



(Re)valorisation de la fibre cellulosique papetière

Valorisation dans une stratégie de bioraffinage
forestier intégré

Pierre-Louis BOMBECK,

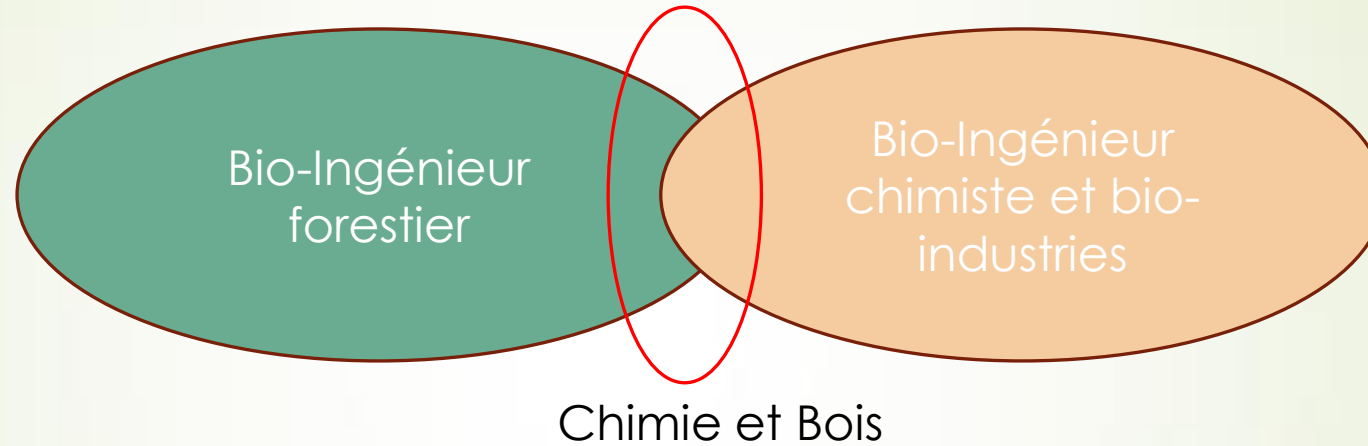
Sous la direction des Prof. Aurore RICHEL et Jacques HEBERT

Gembloux Agro-Bio Tech – Université de Liège

pl.bombeck@ulg.ac.be

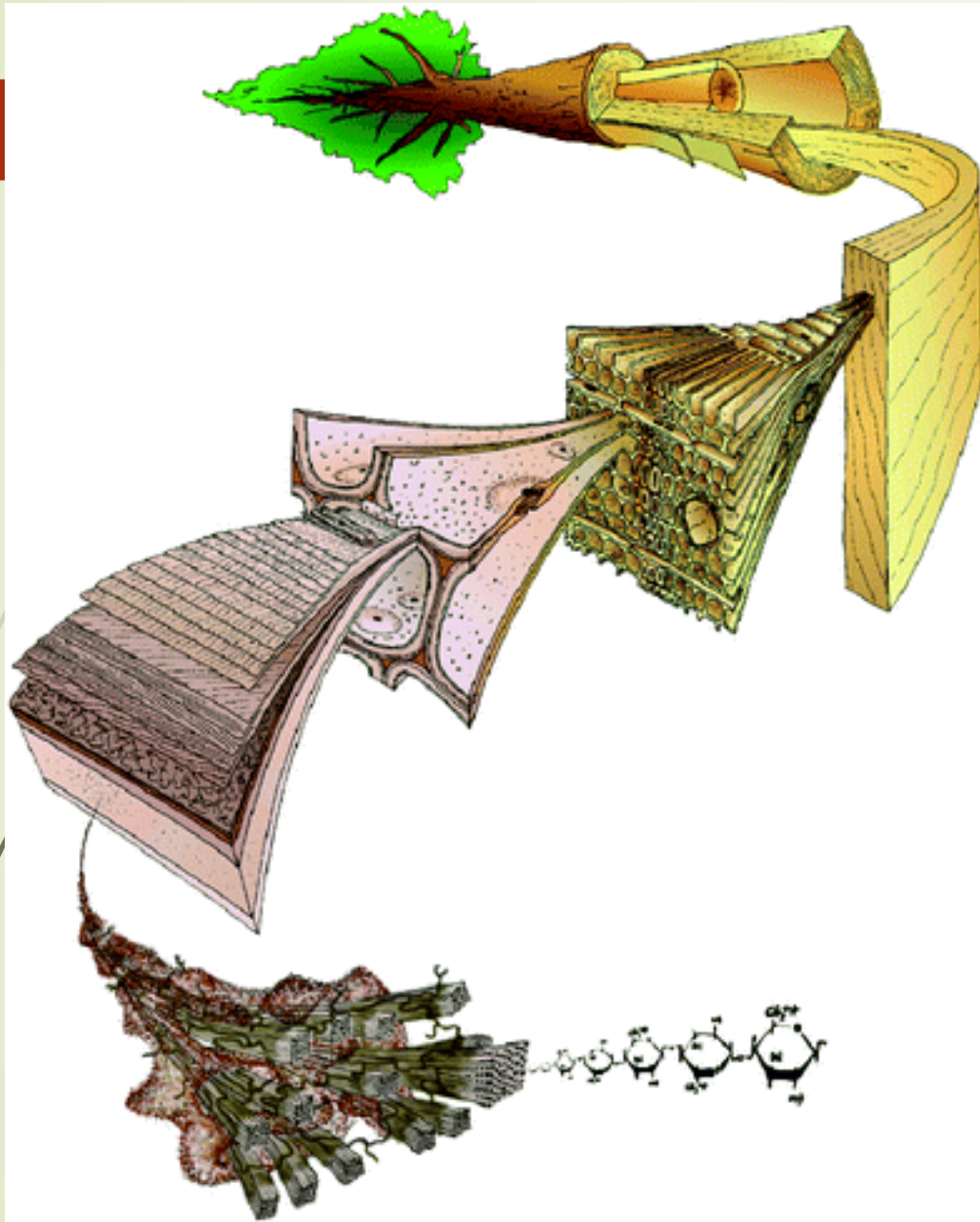
Pluribois 2017

Contexte de la thèse:

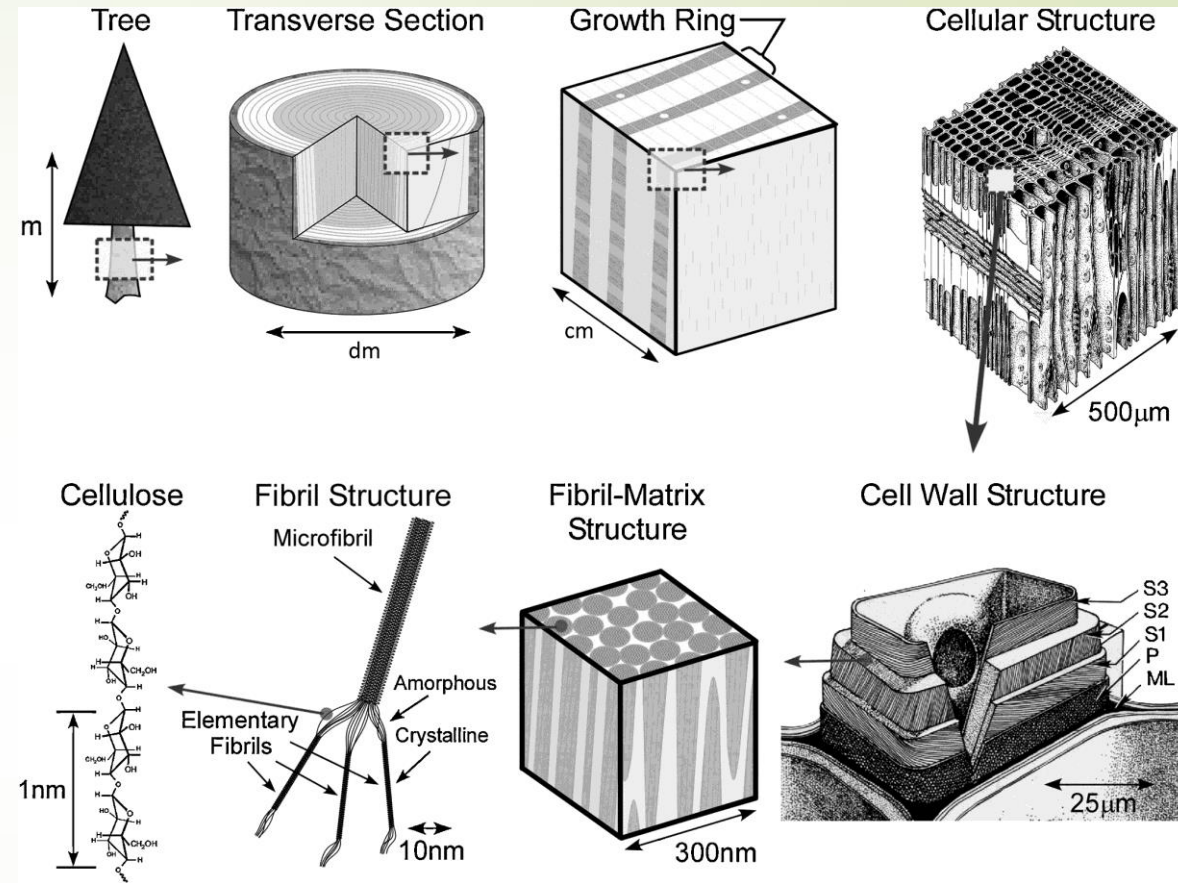


- Chimie pour le bois: durabilité, colle, etc,
- **Xylochimie - Chimie du bois**

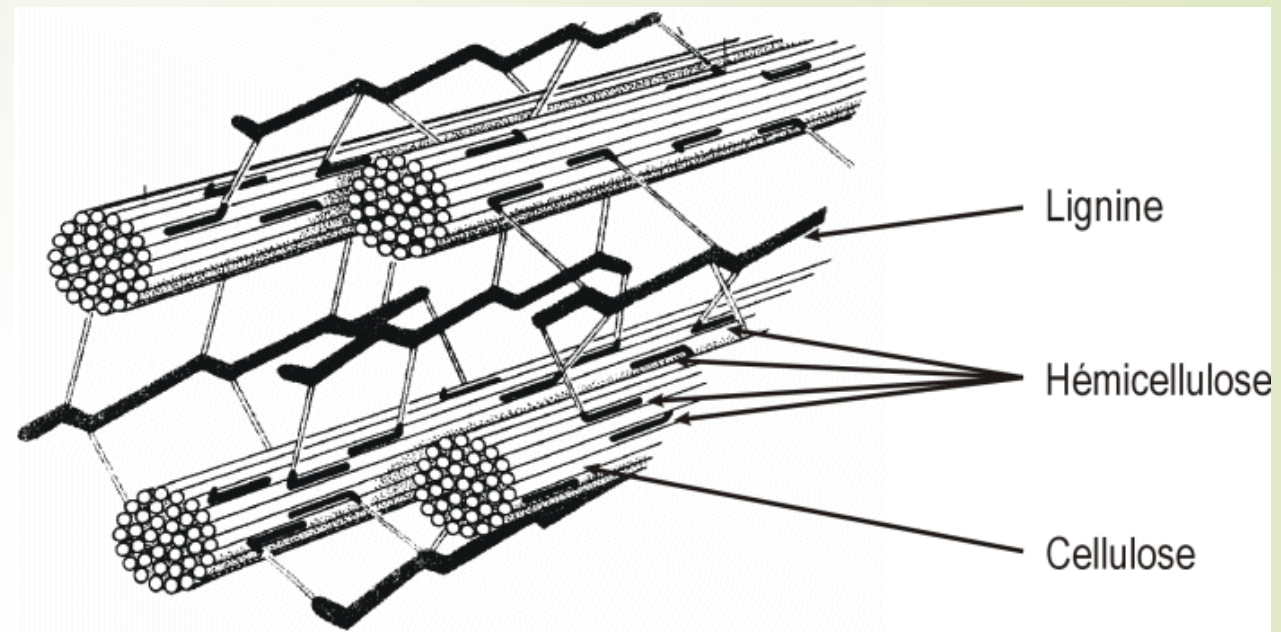
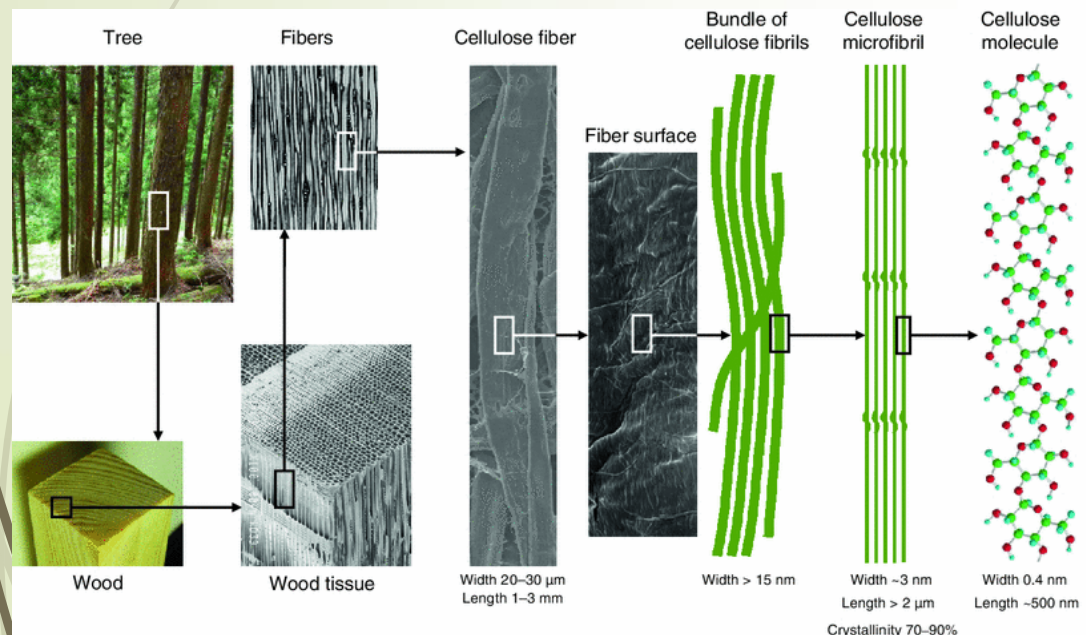
→ Travail de prospection



