54 000 à 94 000 g/mol en milieu aqueux, mais une valeur  $M_w$  plus importante (100 000 g/mol) a été observée par Van Dongen et al. (Van Dongen, Van Eylen et al. 2011). Nos valeurs de  $M_w$  sont de 46 000 g/mol pour la fraction insoluble de paille de blé et de 43 000 g/mol pour la fraction insoluble de rafles de maïs en DMSO. Ces  $M_w$  sont environ 4 fois plus faibles que celle de la fraction insoluble de son de blé (166 000 g/mol en DMSO).

L'ensemble de nos résultats permet de proposer quelques éléments schématiques de structures des diverses fractions d'AX que nous avons étudiées (Figure 1, Figure 2). Il est important de noter que ces propositions de structures sont incomplètes car elles ne prennent



La seconde partie du travail a permis d'établir des relations entre les structures des arabinoxylyanes et leurs propriétés physico-chimiques après mise en œuvre sous forme des films (casting aqueux). Les propriétés sont discutées en fonction du rapport Ara/Xyl qui est identifié comme paramètre principal de caractérisation

Le rapport Ara/Xyl des films d'AX affecte les autres propriétés physico-chimiques telles que la sorption d'eau, le coefficient de perméabilité de l'oxygène et la diffusion de l'oxygène, Les mobilités locale (relaxation vitreuse) et globale (relaxation sous-vitreuse) des macromolécules.

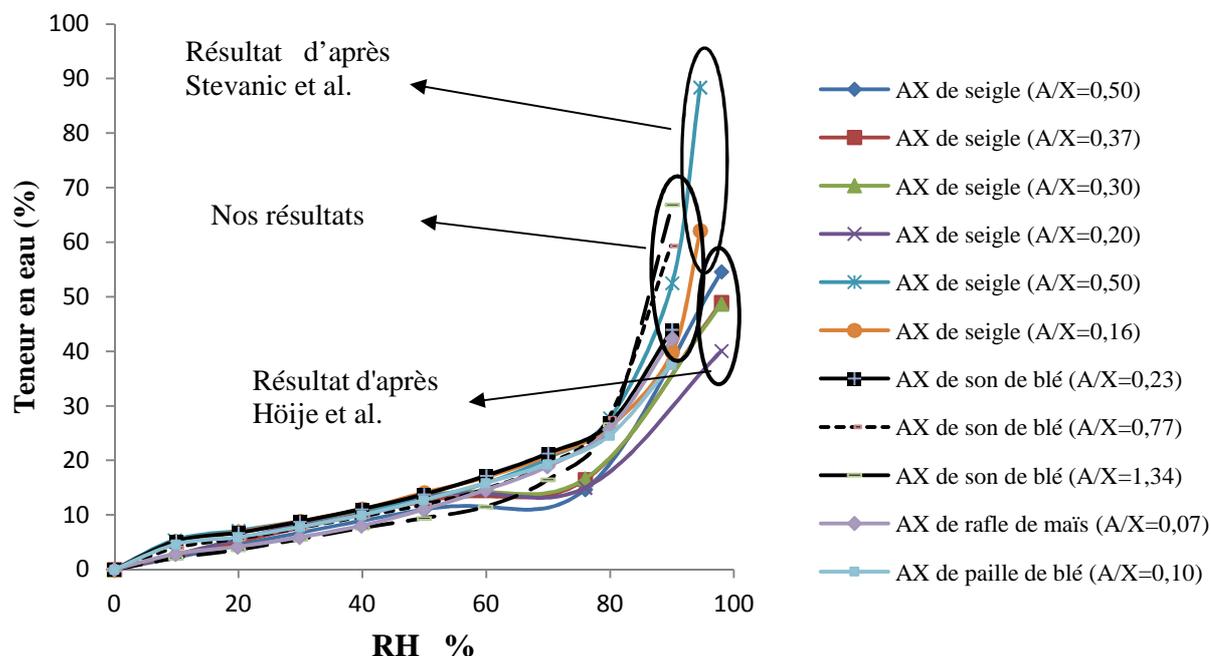
Quand le taux de substitution augmente :

- 1) Le taux de cristallinité diminue car les groupements latéraux empêchent l'arrangement de chaîne principale. En effet, les substituants arabinosyl jouent le long des chaînes de xylane le rôle de défauts structuraux ponctuels inhibant partiellement ou totalement la cristallisation des macromolécules. Certains travaux de la littérature portant sur les propriétés des films à base d'arabinoxylyanes (Sternemalm, Höjje et al. 2008; Stevanic, Joly et al. 2011) ont également étudié l'effet de la présence des substituants arabinosyl sur les propriétés des films telles que la morphologie cristalline. Les AXs modifiés obtenus (Ara/Xyl = 0,16) sont semi-cristallins et présentent un degré de cristallinité de 19% (Stevanic, Joly et al. 2011).

Pour ce travail, les films réalisés à base des trois fractions de son de blé présentent également différentes morphologies. Les taux de cristallinité diminuent en fonction du rapport Ara/Xyl : la fraction WI-AX possède un taux de cristallinité de 24%, la fraction WS-EI-AX de 10% et la fraction la plus substituée WS-ES-AX est complètement amorphe. Pour les AX des autres sous-produits agricoles, les fractions WI-AX de rafles de maïs et de paille de blé possèdent respectivement des taux de cristallinité respectivement égaux à 26% et 20%.

- 2) La teneur en eau augmente à haute humidité relative car les régions cristallines limitent l'hydratation du réseau macromoléculaire réticulé physiquement par les cristallites. La Figure 3 présente les teneurs en eau des films d'AX en fonction de l'humidité relative pour ces travaux et ceux provenant de la littérature. Tous les résultats montrent la corrélation entre le taux de substitution (rapport Ara/Xyl) et le teneur en eau à haute HR. De plus à un peu moins de 80% RH, il y a un point

remarquable où tous les films possèdent sensiblement la même teneur en eau (avec une même méthodologie de mesure).