Hamilton, 1998



Adapté de Postek et al., 2011



Contexte local de la thèse

- Intérêt croissant pour le bioraffinage forestier

The “integrated (forets) biorefinery” concept will lead to commercial exploitation of **each component** of lignocellulosic biomass by converting them into a wide spectrum of **marketable** bioproducts and bioenergy (Ragauskas et al., 2006; Yang et al., 2013)

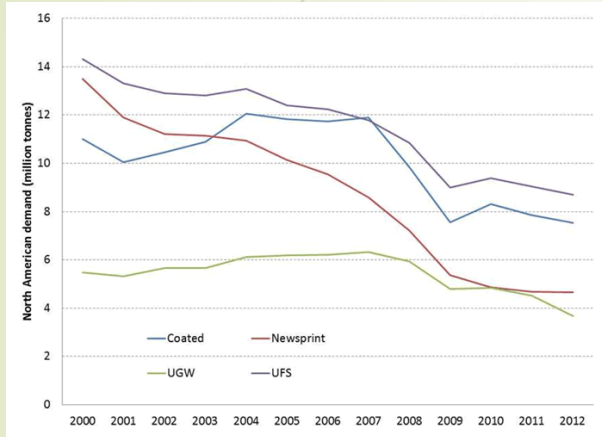
- Filière bois wallonne peut adaptée à l’arrivée d’un nouvel acteur (pression sur l’approvisionnement)

- ➔ Quelle industrie déjà existante serait la mieux adapter à une conversion vers le bioraffinage?

- ➔ Une industrie qui possède déjà sa **logistique d’approvisionnement** et qui maîtrise des **processus de déconstruction** du bois

Le candidat idéal:

Industrie papetière, actuellement sur le déclin:



Les gros papetiers sont déjà en reconversion vers le bioraffinage forestier

- Tembec
- Domtar
- Kruger
- Borregaard
- Sappi
- ...

La recherche est importante dans le domaine:

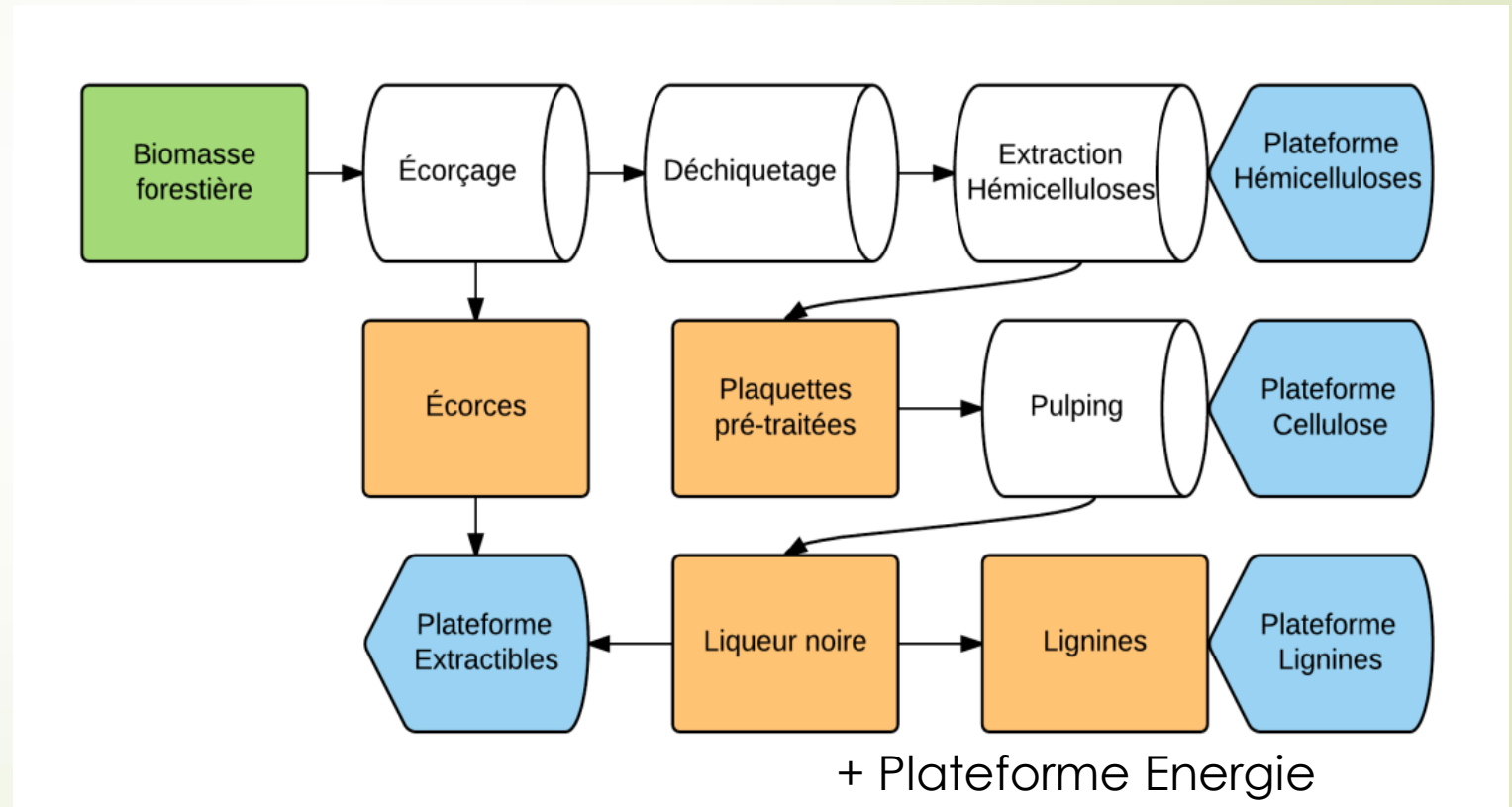
- FPInnovation (Canada)
- Innventia (Europe du nord)
- Scion (Nouvelle-Zélande)
- ...



Contexte de la thèse:

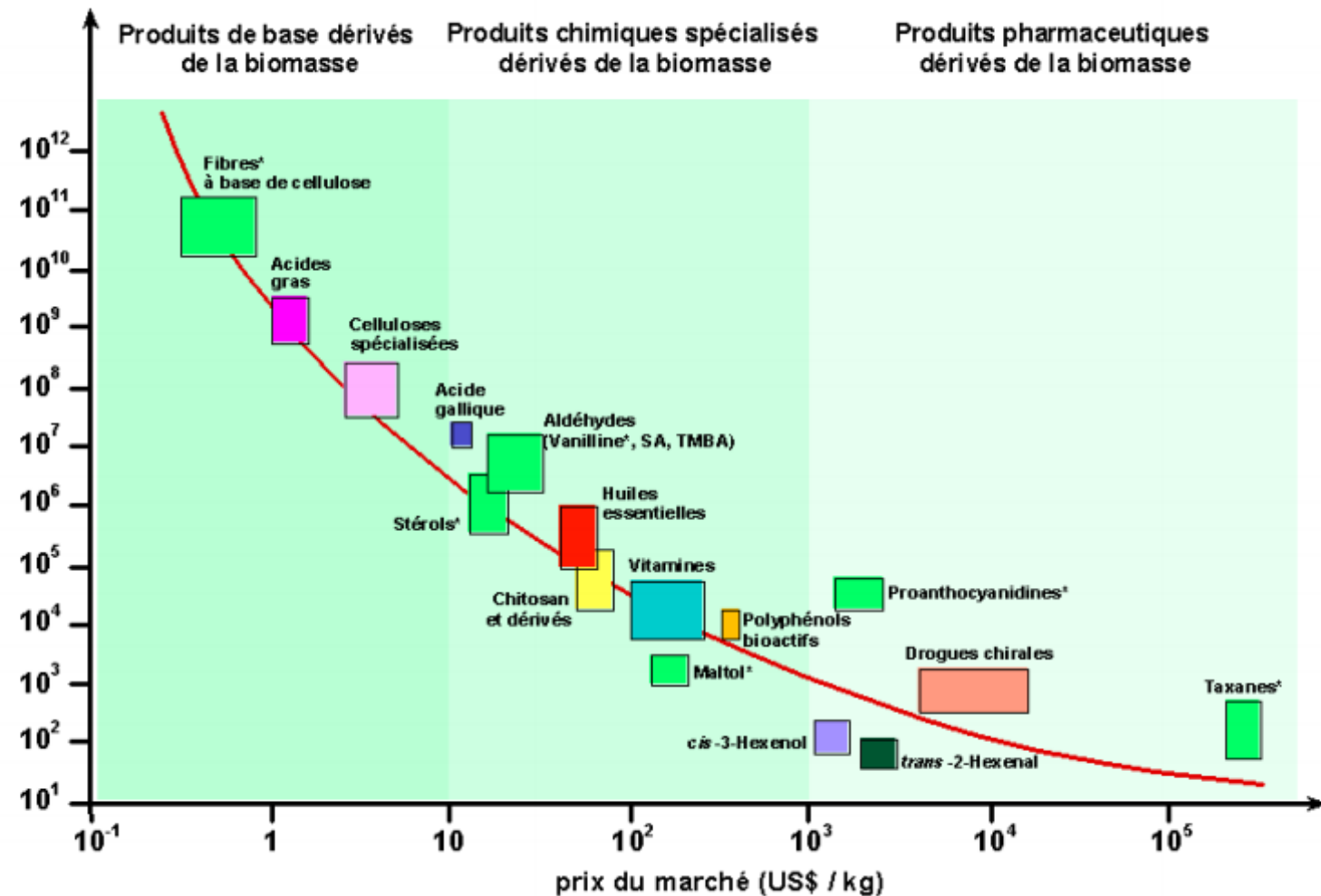
► Développement du concept de **bioraffinage forestier intégré**

- **Principe:** Conversion des usines de pâtes vers des unités de bioraffinage de la biomasse forestière
- **Nombreux avantages:** approvisionnement déjà existant, maîtrise des procédés, etc.