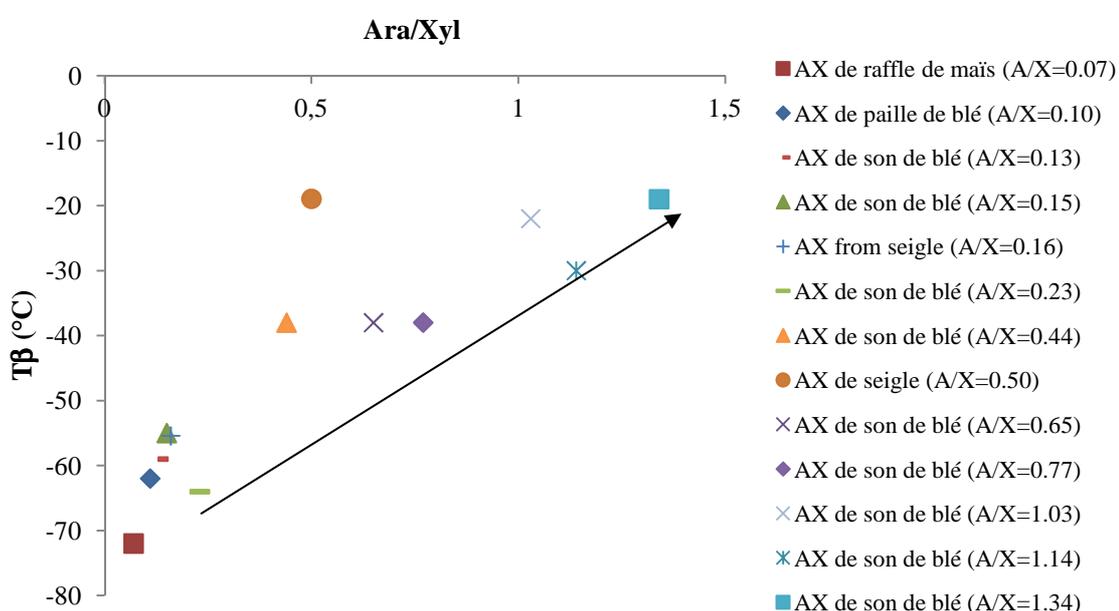


**Figure 3 :** Les comportements de sorption d'eau des films d'AX.

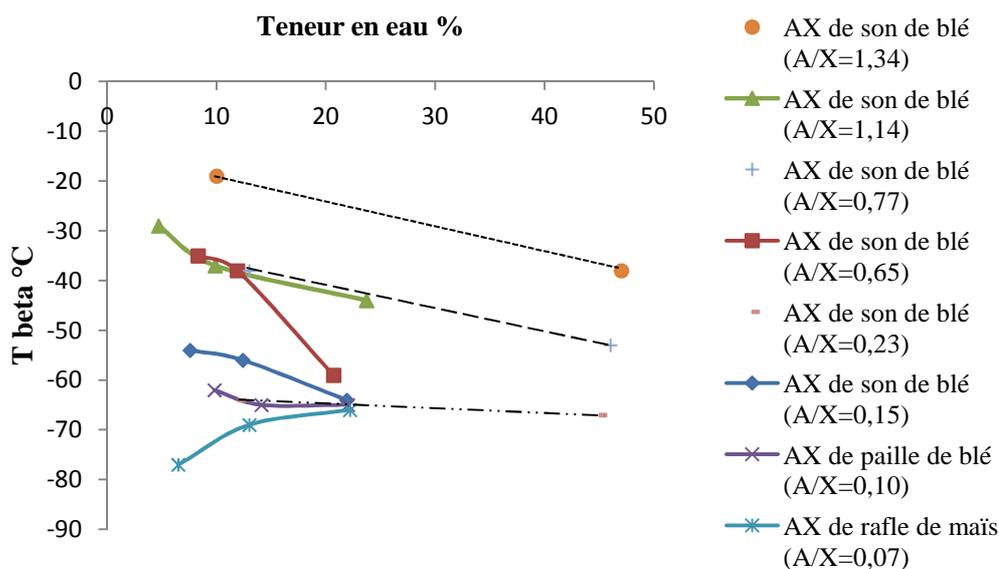
- 3) Les résultats de sorption d'eau à plus faible humidité relative (inférieure à 70%) sont moins évidents à discuter de manière générale. Ils ont conduit généralement au sein d'une même extraction (chapitre 1, AX de son de blé) à une diminution de la teneur en eau quand Ara/Xyl augmente. Les défauts ponctuels (arabinosyl) modifieraient les conformations des macromolécules ou perturbent le réseau de liaisons hydrogène libérant des sites de sorption d'eau en cas de teneur plus faible avec répartition irrégulière, qui plus est dans la phase amorphe des échantillons semi-cristallins.
- 4) La mobilité locale des macromolécules des phases amorphes diminue en raison des groupes latéraux arabinosyl qui entravent les mouvements locaux de la chaîne et/ou peut être également par un réseau de liaison hydrogène perturbé par l'existence de substituants irrégulièrement répartis, qui plus est dans la phase amorphe des semi-cristallins. La nature de ces mouvements locaux n'est malheureusement pas identifiée clairement. La Figure 4 rassemble les températures de relaxation beta des AX de plusieurs espèces végétales dont les échantillons d'AX de seigle collectés par le projet « Woodwisdom-Net Biopack ». L'augmentation de  $T_{\text{beta}}$  en fonction de taux de substitution (Ara/Xyl) est observée au sein d'une même espèce végétale (blé)

et entre espèces végétales (seigle, maïs) ou fractions de la plante. Elle ne peut être reliée systématiquement au taux d'hydratation (Figure 5) qui semble décroître (mais de manière non systématique) si Ara/Xyl diminue pour toutes les espèces étudiées car cette évolution est notée quelles que soient les humidités relatives étudiées (33% RH, 54 % RH et 75% RH).

En outre les densités des trois fractions ont été déterminées à l'état sec, elles sont corrélées avec le rapport Ara/Xyl : la fraction la plus substituée (et amorphe) étant de manière surprenante la plus dense. Ce résultat pourrait corroborer la plus faible mobilité locale obtenue si cette évolution est conservée à l'état hydraté.



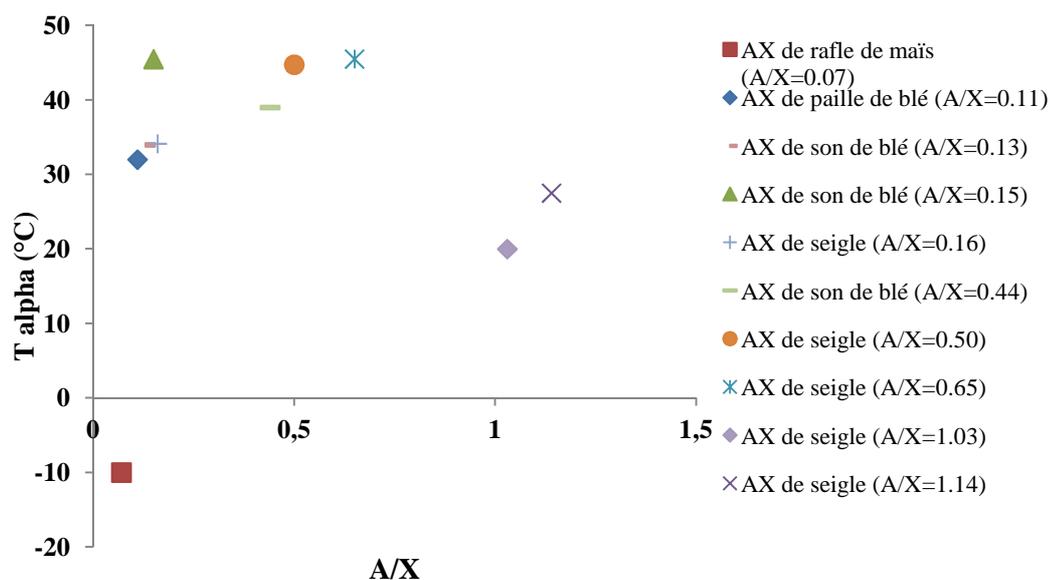
**Figure 4 :** Valeurs de  $T_{\beta}$  des Arabinoxylanes des différentes espèces végétales et des différents lots de fractions de son de blé obtenus, à 54 % RH soit (10 à 15% de teneur en eau), 100 000 Hz.



**Figure 5 :** Températures de relaxation beta des AX des différentes espèces végétales en fonction des teneurs en eau, 100 000 HZ, 54% RH

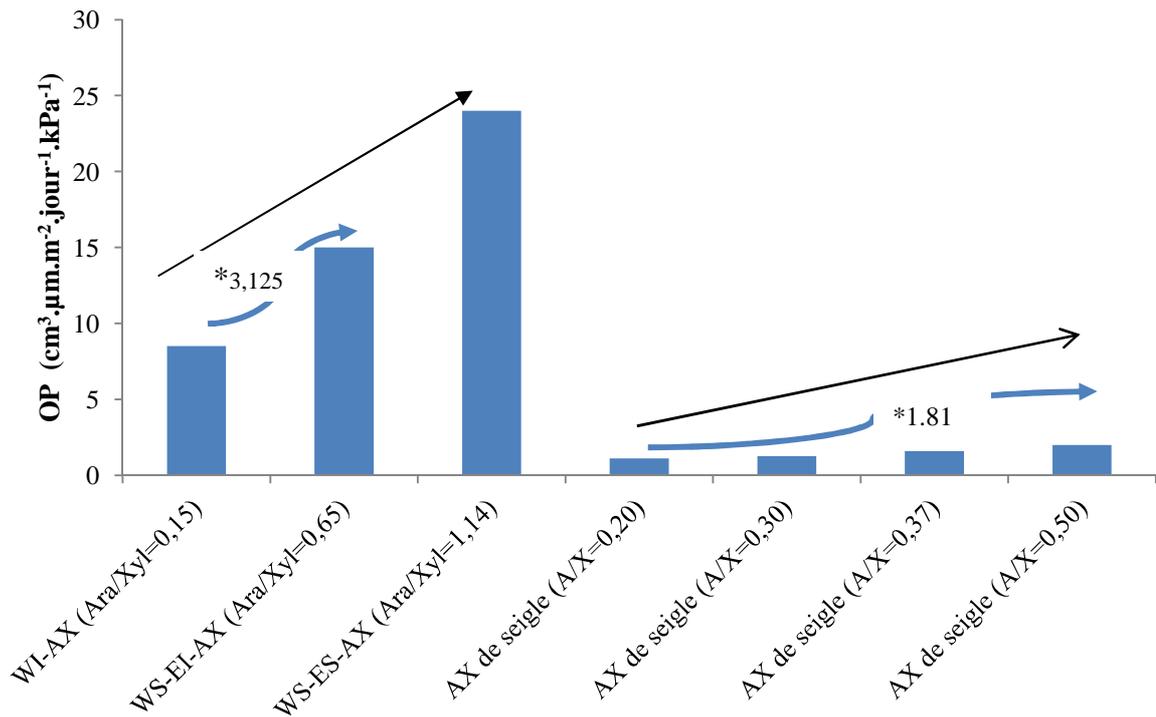
5) La température de transition alpha relative à la mobilité globale des chaînes augmente (pour les taux élevés Ara/Xyl). Cette tendance est certainement due à l'impact de la cristallinisation des AX pour le son de blé (limitation de la mobilité des molécules de liaison). La fraction la plus substitué (WS-ES-AX) a la plus faible  $T_{\alpha}$  (à 33% et 54% HR). Les valeurs de  $T_{\alpha}$  ont été aussi accumulées pour les AX de différentes espèces végétales (Figure 6). Il n'y a pas une claire corrélation entre les ratios Ara/Xyl et la  $T_{\alpha}$ . Il faut préciser que ce phénomène est moins facile à observer que l'évolution de la transition beta : il semble très dépendant de la méthodologie de préparation des films et de leur analyse (plus grand écart type).

Les  $T_{\alpha}$  peuvent aussi être modulées par plusieurs facteurs tels que la longueur de chaîne, la nature des substitutions entre les AX des différentes origines botaniques sans pouvoir établir de corrélation aisée. Seul les arabinoxyanes de rafles de maïs se remarquent par leur très faible température de relaxation alpha ( $-10^{\circ}\text{C}$ ). Cette température  $T_{\alpha}$  très reproductible pourrait être due à la présence du motif 2-O- $\beta$ -D-Xylp-L-Araf, seul groupement latéral spécifique de cet AX. Ce motif peut jouer le rôle de plastifiant interne.



**Figure 6 :** Valeurs de  $T_{\alpha}$  des Arabinoxylanes des différentes espèces végétales, 1 Hz et 54% d'humidité relative (entre 10 et 15 % de teneur en eau selon les films).

- 6) Le coefficient de perméabilité à l'oxygène augmente. La Figure 7 présente la perméabilité à l'oxygène des films à base d'AX. La même corrélation a été trouvée par Höije et al., (Höije, Sternemalm et al. 2008). La perméabilité est alors gouvernée par le taux de phase amorphe, en dépit de la plus faible mobilité locale de la phase amorphe observée dans le cas de la fraction la plus substituée. Nos valeurs de la perméation d'oxygène sont plus importantes que celles de la littérature. Les différences sont probablement dues aux différentes techniques de mesure.