Valeur vs Marché (2005)

Taille du marché / prix des produits secondaires dérivés de la biomasse



Contexte de la thèse:

Industrie papetière déclinante

+

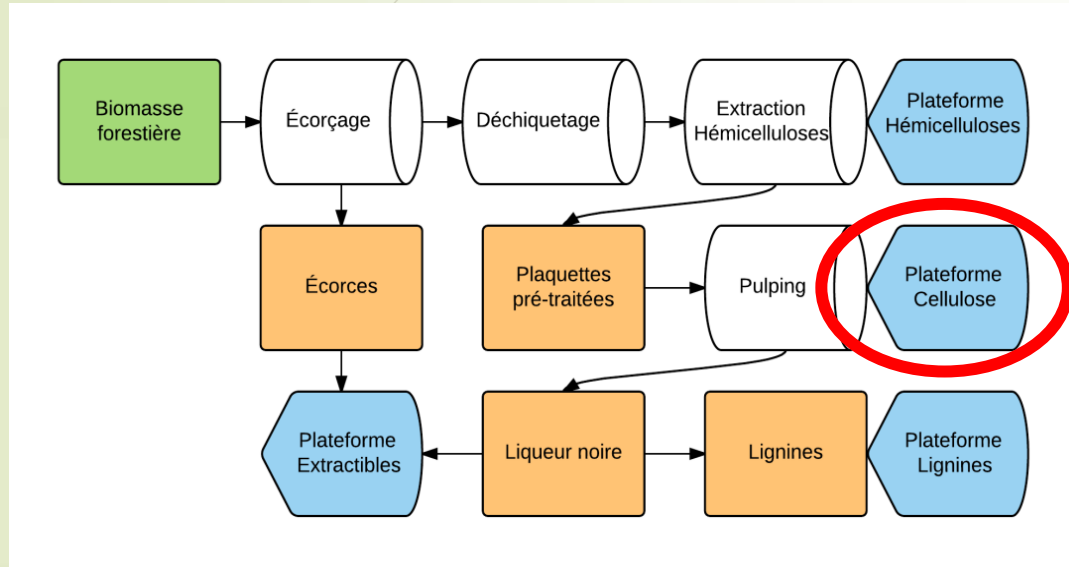
Développement du bioraffinage forestier intégré

- Recherche de nouveaux produits à plus haute valeur ajoutée
- Volonté de conserver un aspect valorisation fibre-matériau (ne pas déconstruire plus que nécessaire)

➔ **Nanocellulose** issue de la pâte à papier, selon un procédé valorisant les coproduits

« Potentiel de valorisation de cellulose papetière en nanocellulose et en produits à haute valeur ajoutée issus de ses procédés de production »

Contexte de la thèse:



Purification → Cellulose de spécialité

Hydrolyse → Sucres simples → Biofuels et Synthon

Fibre → Produits papetiers
→ **Nanocellulose**

Usine de pâte + usine de papier



Usine de pâte + usine de papier

Utilisation d'une partie
de la production en fin de chaîne
pour une filière nanocellulose

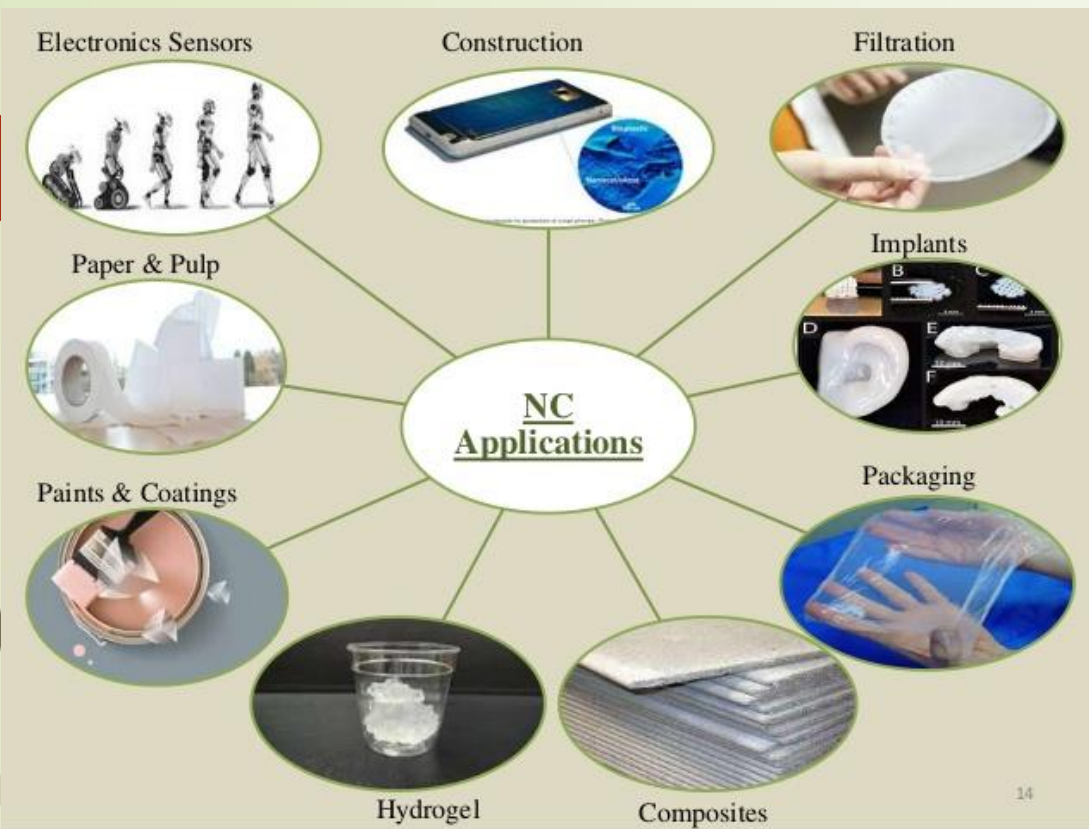
La nanocellulose

- Définition large: matériau cellulosique dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm

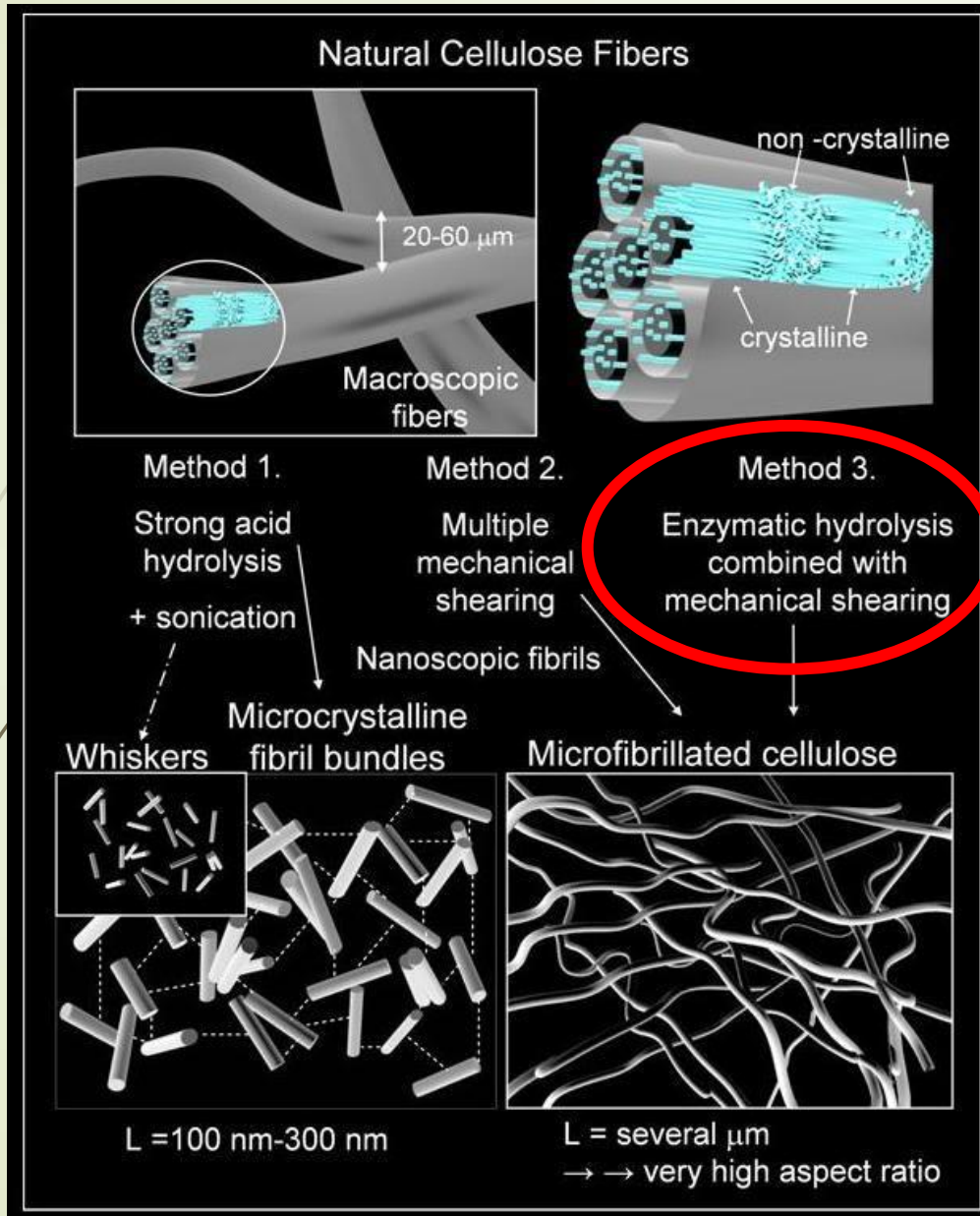
Type de nanocellulose	Synonymes	Taille moyenne
Microfibrillated cellulose (MFC)	Nanofibrils, microfibrils, cellulose nanofibers (CNF), nanofibrillated cellulose (NFC)	Diamètre : 5 – 60 nm Longueur : jusqu'à plusieurs micromètres
Cellulose Nanocrystals (CNC)	Nanocrystalline cellulose (NCC), crystallites, whiskers (Wh), cellulose nanowhiskers (CNW), rodlike cellulose microcrystals	Diamètre: 5 – 70 nm Longueur: 100 – 250 nm
Bacterial nanocellulose (BNC)	Bacterial cellulose, microbial cellulose, biocellulose	Diamètre: 20 – 100 nm Différents types de réseaux de nanofibres

La nanocellulose, pour quoi, pour qui?