**Figure 7 :** La perméabilité à l’oxygène des films d’AXs de ce travail (3 fractions du son de blé) et les valeurs concernant les AX de seigle d’après Höije et al.,

- 7) Le coefficient de diffusion de l’oxygène augmente. Les molécules d’oxygène diffusent plus vite pour la fraction moins cristalline, ce qui est un résultat attendu. Il n’a pas été trouvé de corrélation claire pour la solubilité d’oxygène déterminée à l’état sec. Ce résultat est probablement dû aux très faibles valeurs de perméabilité enregistrées pour les AX.

#### - **Renforcement par les nanocristaux de cellulose**

Les films biosourcés présentent de faibles propriétés mécaniques dues aux faibles masses moléculaires, de plus ces propriétés sont comme celles de tous les polymères polaires très sensibles à l’eau. Plusieurs études ont été réalisées pour le renforcement des films biosourcés par des nanocristaux cellulosiques Mikkonen et al. (Mikkonen, Mathew et al. 2010) ont observé une amélioration des propriétés mécaniques et une diminution de teneur en eau à haute HR pour les films des glucomannanes de Konjac. Saxena et al. (Saxena, Elder et al. 2010) ont aussi amélioré la propriété mécanique et barrière à l’oxygène et la vapeur d’eau pour les films d’arabinoxylanes d’avoine par les nanocristaux. L’objectif de notre étude est

d'étudier la morphologie et les propriétés physico-chimiques des films nanocomposites à base des trois fractions des AX de son de blé. Les études ont été focalisées sur les interactions entre les nanocharges avec les trois matrices différentes obtenues lors de l'extraction des AX du son de blé. Dans notre étude, les films d'arabinoxylanes ont été renforcés avec 5% ou 10% de nanocristaux issus de linter de cotons. La morphologie des films nanocomposites a été étudiée par la microscopie électronique à balayage. Les surfaces à la rupture des films nanocomposites semblent être plus hétérogènes. Une surface particulièrement stratifiée a été observée seulement pour le film de WI-AX avec 10% CNC. Les propriétés physico-chimiques telles que la cristallinité, la sorption d'eau, la température de transition alpha et beta ont été aussi analysées pour étudier l'effet du renforcement par les nanocharges.

Quand les films d'AX sont renforcés par les nanocristaux de cellulose :

- (1) La cristallinité des films n'est pas modifiée quelle que soit la matrice étudiée. Les mêmes résultats ont été trouvés aussi par Stevanic et al. (Stevanic, Joly et al. 2011) et Mikkonen et al. (Mikkonen, Stevanic et al. 2011) pour les AX de seigle renforcés par la cellulose bactérienne et les glucomannanes d'épicéa renforcés par de la cellulose microfibrillée.
- (2) Les teneurs en eau des films ont diminué à haute humidité relative, mais à faible humidité relative, les comportements de sorption d'eau sont différents en fonction des matrices. A haute humidité relative, la teneur en eau diminue entre 4-7% pour les AX de son de blé. Dammström et al. (Dammström, Salmén et al. 2005) ont remarqué une diminution de teneur en eau de 30% pour les glucuronoxylanes de tremble renforcés par de la cellulose bactérienne à 90% HR. Une diminution de teneur en eau de 15% a été mesurée par Stevanic et al. (Stevanic, Joly et al. 2011) pour les AX de seigle native (Ara/Xyl=0,50) renforcés par 15% de celluloses bactériennes à 95% HR. Pour les xylanes extraits à partir de bambou, le teneur en eau à 50% HR diminue systématiquement avec l'augmentation de taux de nanocharges (Peng, Ren et al. 2011).
- (3) Les températures des transitions beta ont augmenté pour toutes les matrices. Les températures des transitions alpha augmentent légèrement pour la fraction la plus substituée à faible humidité relative. La mobilité locale des chaînes est réduite en

raison des interactions entre les nanocristaux et les matrices. Ces interactions sont plus intenses pour la fraction la plus substituée (WS-ES-AX). Stevanic et al. (Stevanic, Joly et al. 2011) ont observé une  $T_{\alpha}$  plus élevée mais à l'état sec pour les films à base d'AX plus substitués (Ara/Xyl = 0,50), renforcés par les celluloses bactériennes. Pour les fractions plus cristallines, l'effet de renforcement peut être partiellement masqué par le développement de la morphologie cristalline. Les films à base de galactoglucomannanes d'épicéa plastifiés avec du glycérol présentent également une augmentation de  $T_g$  à 11% d'HR après renforcement par des fibres de cellulose microfibrillée. Au contraire, les températures de transition beta ont été diminuées pour les films nanocomposites. Les auteurs ont expliqué que ce phénomène pouvait être relatif aux interactions complexes établies entre le glycérol, la matrice et les nanocharges.

- (4) La perméabilité et la solubilité d'oxygène diminuent respectivement de 30% (fraction WS-EI-AX renforcées à 10%) et de 47%. Cette diminution peut être due aux interactions établies entre les nanocristaux et les matrices et/ou aux chemins de diffusion plus tortueux obtenus.

## Perspectives

Ce travail de thèse a reposé sur l'étude de la valorisation de la biomasse végétale lignocellulosique. Il s'est focalisé sur l'application des hémicelluloses et plus particulièrement des arabinoxylanes en tant que matériau par la recherche de leurs propriétés d'usage potentiel. L'ambition est l'étude des relations entre origine botanique/isolement/structure/propriétés applicatives des hémicelluloses dans le but d'envisager une substitution des polymères de synthèse barrière (par exemple l'EVOH) classiquement utilisés dans l'emballage.

Le sujet a été traité de façon intégrée depuis l'extraction des hémicellulose jusqu'à leur caractérisation physico-chimique en explorant différents types de ressources végétales ou parties de plantes.

En perspectives, ce travail peut être enrichi :

(1) par la sélection d'autres substrats hémicellulosiques (autres origines botaniques, autres parties de plantes, hémicelluloses autres que les AX) basée sur des méthodes d'extraction et de fractionnement menées à l'échelle pilote permettant d'obtenir des quantités extraites élevées afin de limiter les problèmes liés à la multiplication des lots d'extraction et de fractionnement. Les quantités disponibles lors des extractions à l'échelle du laboratoire sont limitantes en termes de caractérisation ultérieure des propriétés physico-chimiques, notamment pour les propriétés sous forme de films. Le travail amont de fractionnement reste important pour la maîtrise de l'accessibilité aux substrats hémicellulosiques. Pour exemple, dans le projet Biopack, le choix retenu a été de travailler sur des substrats d'origine commerciale et leurs modulations par modifications enzymatiques (*variabilité artificielle* : modulation du rapport Ara/Xyl et du degré de polymérisation - travaux non publiés à ce jour sur arabinoxylanes et plastification des glucomannanes de pin). Ce choix (complémentaire à notre approche) ne permet pas de tirer partie de la variabilité intrinsèque (*variabilité native*) des hémicelluloses obtenue lors de fractionnement certainement plus large que celle atteinte par modification enzymatique. La prochaine étape - maintenant que la caractérisation du substrat est mieux maîtrisée - est de se rapprocher de laboratoires travaillant sur d'autres approches d'extraction (extraction bi-vis, dissolution par des liquides ioniques) qui permettraient d'une part d'améliorer les rendements d'extraction mais aussi d'obtenir des polymères différents de ceux que nous avons obtenus lors de notre étude (par exemple des polymères ayant conservés leur acétylation)-

Cependant, comme déjà discuté, une quantité extraite élevée d'hémicelluloses va souvent de paire avec des étapes de purification nécessaires parfois nombreuses ce qui aboutit

à la multiplication subséquente des fractions d'intérêts potentiels. De plus, le travail de caractérisation fine reste indispensable en fin de sélection. Celui-ci est chronophage et multiplie encore les fractions par la multiplication de « blancs » (dialyses, élimination des beta-glucanes etc...). Il y a alors lieu de travailler ici à un *compromis* satisfaisant la maîtrise du/des procédé(s) et la nature/quantités des fractions extraites.

La définition d'une stratégie hiérarchisée visant l'utilisation d'outils de caractérisation rapide permettant la gestion systématisée des fractions obtenues avant de travailler ultérieurement à la détermination de leur structure fine et propriétés d'usage s'avère nécessaire. Ce travail de sélection préalable à l'analyse pourrait principalement être focalisé sur la base de tests rapides basés sans doute sur la mobilité des macromolécules (étude DEA systématique pour les arabinoxylyanes, ou par immobilisation de sondes fluorescentes dédiées de type rotors moléculaires) et/ou simplement la filmogénéité des substrats. En effet, le DEA permet la connaissance rapide du rapport Ara/Xyl (pour les AX) et la détection de la présence de groupements singuliers (rafles de maïs). La filmogénéité renseigne sur le degré de polymérisation. Cette stratégie peut être complétée par d'autres analyses rapides comme par exemple les densités à l'état sec et humide qui renseignent sur le « packing » des macromolécules.

A l'issue de cette sélection d'une palette d'hémicelluloses de variabilité la plus large possible, les perspectives relatives à la caractérisation et aux applications se trouvent simplifiées.

(2) Par l'optimisation de la détermination de la structure fine. Les outils dont nous disposons (action d'enzymes puis analyse des oligomères produits) sont insuffisants pour permettre l'étude de la totalité du matériel extrait. Seule une acétylation/méthylation/hydrolyse acide et analyse par CPG permettrait de disposer de toutes les informations par rapport aux liaisons osidiques présentes au sein des polymères d'AX (sauf l'anomérisation des liaisons que seule la RMN peut déterminer) et d'estimer la proportion des divers motifs structuraux et des diverses liaisons osidiques au sein des polymères. Toutefois, ces techniques ne peuvent être utilisées que pour très peu de candidats.

(3) Par l'étude de la modulation par hydrolyse enzymatique qui permet d'éliminer de manière contrôlée certains substituants des AX tout en préservant l'intégrité de la chaîne

principale. Ces techniques doivent être entreprises pour permettre le développement d'interactions privilégiées cellulose/hémicellulose dans le cas des renforts fibreux (possédant des facteurs de formes élevés) qui ont pour but un maintien de l'intégrité des films qui peut pour partie être apporté par un substrat papier (absorption totale ou partielle du film d'hémicellulose déposé) (Kunanopparat, Menut et al. 2007). Les nouvelles structures obtenues sont également susceptibles de présenter une morphologie nouvelle (cristallisation modérée), mais ces travaux conduits le plus souvent sur substrats commerciaux n'ont pas permis d'obtenir des résultats suffisamment marquants quant aux interactions fibres/matrices même s'ils démontrent cependant une diminution de perméabilité.

(4) Par la maîtrise du dépôt des hémicelluloses sur substrat polymère ou papier : en effet, il n'est plus d'actualité d'imaginer des films autosupportés et d'en mesurer les performances mécaniques : les hémicelluloses doivent trouver des applications en terme de revêtement sur substrat comme c'est le cas pour les protéines qui présentent intrinsèquement de meilleures propriétés ou pour certains polymères synthétiques barrière. Les techniques peuvent être manuelles, mais on pourrait aussi envisager un dépôt maîtrisé de type (cast film) par dépôt d'une nappe fondue formulée déposée sur substrat.

(5) La recherche de plastifiants souvent nécessaires à la mise en œuvre (filmogénéité) est également nécessaire. Les polyols sont habituellement utilisés (glycérol, sorbitol) comme plastifiants. Ils sont sorbés sur des sites de sorption spécifiques. Des plastifiants (de type hydrolysats d'hémicelluloses) peuvent être testés en tant que co-plastifiants à effets stériques. Il s'agit ici de connaître les propriétés de plastification des hémicelluloses selon leur structure native et avant/après modifications enzymatiques. En outre, une recherche de meilleur compromis propriétés filmogènes/propriétés mécaniques pourrait être recherchée avec l'aide de plastifiants sélectionnés.

(6) Par des mesures de perméabilité gazeuse en milieu plus ou moins hydraté (ou à taux d'hydratation constant – 80% RH) mais également à partir d'essais de sorption de gaz (oxygène et eau). En effet, la perméabilité ( $P_e$ ) est une grandeur globale ne permettant pas de remonter à ses composantes qui sont la diffusion  $D$  et la solubilité  $S$ . Ces informations sont cependant déterminantes : une variation de perméabilité peut être soit gouvernée par la modulation du coefficient de diffusion du perméat (oxygène par exemple), soit par la solubilité de ce gaz dans la matrice (Fringant, Desbrières et al. 1996 ; Joly, Goizet et al.