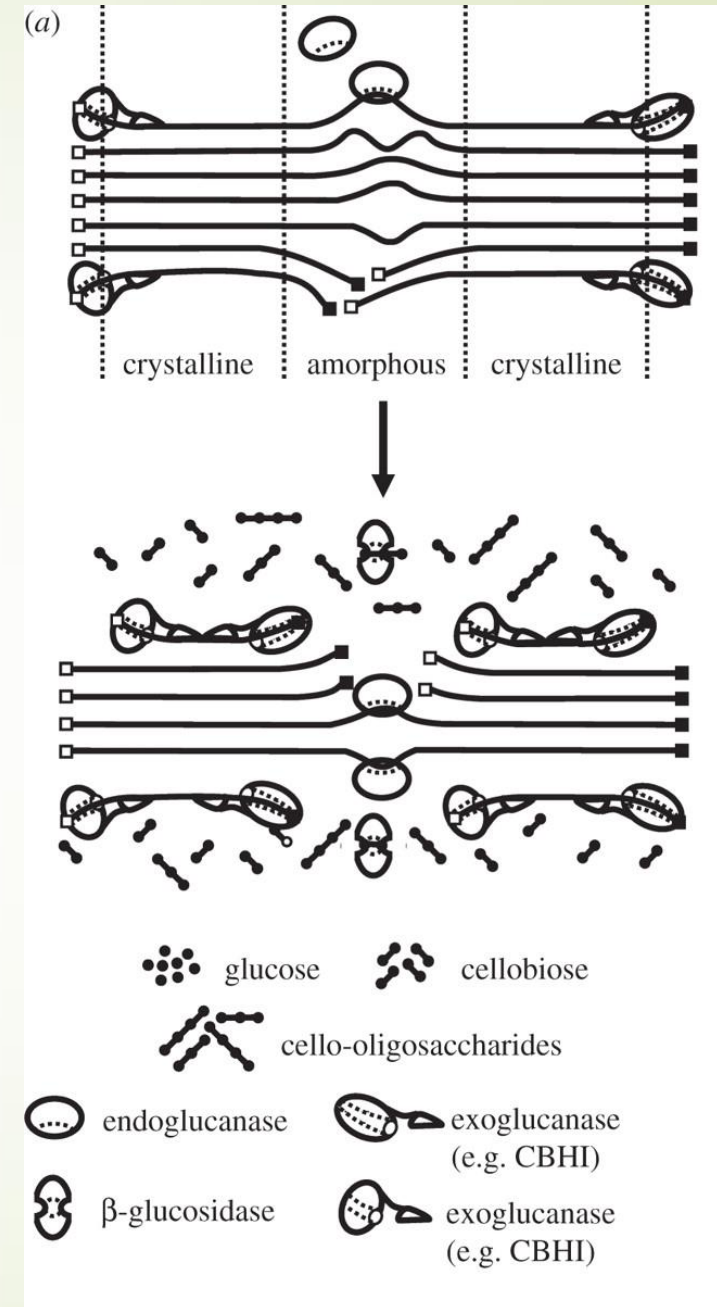
- Propriétés mécaniques, chimiques et optiques très différentes de la fibre de base
- Biosourcée, biodégradable, biocompatible
- Nombreuses applications potentielles, des biocomposites novateurs (automobile, aéronautique) aux usages pharmaceutiques et biomédicales



Roshni, 2016



Finnish centre for nanocellulosic technologies



Traitements mécaniques courants



L'hydrolyse enzymatique comme prétraitement avant un traitement mécanique des fibres de pâte à papier

► Intérêts:

- Diminution de consommation énergétique
- Technologie « verte »
- Coproduits d'hydrolyse valorisables

L'hydrolyse enzymatique comme prétraitement avant un traitement mécanique des fibres de pâte à papier

► Intérêts:

- **Diminution de consommation énergétique**

Via une diminution du nombre de cycle nécessaire, vérifiée par essais et dans la littérature

L'hydrolyse enzymatique comme prétraitement avant un traitement mécanique des fibres de pâte à papier

► Intérêts:

- Diminution de consommation énergétique

- **Technologie « verte »**

- Optimisation des conditions d'hydrolyses

Durée, T°, charge enzymatique et en substrat

L'hydrolyse enzymatique comme prétraitement avant un traitement mécanique des fibres de pâte à papier

► Intérêts:

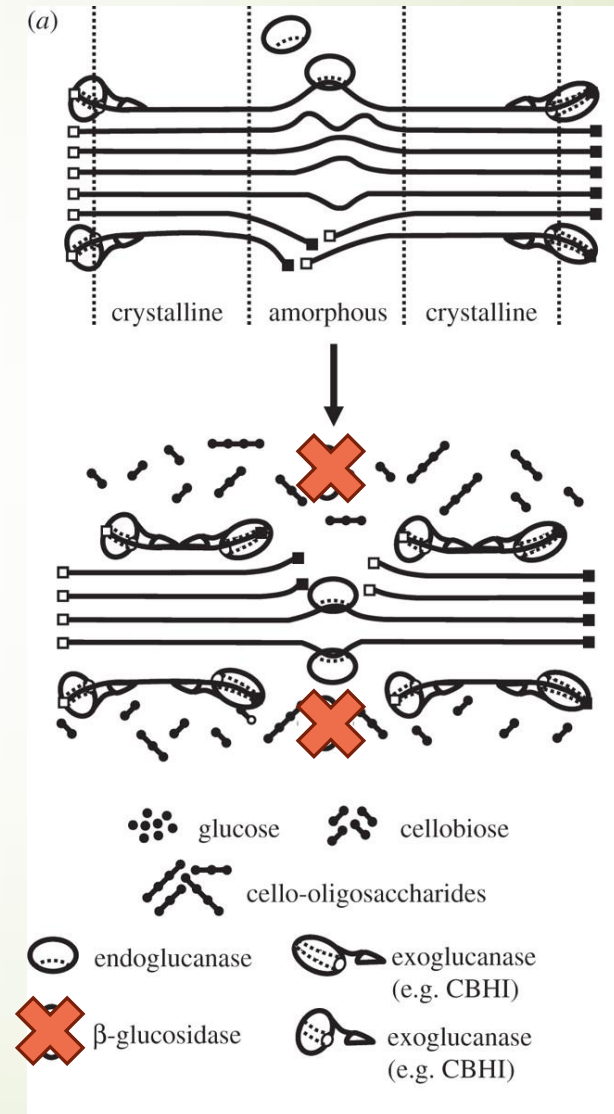
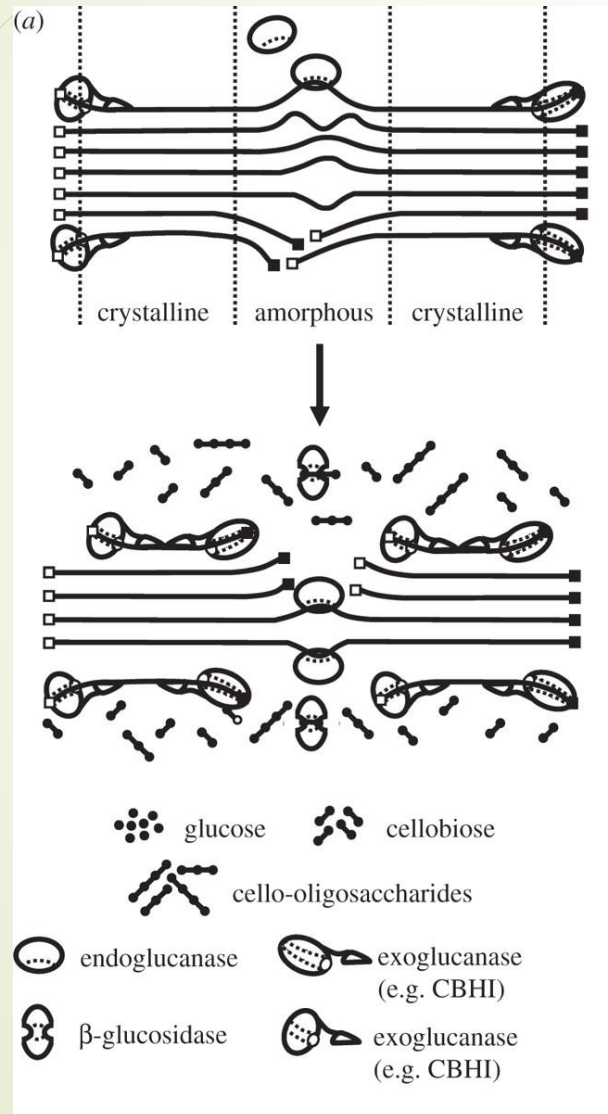
- Diminution de consommation énergétique
 - Technologie « verte »
 - **Coproduits d'hydrolyse valorisables**
- ➔ Équilibre adéquat « état fibre traitée / hydrolysats »

Choix des enzymes

- Mélanges commerciaux de cellulases et d'hémicellulases (Novozymes)
- *CelluClast 1.5L*, cellulases from *Trichoderma reesei* (**T**)
- *Carezyme 1000L*, cellulases from *Aspergillus* sp. (**A**)

Choix des enzymes

T
CelluClast from
T. reesei

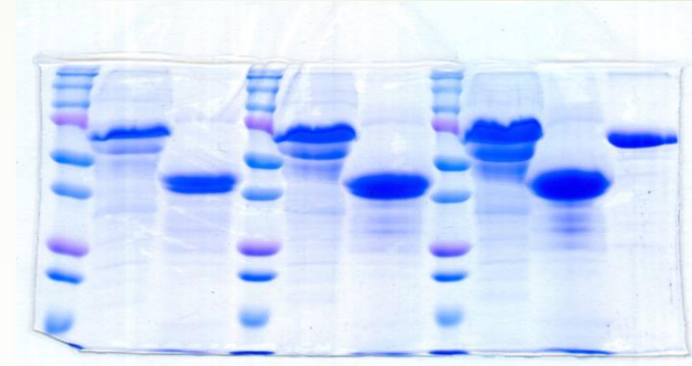


A
Carezyme from
A. sp.

Caractérisation des 2 mélanges enzymatiques (mixtures commerciales)

► Dosage Bradford:

Mélange enzymatique	Concentration (mg/ml)
CelluClast, from <i>T. reesei</i> (T)	55,42
Carezyme, from <i>A. sp.</i> (A)	10,85



► Mesures d'activités (selon des conditions spécifiques):

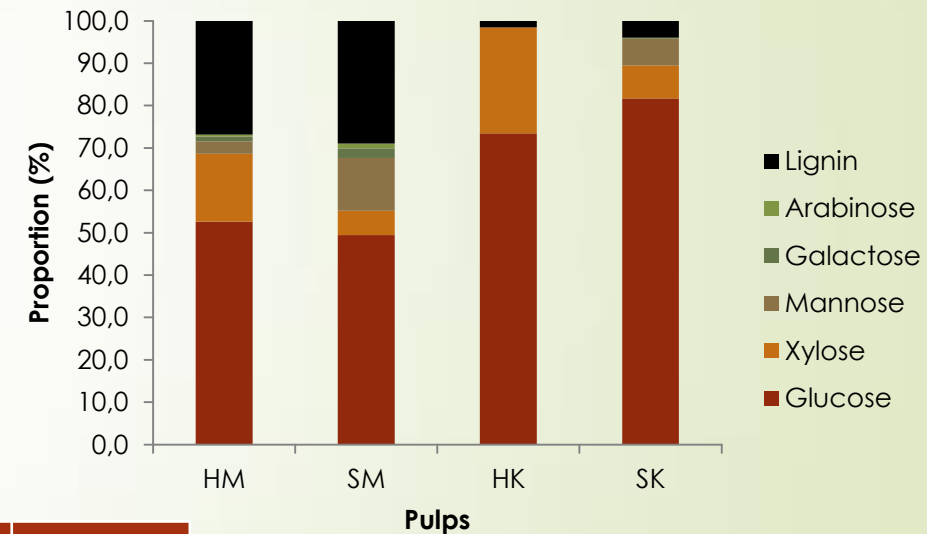
Mélange enzymatique	Act. Cellulase (U/mg)	Act. Xylanase (U/mg)	Act. Mannanase (U/mg)
T	24,7	18,9	3,9
A	17,9	13,8	4,2

Choix des pâtes à papier

- Pâtes mécaniques (CTMP) et chimiques (Kraft)
- De feuillus et de résineux
- Provenant des usines belges (+ canadiennes)