1997). Une diminution de coefficient de diffusion sera par exemple reliée au meilleur « packing » du polymère et à la mobilité réduite de ses macromolécules alors qu'une plus faible solubilité témoignera d'un plus faible nombre de sites de sorption spécifiques de la matrice accessibles au perméat (sites engagés ou non via des interactions polymère/polymère, polymère/additif). Les techniques ne sont pas à ce jour identifiées pour les solubilités, les hémicelluloses présentant sans doute des valeurs de solubilité très faibles.

## Références:

- Aspinall, G. O. (1959). Structural Chemistry of the Hemicelluloses. Advances in Carbohydrate Chemistry. L. W. Melville, Academic Press. Volume 14: 429-468.
- Bataillon, M., P. Mathaly, et al. (1998). "Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale." Industrial Crops and Products **8**(1): 37-43.
- Dammström, S., L. Salmén, et al. (2005). "The effect of moisture on the dynamical mechanical properties of bacterial cellulose/glucuronoxylan nanocomposites." Polymer **46**(23): 10364-10371.
- Ebringerová, A., Z. Hromádková, et al. (1992). "Structural and solution properties of corn cob heteroxylans." Carbohydrate Polymers **19**(2): 99-105.
- Fringant C, Desbrieres J, et al. 1996 "Characterization of sorbed water molecules on neutral and ionic polysaccharides", "International Journal of Biological Macromolecules **18**(4) 281-286
- Højje, A., E. Sternemalm, et al. (2008). "Material Properties of Films from Enzymatically Tailored Arabinoxylans." Biomacromolecules **9**(7): 2042-2047.
- Hollmann, J. and M. G. Lindhauer (2005). "Pilot-scale isolation of glucuronarabinoxylans from wheat bran." Carbohydrate Polymers **59**(2): 225-230.
- Hromádková, Z., J. Kováčiková, et al. (1999). "Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan." Industrial Crops and Products **9**(2): 101-109.
- Izydorczyk, M. S. and C. G. Biliaderis (1995). "Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties." Carbohydrate Polymers **28**(1): 33-48.
- Izydorczyk, M. S. and C. G. Biliaderis (2000). Structural and functional aspects of cereal arabinoxylans and [beta]-glucans. Developments in Food Science. G. Doxastakis and V. Kiosseoglou, Elsevier. Volume 41: 361-384.
- Joly C, Goizet S, et al. 1997 "Sol-gel polyimide composite membrane: gas transport properties." Journal of Membrane Science. **130**(2) 63-74
- Kunanopparat, T., P. Menut, et al. (2007). "Reinforcement of plasticized wheat «gluten» with natural fibers: From mechanical improvement to deplasticizing effect". Composites Part A: Applied Science and Manufacturing **39**(5): 777-785
- Mikkonen, K., A. Mathew, et al. (2010). "Glucomanan composite films with cellulose nanowhiskers." Cellulose **17**(1): 69-81.
- Mikkonen, K., J. Stevanic, et al. (2011). "Composite films from spruce galactoglucomannans with microfibrillated spruce wood cellulose." Cellulose **18**(3): 713-726.
- Pastell, H., L. Virkki, et al. (2009). "Presence of 1->3-linked 2-O-[beta]-d-xylopyranosyl-[alpha]-l-arabinofuranosyl side chains in cereal arabinoxylans." Carbohydrate Research **344**(18): 2480-2488.
- Peng, X.-w., J.-l. Ren, et al. (2011). "Nanocomposite Films Based on Xylan-Rich Hemicelluloses and Cellulose Nanofibers with Enhanced Mechanical Properties." Biomacromolecules **12**(9): 3321-3329.
- Saake, B., T. Kruse, et al. (2001). "Investigation on molar mass, solubility and enzymatic fragmentation of xylans by multi-detected SEC chromatography." Bioresource Technology **80**(3): 195-204.
- Saxena, A., T. J. Elder, et al. (2010). "High oxygen nanocomposite barrier films based on xylan and nanocrystalline cellulose." Nano-Micro Letters **2**(4): 235-241.
- Shiiba, K., H. Yamada, et al. (1993). "Purification and Characterization of Two Arabinoxylans from Wheat Bran." Cereal Chemistry **70**(2): 209-214.
- Sternemalm, E., A. Højje, et al. (2008). "Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films." Carbohydrate Research **343**(4): 753-757.

- Stevanic, J. S., C. Joly, et al. (2011). "Bacterial nanocellulose-reinforced arabinoxylan films." Journal of Applied polymer science **122**(2): 1030-1039.
- Sun, R., J. M. Lawther, et al. (1996). "Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses." Carbohydrate Polymers **29**(4): 325-331.
- Sun, R. C., J. Tomkinson, et al. (2000). "Physico-chemical and structural characterization of hemicelluloses from wheat straw by alkaline peroxide extraction." Polymer **41**(7): 2647-2656.
- Van Dongen, F. E. M., D. Van Eylen, et al. (2011). "Characterization of substituents in xylans from corn cobs and stover." Carbohydrate Polymers **86**(2): 722-731.
- Viëtor, R. J., S. A. G. F. Angelino, et al. (1992). "Structural features of arabinoxylans from barley and malt cell wall material." Journal of Cereal Science **15**(3): 213-222.