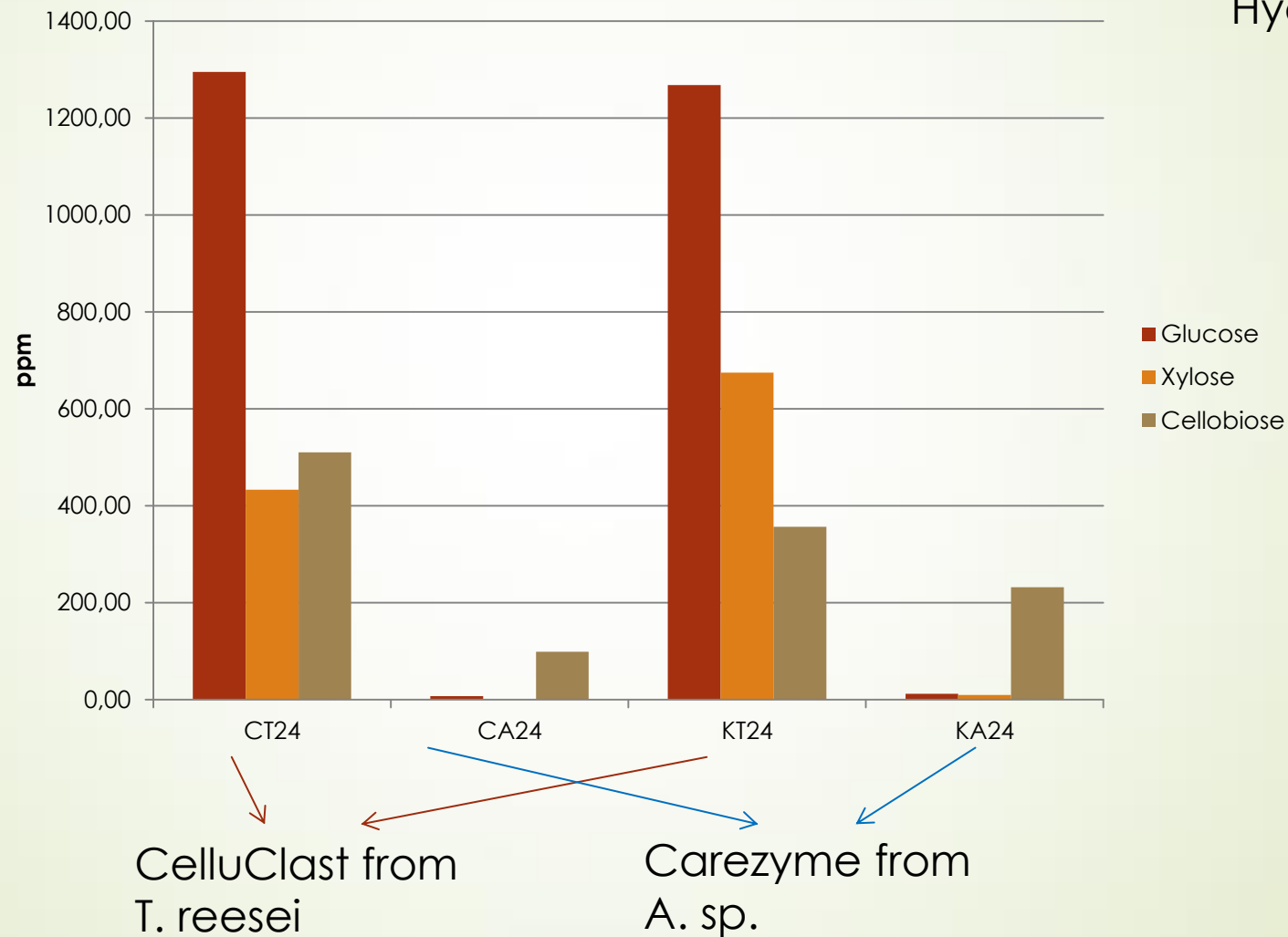
Code	Essence	Procédé	Blanchiment
HMUb	Peuplier	CTMP	Non Blanchie
HMB	Peuplier	CTMP	Blanchie
SMUb	Épicéa	CTMP	Non Blanchie
SMB	Épicéa	CTMP	Blanchie
HKUb	Mix feuillus	Kraft	Non Blanchie
HKB	Mix feuillus	Kraft	Blanchie
SKUb	Mix résineux	Kraft	Non Blanchie
SKB	Mix résineux	Kraft	Blanchie

Fibers characteristics (average values)	HM	SM	HK	SK
Length (mm)	0,71	1,31	0,76	2,35
Fines (0 to 0.2 mm) (%)	15,31	13,25	13,64	3,01
Width (µm)	22,6	27,4	17,7	26,0

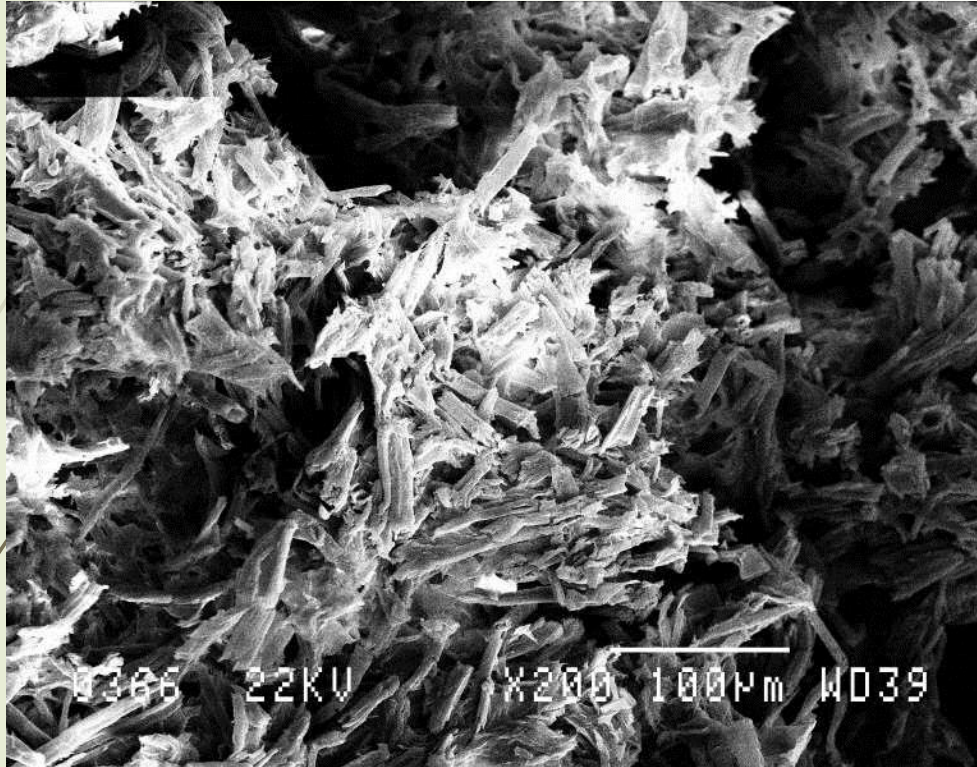


Hydrolyse enzymatique

Hydrolyse 24h

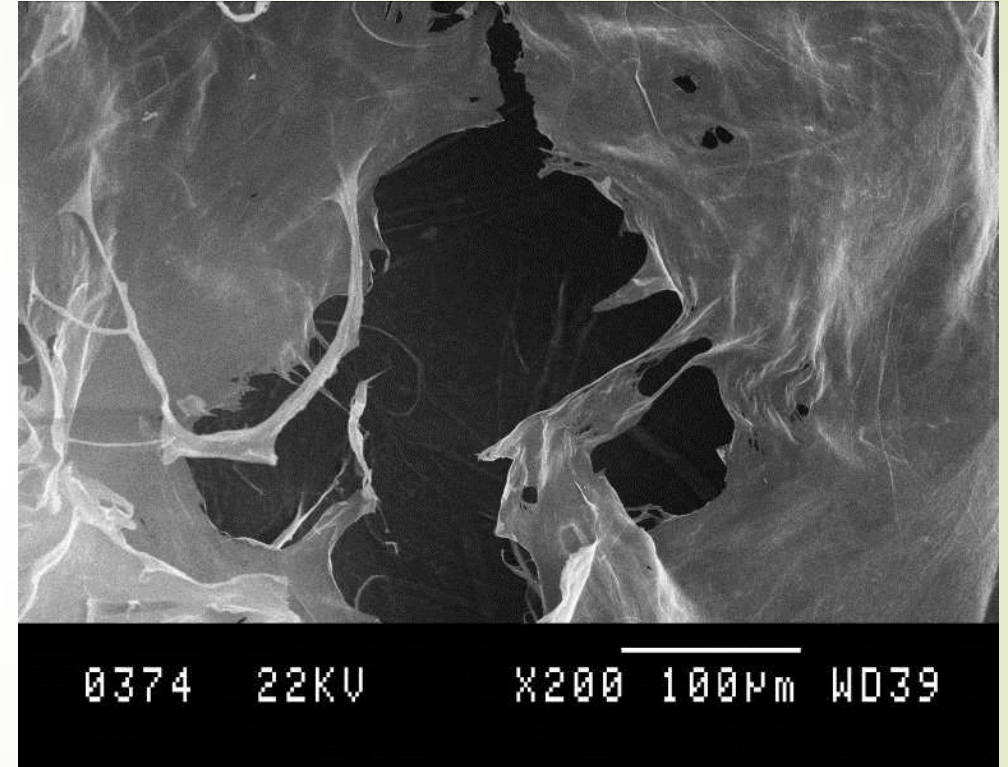


Pâte chimique Kraft prétraitée et passée au Microfluidizer®, images SEM



(J-M Thomassin, CERM, ULg)

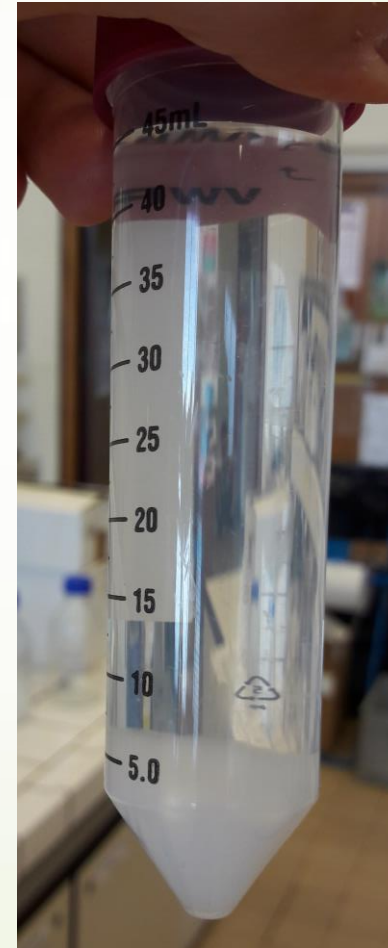
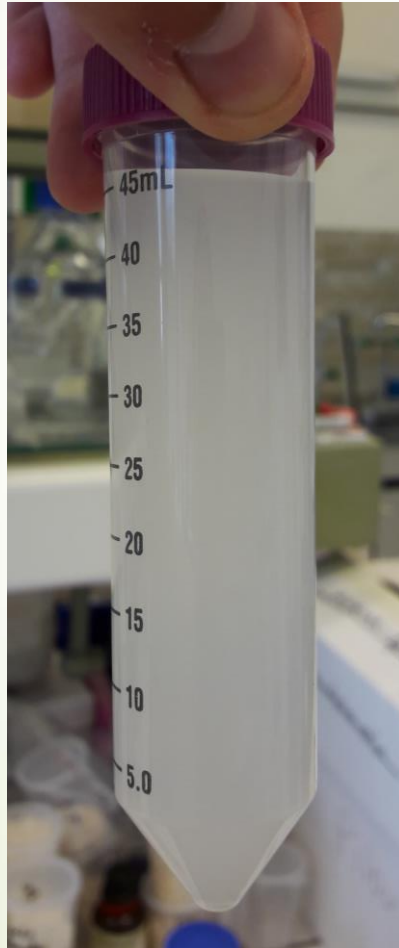
Après prétraitement enzymatique



(J-M Thomassin, CERM, ULg)

Après 5 passages et séchage

Production de MicroFibrillated Cellulose (MFC) par microfluidisation



Avant d'arriver à la nanocellulose, quelles fibres avons-nous?