**Résumé :**

Plus de 40% des matériaux plastiques sont utilisés pour l'emballage. Les principaux polymères sur le marché de l'emballage alimentaire sont les polymères synthétiques d'origine fossile. Du fait de la raréfaction des ressources fossiles, la valorisation des polymères issus de matières premières renouvelables d'origine végétale représente une alternative à l'utilisation des polymères pétro-sourcés. Les hémicelluloses, avec la cellulose et les lignines, sont un composant majeur des ressources lignocellulosiques. Les hémicelluloses constituent des réseaux macromoléculaires denses et peu mobiles qui leur confèrent intrinsèquement d'excellentes propriétés barrières aux gaz. L'objectif de cette thèse est d'isoler les arabinoxylanes (AX) à partir de divers co-produits de céréales (son de blé, paille de blé, rafles de maïs) afin d'étudier l'impact de leurs compositions et de leurs structures sur certaines de leurs propriétés physico-chimiques, après mise en œuvre sous forme des films pour des applications potentielles dans le domaine de l'emballage alimentaire. Les arabinoxylanes ont été extraits par un procédé alcalin puis séparés en trois fractions en fonction de leur solubilité dans l'eau et dans l'éthanol 50% (v/v). Les trois fractions récupérées (i/ insoluble dans l'eau, ii/ soluble dans l'eau et insoluble dans l'éthanol, iii/soluble dans l'eau et soluble dans l'éthanol) présentent un rapport Ara/Xyl croissant avec leur solubilité dans l'eau et dans l'éthanol. Dans le cas du son de blé, les trois fractions présentent des masses moléculaires similaires mais se distinguent par différents degrés de substitution et divers types de substitutions de la chaîne principale de xylanes. L'étude des propriétés physico-chimiques de films formés par ces trois fractions ont permis d'établir une corrélation entre le degré de substitution et leurs propriétés sous forme de films. La morphologie cristalline, la mobilité des chaînes et l'hydratation des films de xylanes sont corrélés avec les taux de substitution des AX. Lorsque le taux d'Ara/Xyl diminue, le film est plus cristallin, la mobilité locale augmente alors que la mobilité globale diminue, la teneur en eau diminue à haute humidité relative (de 67% à 60% à 90%HR), la perméabilité et la diffusivité à l'oxygène diminue. L'étude des trois fractions insolubles dans l'eau isolée à partir de son de blé, de paille de blé et de rafles de maïs a révélé que les propriétés des films sont également affectées par la longueur des chaînes de xylanes et par leur conformation moléculaire ainsi que par la teneur des substituants tels que les acides uroniques. Des nanocharges (nanocristaux de cellulose de linters de coton) sont utilisées (5 ou 10% p/p) pour renforcer les films formés par les fractions d'AX de son de blé. L'incorporation des nanocristaux au sein des films n'a pas provoqué de modification du degré de cristallinité. Par contre, la teneur en eau à haute humidité relative est diminuée. La mobilité locale des chaînes d'AX est réduite indiquant l'existence d'interactions entre les nanocristaux et les AX alors que la mobilité globale des chaînes n'est pas modifiée. L'effet du renforcement semble être plus intense pour la fraction AX la plus substituée par les groupements arabinosyl.

**Mot-clé :** Arabinoxylanes, extraction, propriétés, oxygen perméabilité, nanocomposite.

**Abstract:**

There are more than 40% of plastics used for packaging. The main polymers in the food packaging market are synthetic polymers from fossil resource. Due to limited fossil resources on our planet, the development of renewable raw materials derived from plant is required to have an alternative to synthesized polymers from petroleum sources. Hemicelluloses, with cellulose and lignin, are a major component of lignocellulosic resources which display dense and low-mobility macromolecular networks making them have excellent gas barrier properties. The aim of this thesis is to isolate arabinoxylans (AX) from the various cereals co-products such as wheat bran, wheat straw and corn cob, in order to study the impact of their compositions and structures on several physicochemical properties of AX based films for potential food packaging application. The alkaline solution is used to extract arabinoxylans, and a step of fractionation is used to separate the different populations AX according to their solubility in water and in ethanol 50% (v/v). Three fractions were finally obtained (i) water insoluble, ii) water soluble-ethanol insoluble and iii) water ethanol soluble) displaying the increasing ratios Ara/Xyl with increasing solubility in water and in ethanol. The three fractions of wheat bran have similar molar masses, different substitution degrees and patterns. The results about the films physico-chemical properties based on these three fractions could be established a relationship between the substitution degree and their films properties. The film morphology, the chain mobility, the water sorption behavior at high relative humidity and the coefficient permeability and diffusivity of oxygen could be correlated with the degree of substitution. When the Ara/Xyl ratio decreases, the film is more crystalline, the local chain mobility increases whereas the global chain mobility decreases, water content at high relative humidity decreases and the oxygen permeability and diffusivity decreases. The AX has different substitution patterns and molar masses according to their botanical origins. The study of three water-insoluble fractions isolated from three cereal co-products reveals that the film properties could be also affected by chain length, the amounts of other substituents such as uronic acids and their molecular conformations. The nanofillers (cellulose nanocrystals of cotton linters) are used in order to enhance the films properties based on three AX fractions of wheat bran (5 or 10% w/w). The incorporation of nanocrystals in the films does not change in the crystallinity degree; whereas the water content at high relative humidity is decreased; the local chain mobility of AX is reduced indicating the existence of interactions between the nanocrystals and AX while the global chain mobility is almost unchanged. The reinforcement effect seems to be more intense for the most substituted AX by arabinosyl groups.

**Key word:** Arabinoxylans, extraction, properties, oxygen permeability, nanocomposite

## Annexe 1 : Les caractéristiques de capteur d'oxygène (Presens®)

| Specification             | Sensor type Pst 3   |                          | Sensor type Pst 6  |                           |
|---------------------------|---|--------------------------|--|---------------------------|
|                           | Gaseous & Dissolved oxygen  | Dissolved oxygen         | Gaseous & Dissolved oxygen                                 | Dissolved oxygen          |
| Measurement range         | 0-100% O <sub>2</sub><br>0-1000 hPa   | 0-45 mg/L<br>0-1400 µmol | 0-4.2% O <sub>2</sub><br>0-41.4 hPa                        | 0-1.8 mg/L<br>0-56.9 µmol |
| Limit de detection        | 0.03% O <sub>2</sub>  | 15 ppb                   | 0.002% O <sub>2</sub>                                      | 1 ppb                     |
| Resolution                | ± 0.01% O <sub>2</sub> at 0.21% O <sub>2</sub><br>± 0.1% O <sub>2</sub> at 20.9% O <sub>2</sub><br>± 0.1 hPa at 2hPa                        | ± 0.14 µmol at 2.83 µmol | ± 0.0007% at 0.002% O <sub>2</sub><br>± 0.007 at 0.023 hPa | 0.01 µmol at 0.03 µmol    |
| Accuracy                  | ± 0.4% at 20.9 % O <sub>2</sub>   |                          | ± 1ppb or ± 3% respective concentration                    |                           |
| Drift at 0% oxygen        | < 0.03% O <sub>2</sub> within 30 days   |                          | < 2ppb O <sub>2</sub> within 30 days                       |                           |
| Measurement T°C range     | 0-50°C  |                          | 0-50°C   |                           |
| Response time             | < 6 sec   | < 40 sec                 | < 6 sec  | < 40 sec                  |
| <b>Properties</b>         |   |                          |  |                           |
| Compatibility             | Aqueous solution, ethanol, methanol   |                          |  |                           |
| No cross sensitivity with | pH 1-14; CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S, SO <sub>2</sub> ; Ionic species  |                          |  |                           |
| Cross sensitivity to      | Organic solvent, such as Acetone, Toluene and chloroforme   |                          |  |                           |
| Sterillization procedures | Steam sterillization  |                          |  |                           |
| Cleaning procedure        | Cleaning in place (CIP, 5% NaOH, 90°C); 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; Acidic agent (HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), max (4, 5%) |                          |  |                           |
| Calibration               | Two point calibration in oxygen free environment  |                          |  |                           |
| Storage stability         | 2 years provides sensor material stored in dark (10-60°C)   |                          |  |                           |