- Quel a été l'impact de l'hydrolyse enzymatique sur les fibres?
- Doit-on nécessairement déconstruire jusqu'à l'échelle nano après le traitement enzymatique pour mieux valoriser nos fibres?
- ➔ Collaboration et financement d'un projet avec l'UQTR (Canada)



Utiliser la FPTM pour comprendre l'effet déconstructif des enzymes hydrolytiques sur la biomasse lignocellulosique

Synthèse des recherches et résultats obtenus à l'UQTR

Pierre-Louis BOMBECK,

Prof. Marc BEAUREGARD, Daniel Montplaisir, UQTR

Dr. Fatma Meddeb-Mouelhi, UQTR

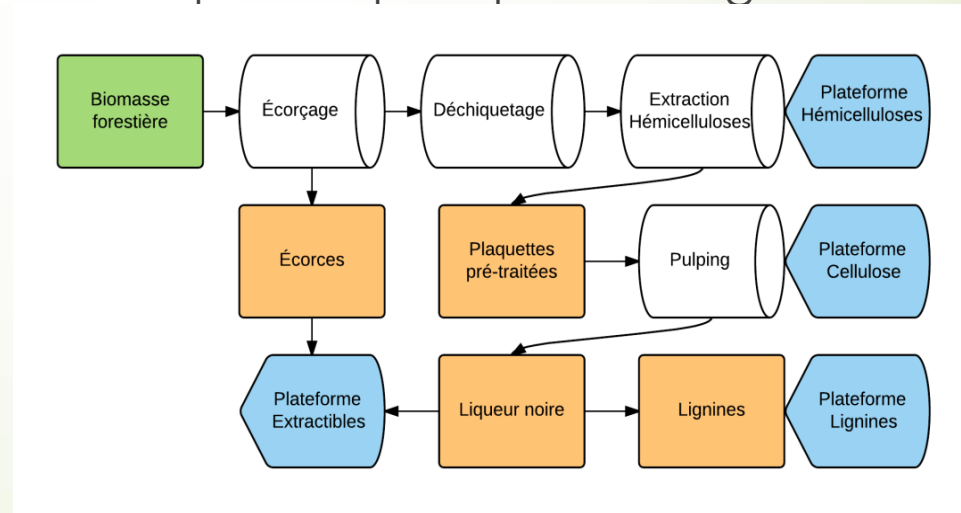
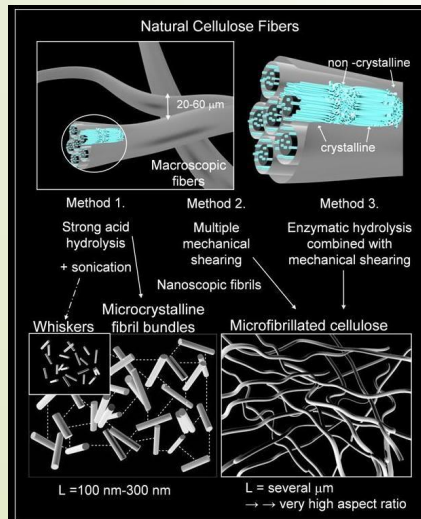
Vinay Khatri, PhD student, UQTR

Contexte général

- Bioraffinerie lignocellulosique → Bioproduits cellulosiques → Valorisation des fibres à différentes échelles (ex: nanocellulose) → Hydrolyse (enzymatique) légère
- « Soft enzymatic hydrolysis » → affecte principalement surface de fibre

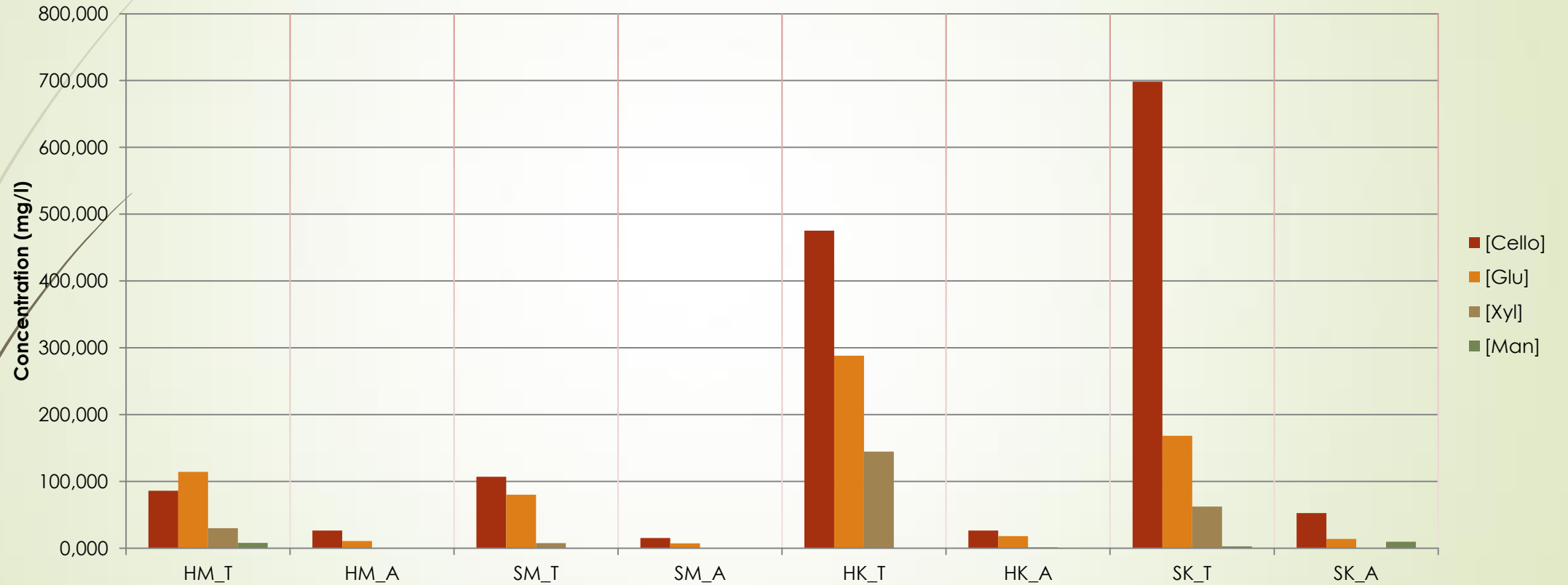
Comprendre quels composants et quels paramètres sont affectés par l'hydrolyse permettra d'adapter celle-ci au produit recherché

FPTM VS caractérisation « classique » trop simple ou longue et fastidieuse



Hydrolyse 4h, faible charge enzymatique

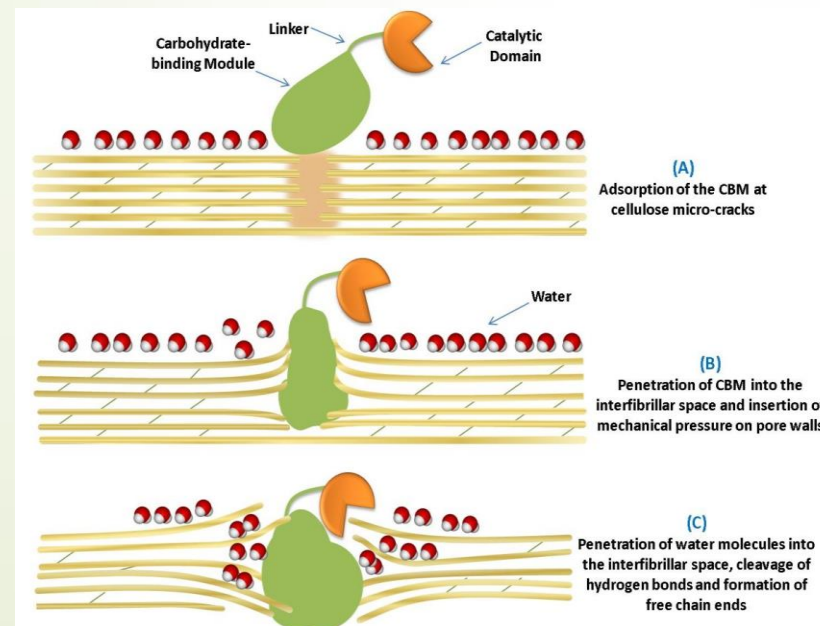
Concentration en Cellobiose, Glucose, Xylose et Mannose des hydrolysats



Fluorescent Protein Tag Method (FPTM)

► Ingénierie génétique en vue de combiner:

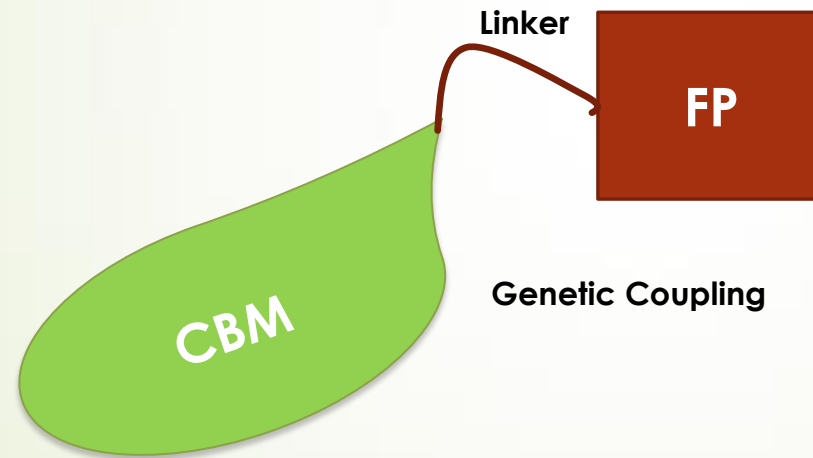
1) Le module de liaison (Carbohydrate Binding Module, CBM)

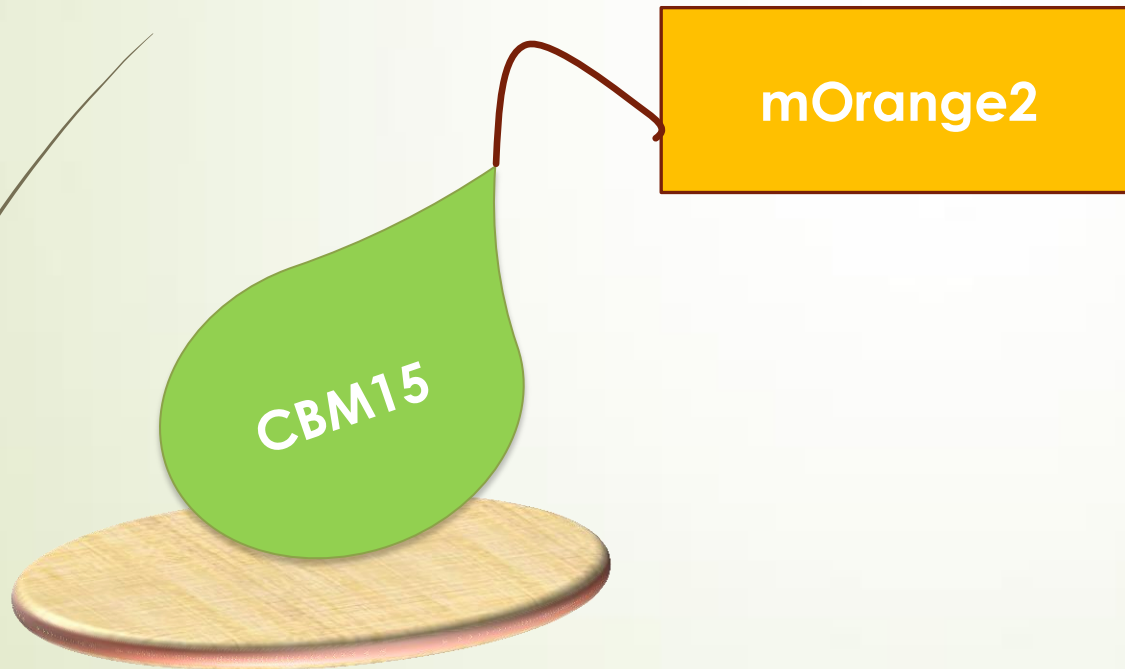


Source: V. KHATRI (2016), citant Arantes & Saddler, 2010

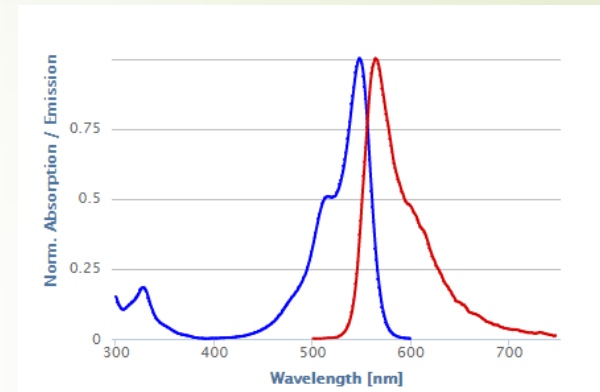
Fluorescent Protein Tag Method (FPTM)

- Ingénierie génétique en vue de combiner:
 - 1) Une protéine CBM
 - 2) Une protéine fluorescente





Source: V. KHATRI, PhD work (2016)



Excitation 549
Emission 565

Fluorescent Protein Tag Method (FPTM)

4 sondes CBM-FP développée par l'équipe de M. Beauregard à l'UQTR:

eGFP-CBM3a: module de liaison spécifique à la **CELLULOSE CRISTALLINE**

mCherry-CBM17: module de liaison spécifique à la **CELLULOSE AMORPHE**

mOrange-CBM15: module de liaison spécifique au **XYLANE**

eCFP-CBM27: module de liaison spécifique au **MANNANE**

Chaque sonde possédant des longueurs d'onde Excitation/Émission différentes

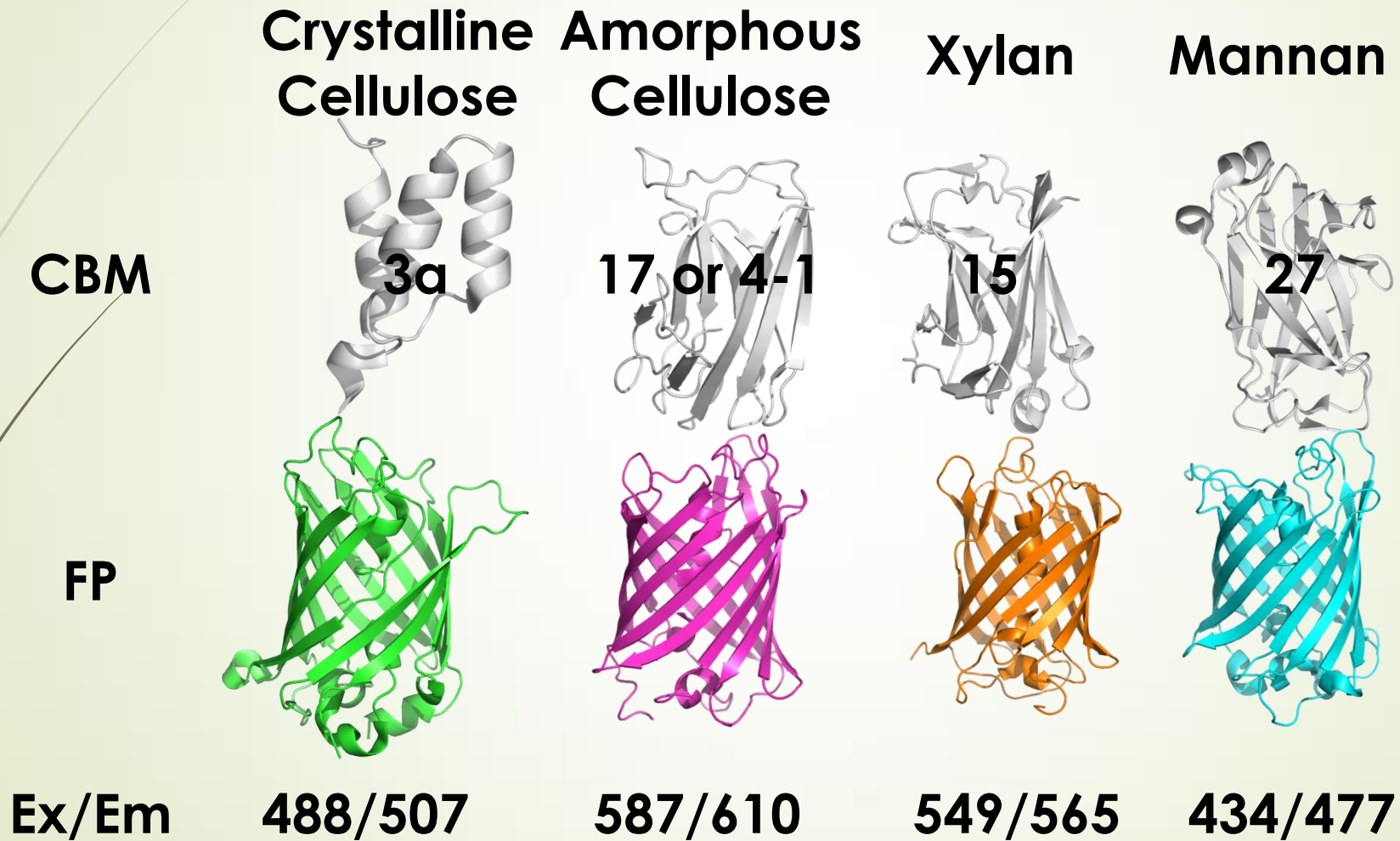
Fluorescent Protein Tag Method (FPTM)

Avantages:

- Méthode simple d'utilisation en terme d'équipement (lecteur de plaque) et de lecture des données
- Rapide (heures)
- Haut débit (plaque 96 puits)
- Suivis des modifications de surface

FPTM Probes

37



FPTM protocol

Source: V. KHATRI, PhD work (2016)

Figure 1: Microplate Preparation



Step1: Punch the handsheet to obtain 3 mm (diameter) paper discs



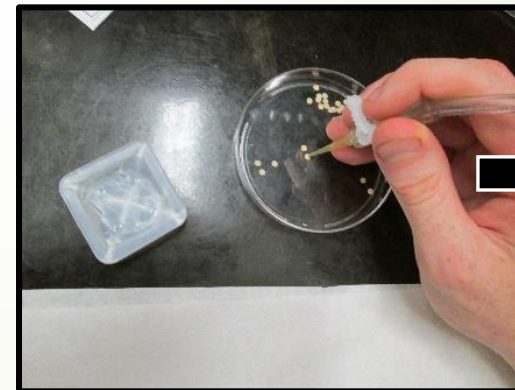
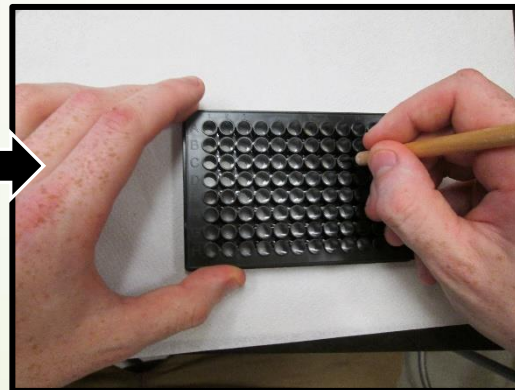
Step2: Put all paper discs in petri dish shining face down



Step3: Put a drop of nail polish into weighing cupule



Step 4: Put a small dot of transparent nail polish into the bottom of a well.



Step 5: With the vacuum apparatus take a paper punch Deposit it on the dot of transparent nail polish

Repeat steps 4 and 5

FPTM binding Assay

Source: V. KHATRI, PhD work



96 wells plate prepared with 3 mm paper discs (Costar, cat # 3631)

Step 1



1st Reading
Paper disc Autofluorescence

Step 2



Milk Blocking (3%)
Blocking 1h, Room T°C under agitation

Step 3

Buffer Washing
(3×5 min)

Step 4

2nd Reading
Blocked paper disc
Autofluorescence



Step 5

Protein Binding
1h Incubation, RT



Step 6

3rd Reading
Remove unbound (Free solution) and measure Total bound protein on paper disc



Step 7

Buffer Washing
(3×5 min)

Step 8

4th Reading
Buffer bound



Step 9

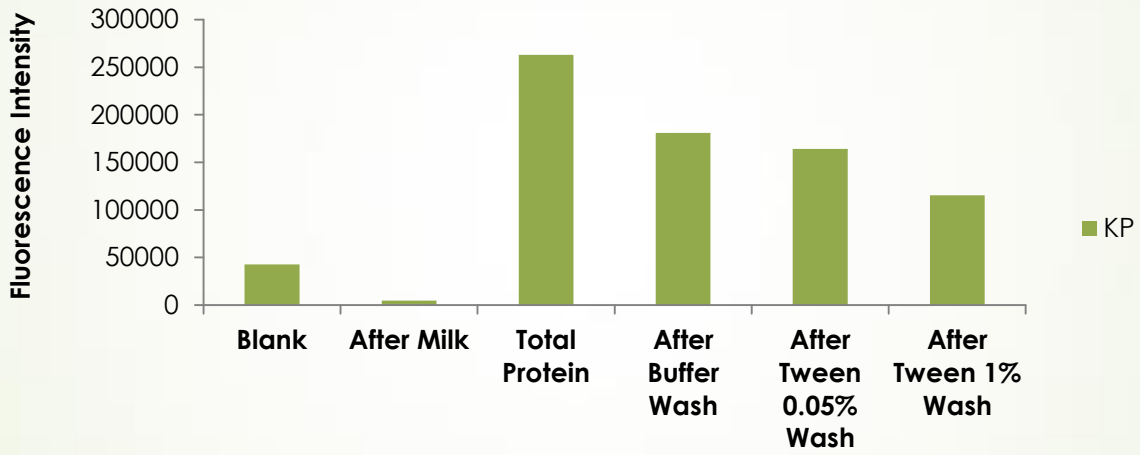
0.05% Tween 20 Washing
(3×5 min)