- Les complexes fluorescents utilisés dans les capteurs d'oxygènes commerciaux.

| Fluorescent complexe   | Abbreviation | Origin                              |
|--|--------------|-------------------------------------|
| Platinum octaethyl porphine Ketone                               | PtOEPK       | Luxcel Biosciences (Cork, Ireland)  |
| Platinum tetrakis-(pentafluorophenyl) porphin                    | PtTFPP       | Porphyrin Systems (Lubeck, Germany) |
| tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenantroline) ruthenium(II) perchlorate | RuDPP        | PreSens (Regensburg, Germany)       |

## Annexe 2 : Tableau de conversion des unités de perméation

|   | [cm <sup>3</sup> ][cm]/[cm <sup>2</sup> ][s][cm Hg] | [cm <sup>3</sup> ][mm]/[cm <sup>2</sup> ][s][cm Hg] | [cm <sup>3</sup> ][cm]/[cm <sup>2</sup> ][s][atm] | [cm <sup>3</sup> ][cm]/[m <sup>2</sup> ][jour][atm] | [cm <sup>3</sup> ][cm]/[m <sup>2</sup> ][jour][bar] | [cm <sup>3</sup> ][cm]/[cm <sup>2</sup> ][s][Pa] | [cm <sup>3</sup> ][mm]/[cm <sup>2</sup> ][s][cm Hg] | [cm <sup>3</sup> ][mm]/[m <sup>2</sup> ][jour][kPa] | mol.m/m <sup>2</sup> .s.Pa | Barrer   | (cm <sup>3</sup> .mm)/(m <sup>2</sup> ).jour.bar | (cm <sup>3</sup> .20mm)/(m <sup>2</sup> ).jour.atm |
|---|---|---|---|---|---|--|---|---|----------------------------|----------|--|--|
| [cm <sup>3</sup> ][cm]/[cm <sup>2</sup> ][s][cm Hg] | <b>1</b>  | 1,00E+01  | 7,60E+01  | 6,57E+10  | 6,48E+10  | 7,50E-04   | 1,00E+04  | 6,48E+12  | 3,35E-06                   | 1,00E+10 | 6,48E+14   | 3,28E+13   |
| [cm <sup>3</sup> ][mm]/[cm <sup>2</sup> ][s][cm Hg] | 1,00E-01  | <b>1</b>  | 7,60E+00  | 6,57E+09  | 6,48E+09  | 7,50E-05   | 1,00E+03  | 6,48E+11  | 3,35E-07                   | 1,00E+09 | 6,48E+13   | 3,28E+12   |
| [cm <sup>3</sup> ][cm]/[cm <sup>2</sup> ][s][atm]   | 1,32E-02  | 1,32E-01  | <b>1</b>  | 8,64E+08  | 8,53E+08  | 9,87E-06   | 1,32E+02  | 8,53E+10  | 4,41E-08                   | 1,32E+08 | 8,75E+12   | 4,32E+11   |
| [cm <sup>3</sup> ][cm]/[m <sup>2</sup> ][jour][atm] | 1,52E-11  | 1,52E-10  | 1,16E-09  | <b>1</b>  | 9,87E-01  | 1,14E-14   | 1,52E-07  | 9,87E+01  | 5,21E-17                   | 1,52E-01 | 9,87E+03   | 5,00E+02   |
| [cm <sup>3</sup> ][cm]/[m <sup>2</sup> ][jour][bar] | 1,54E-11  | 1,54E-10  | 1,17E-09  | 1,01E+00  | <b>1</b>  | 1,16E-14   | 1,54E-07  | 1,00E+02  | 5,28E-17                   | 1,54E-01 | 1,00E+04   | 5,07E+02   |
| [cm <sup>3</sup> ][cm]/[cm <sup>2</sup> ][s][Pa]    | 1,33E+03  | 1,33E+04  | 1,01E+05  | 8,75E+13  | 8,64E+13  | <b>1</b>   | 1,33E+07  | 8,64E+15  | 4,46E-03                   | 1,33E+13 | 8,64E+17   | 4,38E+16   |
| [cm <sup>3</sup> ][mm]/[cm <sup>2</sup> ][s][cm Hg] | 1,00E-04  | 1,00E-03  | 7,60E-03  | 6,57E+06  | 6,48E+06  | 7,50E-08   | <b>1</b>  | 6,48E+08  | 3,35E-10                   | 1,00E+06 | 6,48E+10   | 3,28E+09   |
| [cm <sup>3</sup> ][mm]/[m <sup>2</sup> ][jour][kPa] | 1,54E-13  | 1,54E-12  | 1,17E-11  | 1,01E-02  | 1,00E-02  | 1,16E-16   | 1,54E-09  | <b>1</b>  | 5,28E-19                   | 1,54E-03 | 1,00E+02   | 5,07E+00   |
| mol.m/m <sup>2</sup> .s.Pa                          | 2,99E+05  | 2,99E+06  | 2,27E+07  | 1,92E+16  | 1,94E+16  | 2,24E+02   | 2,99E+09  | 1,90E+18  | <b>1</b>                   | 2,99E+15 | 1,93E+20   | 9,81E+18   |
| Barrer  | 1,00E-10  | 1,00E-09  | 7,60E-09  | 6,57E+00  | 6,48E+00  | 7,50E-14   | 1,00E-06  | 6,49E+02  | 3,35E-16                   | <b>1</b> | 6,48E+14   | 7,60E-09   |
| (cm <sup>3</sup> .mm)/(m <sup>2</sup> ).jour.bar    | 1,54E-15  | 1,54E-14  | 1,17E-13  | 1,01E-04  | 1,00E-04  | 1,18E-18   | 1,54E-11  | 1,00E-02  | 5,28E-21                   | 1,54E-05 | <b>1</b>   | 5,07E-02   |
| (cm <sup>3</sup> .20mm)/(m <sup>2</sup> ).jour.atm  | 3,05E-14  | 3,05E-13  | 2,31E-12  | 2,00E-03  | 1,97E-03  | 2,28E-17   | 3,05E-10  | 1,97E-01  | 1,04E-19                   | 3,05E-04 | 1,97E+01   | <b>1</b>   |