Step 10

5th Reading
Tween bound



Actual Fluorescence = 5th Reading - 2nd Reading



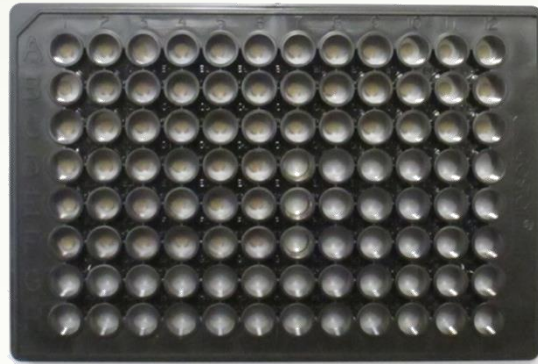
FPTM protocol

Source: V. KHATRI, PhD work

40

Binding Assay

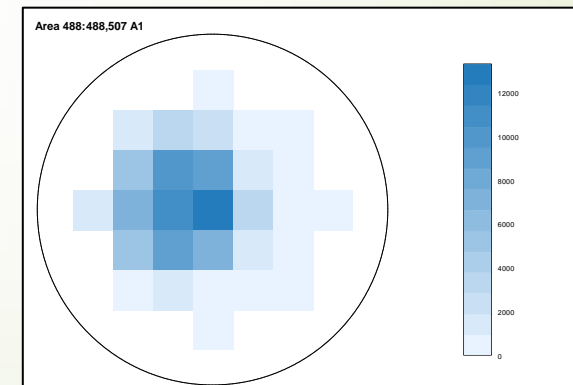
FP-CBM



**Washing (Tween 20)
remove the non
specific binding**



Area scanning



Reading parameters

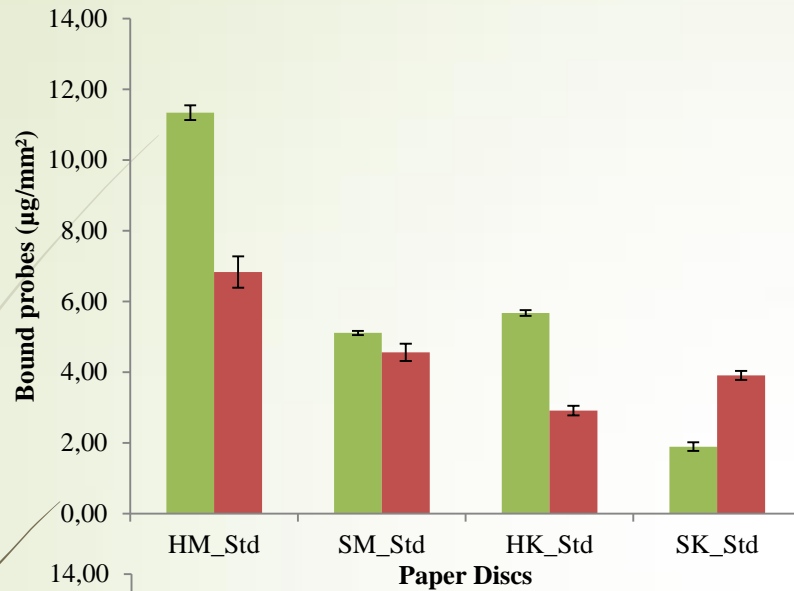
3x3, gain 25/50/75/100

Top detection: 4.5 mm

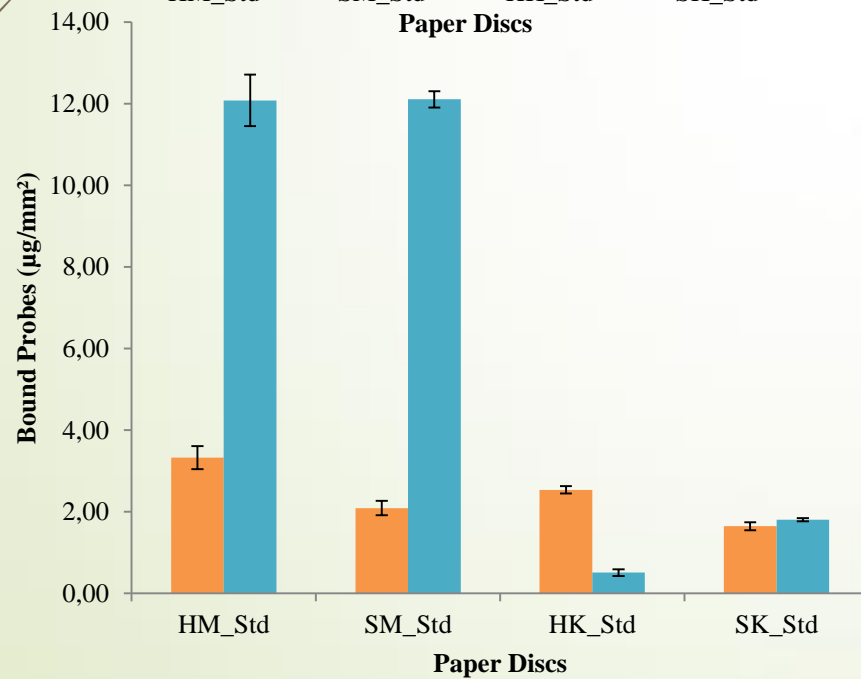
9mm bandwidth filter

Pâtes initiales

41

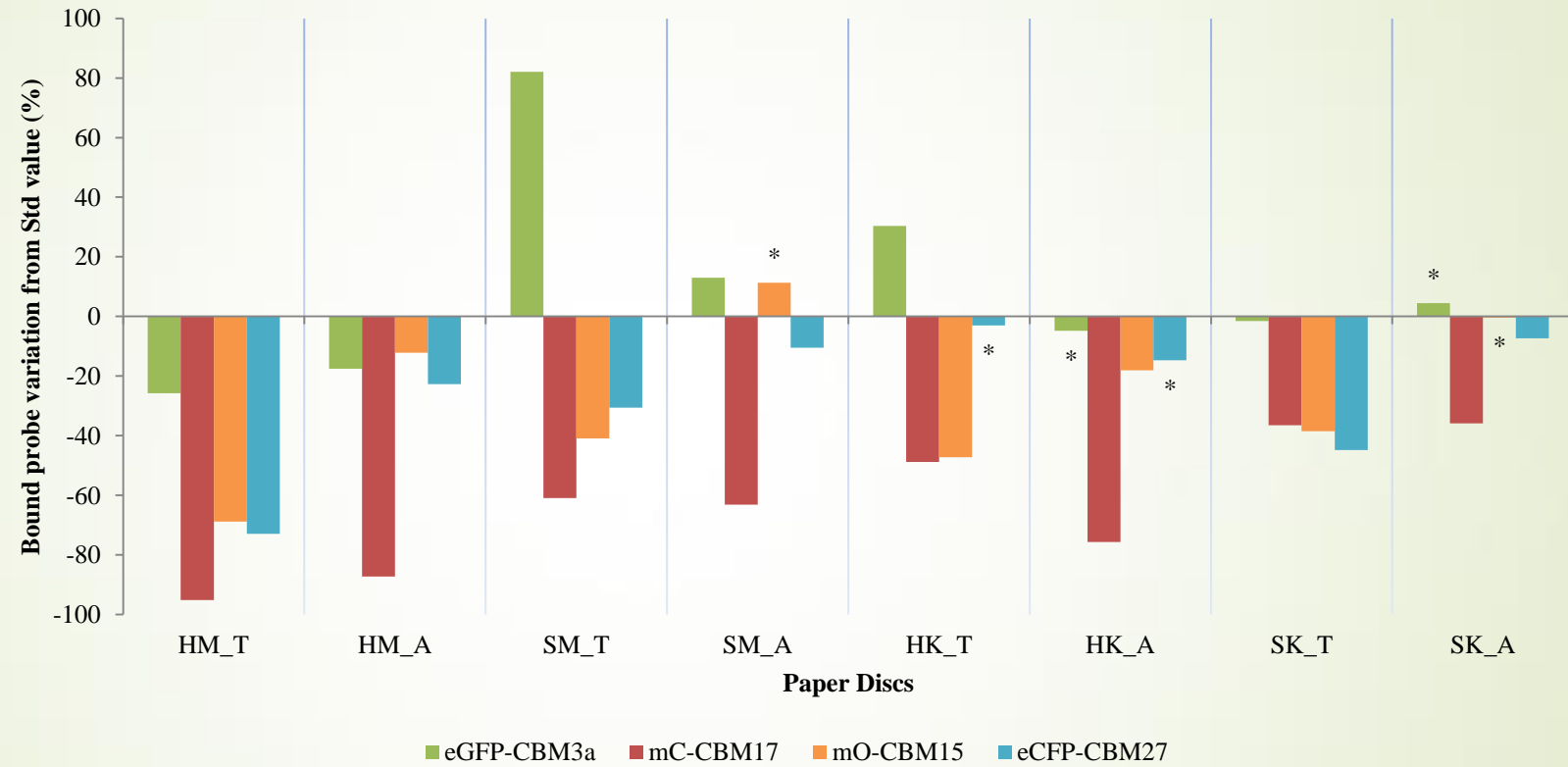


eGFP-CBM3a → Cellulose cristalline
mC-CBM17 → Cellulose amorphe



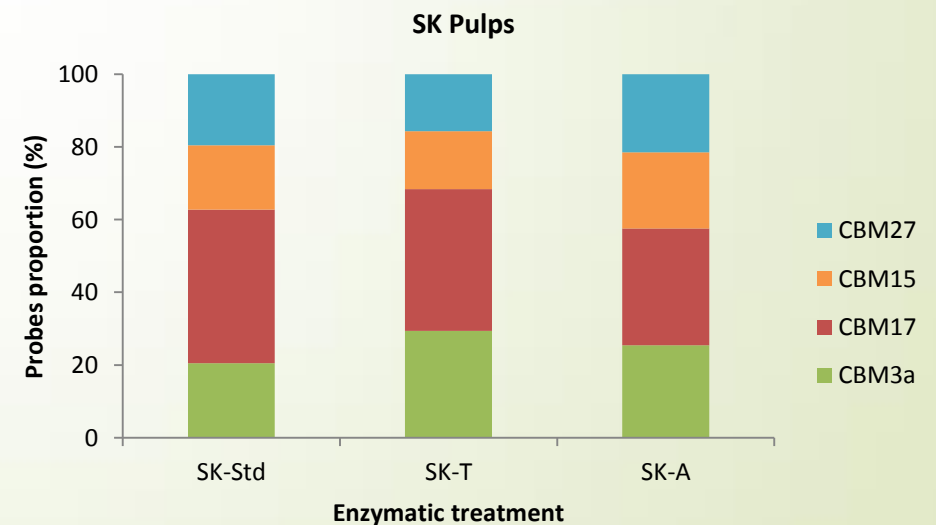
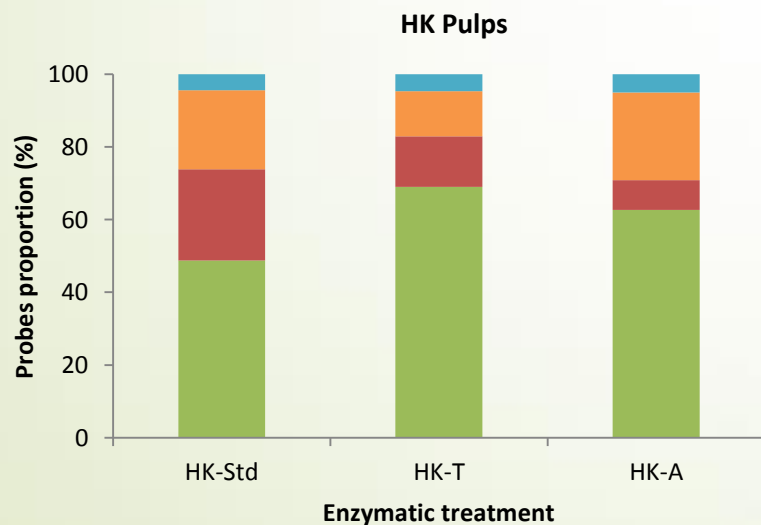
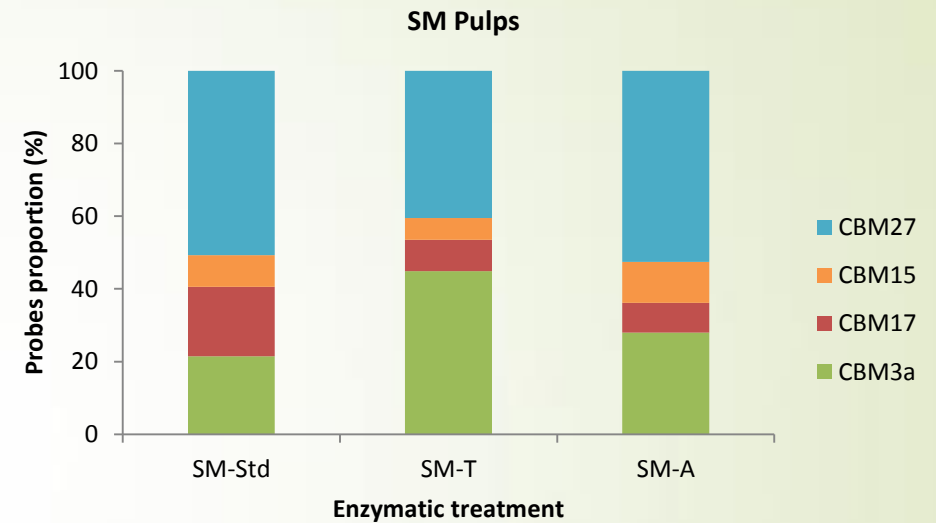
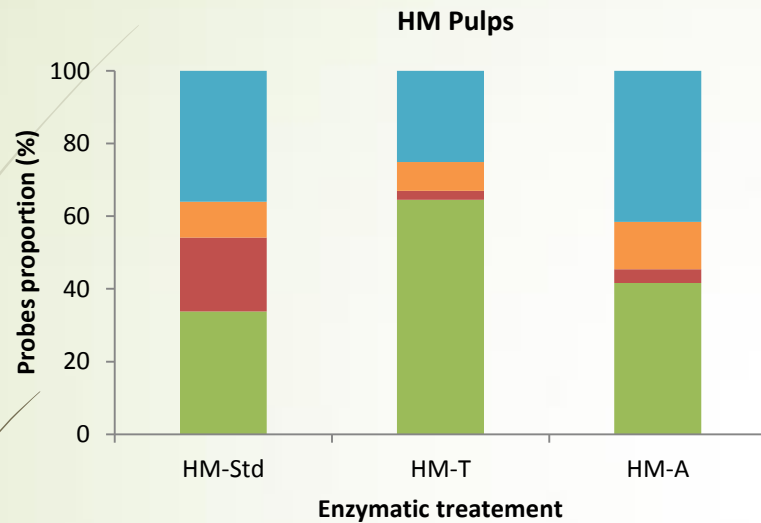
mO-CBM15 → Xylane
eCFP-CBM27 → Mannane

Variation de la réponse des sondes après traitement enzymatique



Suivi des variations d'exposition de 4 polymères en surface des fibres

Mannane
Xylane
Cellulose
amorphe
Cellulose
cristalline



Invitation à collaborer

- Usages de ces (nano)fibres traitées (ex: biocomposite, emballage,...)
- Adéquation traitement/ propriétés recherchées
- Autres modifications des fibres, autres traitements à envisager
- ...

Particularité de cette thèse:

- Souplesse dans la thématique et l'orientation du projet
- Encore 2 ans de financement

Merci de votre attention

Questions?

pl.bombeck@ulg.ac.be